



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

**Funktionelle Charakterisierung der Rolle von Perizyten für die
Neuro-Angiogenese im Pankreaskarzinom**

Laura-Christin Elisabeth Fangmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung einer
Doktorin der Medizinischen Wissenschaft (Dr. med. sci.)
genehmigten Dissertation

Vorsitz: Prof. Dr. Wolfgang A. Weber

Prüfer*innen der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ihsan Ekin Demir, Ph.D.
2. Prof. Dr. Hana Algül
3. Priv.-Doz. Dr. Calogero D'Alessandria

Die Dissertation wurde am 05.09.2022 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.02.2023 angenommen.

Die Publikationen der Doktorandin aus der Promotionszeit wurden in den untenstehenden Peer-Reviewed Journals eingereicht und veröffentlicht.

1. **Fangmann L**, Teller S, Stupakov P, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE. (2018). 3D Cancer Migration Assay with Schwann Cells. *Methods Mol Biol*, 1739:317-325.
2. Pfitzinger PL*, **Fangmann L***, Wang K, Demir E, Gürlevik E, Fleischmann-Mundt B, Brooks J, D'Haese JG, Teller S, Hecker A, Jesinghaus M, Jäger C, Ren L, Istvanffy R, Kühnel F, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE. (2020). Indirect cholinergic activation slows down pancreatic cancer growth and tumor-associated inflammation. *J Exp Clin Cancer Res*. 39(1):289. * **gleichgestellte Erstautorenschaft.**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Thematische Hinführung: Perizyten in der Tumorbilogie des Pankreaskarzinoms	5
1.2	Perizyten und physiologische Angiogenese	6
1.3	Perizyten und Tumorangiogenese.....	6
1.4	Nerven im Pankreaskarzinom	7
1.5	Zusammenhang zwischen Neurogenese und Angiogenese im Pankreaskarzinom	9
1.6	Phänotypen von Perizyten.....	10
1.7	Vorkommen und Funktion von Perizyten.....	12
1.8	Pankreaskarzinom.....	13
1.9	Neuroplastizität im Pankreaskarzinom	15
1.10	Molekularbiologie und Histopathologie des Pankreaskarzinoms	16
1.11	KPC Mausmodell.....	17
2	Zentrale Fragestellung	20
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Materialien.....	21
3.1.1	Materialien für Immunfluoreszenz.....	21
3.1.2	Materialien für Zellkultur.....	23
3.1.3	Materialien für Spinalganglienpräparation	24
3.1.4	Materialien für RNA Isolation	25
3.1.5	Software.....	26
3.2	Methoden.....	26
3.2.1	Patientenkohorte.....	26
3.2.2	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	27
3.2.3	Zellbiologische Untersuchungen.....	29
3.2.4	Proliferation-Assays	30
3.2.5	Einfluss aktivierter DRG-Neurone auf Perizyten.....	33
3.2.6	RNA Untersuchungen	36
3.2.7	Affymetrix GeneChip® Expressions Array.....	37
3.2.8	Versuchstiere: KPC Mausmodell	38
3.2.9	Statistik	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Perizyten im Pankreaskarzinom	40
4.1.1	PCV und PCI für Mikrovaskuläre/Kapillar-assoziierte Perizyten.....	49

4.1.2	PCV und PCI für makrovaskuläre Perizyten	50
4.2	Besteht ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten PCV bzw. PCI und neuraler Invasion?	51
4.3	Untersuchungen von Perizyten im Pankreaskarzinom-Mausmodell	56
4.4	Einfluss von Pankreaskarzinomzellen auf Perizyten	59
4.5	3D Kokultur Assay	61
4.5.1	Neuritendichte Assay	61
4.5.2	Einfluss von aktivierten Neuronen auf Perizyten	63
4.6	Messung der Zellfläche <i>in vitro</i> aktivierter Perizyten	64
4.7	Transkriptomanalysen zu aktivierten Perizyten	65
5	Diskussion.....	67
6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	80
7	Literaturverzeichnis	82
8	Abbildungsverzeichnis	92
9	Danksagung	94

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
αSMA	alpha smooth muscle actin
DAB	Diaminobenzidin
DRG	Dorsal root ganglion (Spinalganglion)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	hour (Stunde)
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunohistochemistry
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
MMCs	Microvascular mural cells
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NP	Normales Pankreas
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
NP	Normalpankreas
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PCa	Pancreatic cancer (Pankreaskarzinom)
PCC	Pankreaskarzinomzellen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGF	platelet derived growth factor
PSC	Pankreatische Sternzellen
rmp	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
s	Sekunde
TME	Tumor microenvironment (Tumormikroumgebung)
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMCs	Vascular smooth muscle cells

1 Einleitung

1.1 Thematische Hinführung: Perizyten in der Tumorbilogie des Pankreaskarzinoms

Das Pankreaskarzinom ist ein neuroinvasiver Tumor, bei dem die Invasion von intrapancreatischen Nerven durch Karzinomzellen eine Form der lokalen Tumorausdehnung darstellt (Liebig et al., 2009). Befallene Nerven sind einer der Gründe für die hohe Lokalrezidivrate nach operativer Resektion (Zhang et al., 2013). Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten bei der Darstellung von Nerven, Tumorgefäßen und Karzinomzellen, dass ein Zusammenhang zwischen neuraler Invasion und Tumorgefäßen besteht (Kröger et al., unpublished). Tumorpräparate mit einem hohen Anteil an vaskularisierter Gewebefläche weisen gleichzeitig einen hohen Anteil innervierter Tumorfäche auf. Wir vermuten, dass im Pankreaskarzinom eine veränderte Struktur und herabgesetzte Durchlässigkeit von Tumorgefäßen vorliegt und auf diese Weise dazu beiträgt, dass es zu einer Invasion von intrapancreatischen Nerven durch Karzinomzellen kommt. Diese Daten bilden den wissenschaftlichen Hintergrund dafür, die Gefäßdurchlässigkeit von Tumorgefäßen im Pankreaskarzinom zu untersuchen. Hiermit beschäftigt sich die vorliegende Arbeit. Perizyten sind Zellen, die Gefäßdurchlässigkeit regulieren und gehören einer Zellpopulation an, die als sog. microvascular mural cells (MMCs) zusammengefasst werden. Damit sind alle wandgebenden, *peri*-endotheliale Zellen entlang des Gefäßbaums gemeint (Armulik et al., 2011). MMCs besitzen neben der Regulation von Gefäßdurchlässigkeit vielseitige Funktionen im Rahmen von Angiogenese und mikrovaskulärer Endothelhomöostase (Armulik et al., 2011). Es ist bekannt, dass Perizyten an Tumorgefäßen des Kolorektalkarzinoms und Mammakarzinoms weniger ausgeprägt vorkommen und dies mit einer hohen Rate an hämatogener Fernmetastasierung einhergeht (Cooke et al., 2012; O’Keeffe et al., 2008; Stefansson et al., 2006; Yonenaga et al., 2005). Daher sind Perizyten in den Fokus experimenteller onkologischer Untersuchungen getreten und stellen einen interessanten Ansatz zur Erforschung von Tumorangiogenese und Fernmetastasierung dar. In Tumormausmodellen konnte gezeigt werden, dass Gefäße ohne Perizyten besonders permeabel für Tumorzellen sind, wodurch Perizyten eine regulierende Rolle im Prozess der hämatogenen Metastasierung zugesprochen wurde (Xian et al., 2006).

1.2 Perizyten und physiologische Angiogenese

Die Rolle von Perizyten bei der Entstehung neuer Blutgefäße, die als Angiogenese bezeichnet wird, ist ausgedehnt untersucht worden. Im Rahmen physiologischer Angiogenese kommt es zunächst zu einer Auflösung des engen Kontaktes zwischen Perizyten und Endothelzellen (EC). Durch Dissoziation lösen sich Endothelzellen aus dem Zellverbund und migrieren an den Ort, wo sich das Gefäßbett ausdehnt. Angiogene Endothelzellen gruppieren sich hier zu neuen Gefäßlumina. Dieser Prozess wird als „Tubeformation“ bezeichnet und ist von der Sekretion des Angiogenesefaktors platelet-derived growth factor β (PDGF- β) gekennzeichnet. Der extrazelluläre Angiogenesefaktor bindet mit hoher Affinität an Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) (Andrae et al., 2008). Über die lokale Anreicherung von PDGF- β werden Perizyten, die den korrespondierenden PDGF- β -Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, durch einen Chemotaxis-Gradienten zu Gefäßknospen rekrutiert. Der PDGF- β /PDGF- β -Rezeptor Signalweg spielt beim Wachstum von neuen Gefäßen und deren Stabilisierung eine entscheidende Rolle (Raza et al., 2010). Perizyten können entweder stabilisierend (anti-angiogen) oder aktivierend (angiogen) auf das Gefäßendothel einwirken (Raza et al., 2010). Wie ausgeprägt Perizyten an einem Gefäßendothel vorhanden sind, wird als „Perizyten-Coverage“ bezeichnet und ist ein Kennzeichen für den Reifegrad eines Gefäßendothels (Armulik et al., 2011). Genetischer Knock-out von PDGF- β und des korrespondierenden Rezeptors führt im Mausmodell zu massiven Hämorrhagien mit Aneurysmen und Gefäßdysfunktion (Levéen et al., 1994).

1.3 Perizyten und Tumorangio-genese

Tumorgefäße unterscheiden sich erheblich von physiologischen Gefäßen, insbesondere hinsichtlich der Perizyten-Endothelzell-Verbindung (Morikawa et al., 2002). Hypoxie-getriggert kommt es während Tumorangio-genese zu vermehrter Expression der Angiogenesefaktoren VEGF-A, HIF und Ang2 (Aiello et al., 1995). VEGF-A ist in Angiogenese-Assays einer der potentesten Angiogenesefaktoren und induziert eine starke Endothelzellproliferation, sowie die Bildung von Gefäßknospen (Carmeliet, 2005). VEGF kann jedoch keine Rekrutierung von Perizyten vermitteln und wurde sogar als ein negativer Regulator für die Rekrutierung von Perizyten beschrieben, ähnlich wie Ang2, was im Rahmen von Tumorneoangiogenese-Assay

beschrieben wurde (Greenberg et al., 2008). In hypoxischen Tumoren mit VEGF-getriebener Angiogenese weisen Tumorgefäße oftmals ein Perizytendefizit auf und sind funktionell unreif (Greenberg et al., 2008). Auf diesen Beobachtungen beruht die Theorie, dass der Reifegrad des Tumorgefäßbetts bzw. dessen Ausstattung mit Perizyten wesentlich bestimmt, wie anfällig Gefäße für die Invasion von Tumorzellen sind (Xian et al., 2006). Die Untersuchungen humaner Tumorpräparate von Patienten mit Kolorektalkarzinomen, Brustkrebs und Endometriumkarzinom haben gezeigt, dass ein niedriger Perizyten-Besatz (Perizyten-Coverage-Index) mit einer hohen Rate an hämatogener Fernmetastasierung einhergeht (Cooke et al., 2012; O'Keeffe et al., 2008; Stefansson et al., 2006; Yonenaga et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass Tumorgefäße mit einem Perizyten-Defizit für Karzinomzellen besonders permeabel und leicht zu überwinden sind. In einem Mausmodell für Pankreaskrebs, dem Beta-Zelltumor/Insulinom-Mausmodell, konnte demonstriert werden, dass eine Perizytendepletion zu einer höheren Rate an Fernmetastasen führt. Diese Arbeit charakterisierte Perizyten als sogenannte „gate-keeper“ und damit wesentliche Regulatoren für hämatogene Metastasierung (Xian et al., 2006). Weiter konnte gezeigt werden, dass Perizyten durch Überexpression des Angiogenesefaktors PDGF- β eine inhibierende Wirkung auf Tumorwachstum ausüben können. In Xenograft Mausmodellen führte die Überexpression von PDGF- β in Tumorzellen zu verstärkter Rekrutierung von Perizyten mit dem Resultat, dass Tumorwachstum reduziert wurde (McCarty et al., 2007). Die funktionelle Bedeutung einer erhöhten Perizyten-Coverage konnte auch in einem Prostatakrebsmausmodell, namens LNCaP, veranschaulicht werden. Dieses wies bei erhöhter Tumorgefäßdichte mit hoher Perizytenbedeckung bzw. Perizyten-Coverage eine niedrige Rate an hämatogener Fernmetastasierung im Vergleich zu Kontrollen auf (Welén et al., 2009). Diese Daten veranschaulichen, dass Perizyten eine bedeutsame Rolle während der Tumorprogression zukommt, die möglicherweise auch relevant für das Verständnis der Biologie des Pankreaskarzinoms ist, insbesondere hinsichtlich der pankreaskarzinomtypischen neuralen Invasion.

1.4 Nerven im Pankreaskarzinom

Grundsätzlich kann Tumordissemination über hämatogene, lymphogene oder lokale Invasion erfolgen (Gerhardt et al., 2008). Im Pankreaskarzinom beobachtet man als Besonderheit eine weitere Form der Tumorausdehnung, die entlang

intrapankreatischer Nerven erfolgt und als neurale Invasion (NI) bezeichnet wird. Obwohl NI kein pankreasspezifisches Phänomen darstellt, ist die Inzidenz von NI in keiner anderen Tumorentität vergleichbar hoch und wird beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas mit bis zu 100% angegeben (Ceyhan et al., 2010; Demir, Ceyhan, Liebl, et al., 2010; Liebl et al., 2014; Liu et al., 2002). Im Vergleich dazu beträgt die Rate von NI beim Kolorektalkarzinom 30%, beim Magenkarzinom 38%, bei Speiseröhrenkrebs bis zu 36-65% und Leberkrebs circa 6-58% (Liebl et al., 2014; Liebl et al., 2013; Liu et al., 2002). Ferner veranschaulichten Metaanalysen von Patienten mit Pankreaskarzinom, dass der Befall von Nerven erheblich zur Lokalrezidivrate beiträgt (Dusch et al., 2014; Garcea et al., 2008; Zhang et al., 2013). Die NI wird anhand von histopathologischer Begutachtung in 3 Schweregrade unterteilt und richtet sich danach, wie weit Karzinomzellen in das Innere eines Nervs vorgedrungen sind (Liebl et al., 2014). Die Kategorisierung erfolgt in epineurale, perineurale und endoneurale Invasion und wird in Form einer Skala mit 0, 1 oder 2 angegeben, wobei die Karzinomzellen im Falle von endoneuraler Invasion in direktem Kontakt mit Axonen und Gliazellen (Schwannzellen) geraten (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009). Besonders schwerwiegende, endoneurale Invasion korreliert mit einem verringertem Gesamtüberleben von Pankreaskarzinompatienten und weist damit prognostische Relevanz auf (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009). Für die Pathogenese der NI spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Wesentlich ist der Aufbau eines chemotaktischen Gradienten zwischen Nerven und Karzinomzellen, der über die Sekretion neurotropher Faktoren vermittelt wird (Demir, Ceyhan, Liebl, et al., 2010). Neurotrophe Faktoren werden zum Beispiel von Nervenzellen selbst, aber auch von ihren Gliazellen sezerniert und sind essenziell für das Wachstum, die Regeneration und das Überleben von Nerven (Yan et al., 2003). Von den zahlreichen neurotrophen Faktoren konnte eine erhöhte Expression des sog. *nerve growth factor* (NGF) in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden. Ferner zeigte sich, dass die Expression von NGF im Gewebe von Pankreastumoren eine positive Korrelation mit dem Schweregrad NI aufweist (Zhu et al., 1999). Es wird angenommen, dass es sich bei NI um einen beidseitigen Zell-Tropismus handelt, ausgehend von Nerven und den Zellen des tumor microenvironments (Ceyhan et al., 2008; Demir, Ceyhan, Rauch, et al., 2010). Zum Beispiel sezernieren ebenso Immunzellen (insb. Mastzellen) und pankreatische Sternzellen neurotrophe Faktoren (Demir et al., 2013; Haas et al., 2009). Perizyten zählen auch zu den Komponenten des tumor microenvironments und

können mit Nerven interagieren. Dies zeigt sich darin, dass sie unter *in vitro* Bedingungen genauso viele neurotrophe Faktoren sezernieren wie kultivierte Astrozyten, die zur der Familie der Gliazellen zählen (Shimizu et al., 2011). Es wird vermutet, dass hierüber beispielsweise die Durchlässigkeit der peripheren Blut-Nerv-Barriere reguliert wird, an dessen Aufbau Perizyten beteiligt sind (Shimizu et al., 2012). Experimentelle Untersuchungen zeigten weiterhin, dass lediglich der Zellüberstand von Perizyten, nicht aber der von Astrozyten in der Lage ist, die Insulinsensitivität von hypothalamischen Neuronen zu steigern (Takahashi et al., 2015). Weitere pathophysiologische Mechanismen, die zur NI beitragen, sind die Expression Tumorzell-assoziiertes Adhäsionsmoleküle, sowie zytoskelettaler Proteine und Axon-guidance Moleküle (Göhrig et al., 2014). Zunehmend wird auch die Rolle von Schwannzellen im Rahmen von NI wahrgenommen (Swanson et al., 2007). Dies konnte durch Schwannzell-assoziierte Oberflächenproteine, wie myelin-associated glycoprotein (MAG) veranschaulicht werden, die eine Adhäsion zwischen Schwannzellen und Karzinomzellen vermitteln (Swanson et al., 2007). Neuere Erkenntnisse haben ferner die Relevanz der Rezeptor-Liganden Achse CXCL12/CXCR4 hervorgehoben, welche besonders für die frühe Pathogenese der NI entscheidend ist (Demir et al., 2017). Über CXCL12 Sekretion werden Schwannzellen zu neoplastischen Vorläuferläsionen rekrutiert (Demir et al., 2017). Das ebnet den Pfad für eine spätere Invasion von Nerven und zum anderen führt es zu einer Suppression des pankreaskarzinom-assoziierten neuropathischen Schmerzempfindens (Demir et al., 2017).

1.5 Zusammenhang zwischen Neurogenese und Angiogenese im Pankreaskarzinom

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ausführlich den Zusammenhang zwischen der Tumervaskularisation, Innervation und NI im Pankreaskarzinom analysiert. Kröger et al. (unpublished) untersuchten, ob bei verminderter Tumervaskularisation gleichzeitig eine verstärkte Tumordinnervation besteht. Die Arbeit verfolgte die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen herabgesetzter Tumervaskularisation und der pankreaskarzinomtypischen NI bestehen könnte. Als Vergleichsorgan wurden die Analysen auch an Gewebe von Kolorektalkarzinomen durchgeführt. Unter Verwendung einer antikörperbasierten, immunhistochemischen Tripelfärbung konnten CD31-positive Blutgefäße, S100-positive Nerven und CK19-

positive Tumorzellen gleichzeitig dargestellt werden. Die Analysen ergaben interessanterweise, dass Pankreaskarzinome (PCA) und Kolorektalkarzinome (CRC) mit einem hohen Anteil vaskularisierter Gewebefläche gleichzeitig einen hohen Anteil innervierter Tumorfläche aufweisen (PCA: $p = 0,04$ und CRC: $p = 0,04$). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen Angiogenese und Neurogenese in Adenokarzinomen hin. Bemerkenswert war, dass Kolorektalkarzinome mit gering vaskularisierter Tumorfläche gleichzeitig ein großes Ausmaß neuraler Invasion aufweisen ($p = 0,046$). Umgekehrt weisen stark vaskularisierte Kolorektalkarzinome eine geringere Anzahl befallener Nerven auf. Dieser Befund unterstütze die initiale Hypothese, dass geringe Tumolvaskularisation zum vermehrten Befall von Nerven beitragen könnte. Beim Pankreaskarzinomen konnte durch die Tripel-Färbung zwar eine starke Tendenz einer positiven Korrelation zwischen innervierter Tumorfläche und neuraler Invasion festgestellt werden ($p = 0,059$), allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen Vaskularisation und neuraler Invasion ($p = 0,097$). Nach Unterteilung in Subgruppen mit hoher und niedriger Vaskularisation zeigte sich bezüglich der Häufigkeit neuraler Invasion eine homogene Verteilung. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass nicht die Tumolvaskularisation, als rein numerische Anzahl vorhandener Tumorgefäße, sondern die Gefäßdurchlässigkeit der entscheidende Einflussfaktor bei der pankreaskarzinomtypischen neuralen Invasion darstellen könnte. Dies gab Anlass die Struktur und Durchlässigkeit von Tumorgefäßen im humanen Pankreaskarzinom zu untersuchen.

1.6 Phänotypen von Perizyten

Vorrangig werden zwei Phänotypen von MMCs unterschieden: vascular smooth muscle cells (VSMC), die Gefäße mit großem Lumen, wie z.B. Arteriolen und Venolen umschließen, sowie „echte“ Perizyten, die sich an kleinlumigen Kapillaren befinden. Zwischen diesen Gefäßabschnitten befinden sich Übergangsformen von MMCs an präkapillären Arteriolen, sowie postkapillären Venolen. Man betrachtet MMCs als ein Kontinuum von morphologisch sehr unterschiedlichen Zellen entlang des Gefäßbaums. Zusätzlich erfüllen MMCs organabhängig sehr unterschiedliche, z.T. hoch spezialisierte Funktionen. Zur Übersicht werden MMCs in der vorliegenden Arbeit als Perizyten bezeichnet.

MMCs an Arteriolen und Präkapillären Arteriolen („Macro vessel“): An Arteriolen findet sich ein Phänotyp von MMCs, welcher sich ähnlich wie vascular smooth muscle cells (VSMCs) in einer kontinuierlichen, einfachen Schicht um die abluminale Seite des Endothels wickelt. MMCs weisen hier einen abgeflachten Zellkörper mit wenigen Zellausläufern auf. Sie exprimieren alpha smooth muscle actin (α SMA) als typischen Zellmarker. Intermediäre und Übergangsformen an präkapillären Arteriolen zeigen stark hervortretende Zellkörper mit abgrenzbaren Zellausläufern, die mehrere Endothelzellen bedecken (Joyce et al., 1985).

Primäre Perizyten an Kapillaren („Microvessels“): Primäre Perizyten an Kapillaren sind sternförmige Zellen mit einem runden Zellkörper, die lange zytoplasmatische Zellausläufer entlang der abluminalen Seite des Endothels ausstrecken. Diese Ausläufer verlaufen normalerweise über mehrere Endothelzellen und Gefäßverzweigungen hinweg. Sie exprimieren die Zellmarker NG2, CD146, PDGFR und sind nicht kontraktile. Ferner exprimieren sie kein α SMA (Holm et al., 2018).

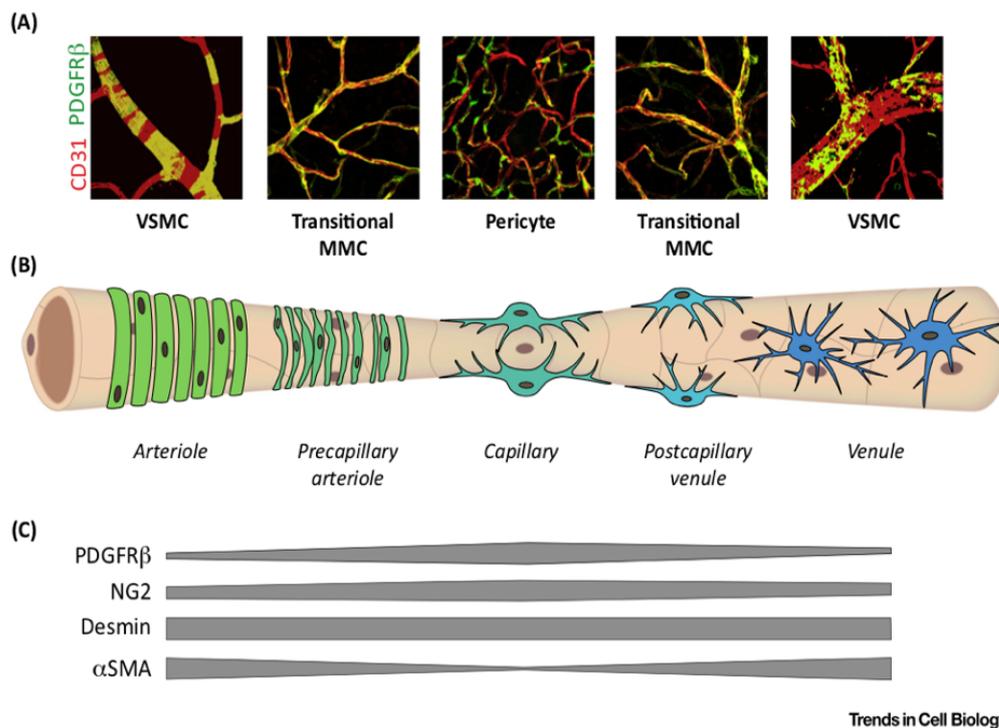


Abbildung 1. Phänotypen von Perizyten. Perizyten gehören einer heterogenen Gruppe von Zellen an, die zusammen als microvascular mural cells (MMCs) bezeichnet werden. Diese Abbildung wurde mit Erlaubnis des Urhebers gedruckt. A., Heumann, T., & Augustin, H. G. (2018). Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity. Trends Cell Biol, 28(4), 302-316. doi:10.1016/j.tcb.2017.12.002

Perizyten an postkapillären Venolen und Venen: Dieser Phänotyp zeigt einen abgeflachten, sternförmigen Zellkörper mit vielen schlanken, sich verzweigenden Zellfortsätzen. Mit steigendem venösem Gefäßdurchmesser erhöht sich die Anzahl der Zellausläufer und der Vernetzungen untereinander. Damit bilden Venolen-assoziierte Perizyten ein spinnennetzförmiges, ungeordnetes Geflecht, welches sich um das Endothel legt (Holm et al., 2018). Perizyten an Venolen exprimieren α SMA (Drenckhahn et al., 1993).

1.7 Vorkommen und Funktion von Perizyten

Perizyten finden sich ubiquitär an Gefäßen jeder Größe, welche sich in Arteriolen, präkapilläre Arteriolen, Kapillaren, postkapilläre Venolen und Venolen untergliedern. Eine Ausnahme bildet das retikuloendotheliale System der Milz, sowie das rote Knochenmark (Weibel, 1974). Lymphatische Gefäße sind in der Regel ebenfalls nicht von Perizyten umgeben (Marchetti et al., 1990). Der Begriff „Perizyten-Coverage“ beschreibt, wie ausgeprägt das Gefäßsystem eines Organs mit Perizyten besetzt ist (Birbrair, 2018). Der Perizyten-Coverage Index (kurz: Perizyten-Index) beschreibt das Verhältnis von Perizytenzellfläche zu Endothelzellfläche (Birbrair, 2018). Die Perizyten-Coverage unterscheidet sich sehr stark zwischen den Organen und auch innerhalb eines Organs zeigen Gefäßsysteme eine variierende Perizyten-dichte (Armulik et al., 2011). Zum Beispiel stellt das zentrale Nervensystem (ZNS), insbesondere das Gehirn und die Retina, einen Ort im menschlichen Organismus dar, der ein sehr hohes Perizytenvorkommen pro Gefäßfläche aufweist (Betsholtz et al., 2005). Das Verhältnis von Endothelzellen zu Perizyten wird hier mit 3:1 bzw. bis zu 1:1 angegeben (Mathiisen et al., 2010; Sims, 1986). Die hohe Perizyten-dichte im ZNS erklärt sich dadurch, dass Perizyten eine entscheidende Funktion und Beteiligung am Bau der Blut-Hirn-Schranke zugesprochen wird (Armulik et al., 2010; Bell et al., 2010). Zusammen mit Neuronen, Endothelzellen und Gliazellen bilden Perizyten die sogenannte „neuro-vascular unit“ und spielen eine wesentliche Rolle für die Pathogenese vieler neurologischer Erkrankungen (Sweeney et al., 2016). Beispielsweise führt eine Degeneration zerebraler Perizyten zum Erliegen der Blut-Hirn-Schranke mit konsekutivem Übertritt neurotoxischer Moleküle aus der Blutstrombahn (Bell et al., 2010). Ferner ist eine *loss-of-function* Mutation im PDGFR-Rezeptor-Gen in zerebralen Perizyten ursächlich für das Krankheitsbild des *Morbus Fahr* (ideopathische Kalzifikation der Basalganglien) (Keller et al., 2013; Nicolas et al.,

2013). Gehirne von *Alzheimer* Patienten weisen in postmortalen Gewebeuntersuchungen ebenso eine Degeneration von Perizyten auf (Halliday et al., 2016; Sengillo et al., 2013). Ein Organ mit geringem Perizyten-Vorkommen ist quergestreifte Muskulatur, mit einem Endothelzell- zu Perizyten-Verhältnis von 100:1 (Diaz-Flores et al., 2009; Shepro et al., 1993). Verallgemeinernd wird für humanes Gewebe angenommen, dass das Endothelzell zu Perizyten Verhältnis zwischen 1:1 und 1:100 variiert und der Perizyten-Coverage Index zwischen 10% und 70% liegen kann (Sims, 1986). Die Unterschiede in der Perizyten-Coverage der verschiedenen Organe erklären sich durch die organ-spezifischen Endotheleigenschaften und der organspezifischen Erneuerungsrate des Gefäßendothels (Diaz-Flores et al., 2009). Ein hoch konserviertes Endothel, mit niedriger *turn-over*-Rate, weist eine hohe Perizyten-Coverage auf (Diaz-Flores et al., 2009). Die niedrige Erneuerungsrate des Gefäßendothels ist ein Zeichen für einen Zustand der Ausdifferenzierung bei gleichzeitiger hoher funktioneller Spezialisierung (Beispiel: ZNS versus Muskel). Eine hohe Perizyten-Coverage erfüllt eine endothel- und gefäßstabilisierende Funktion (Diaz-Flores et al., 2009). Eine weitere Einflussgröße für das Ausmaß der Perizyten-Bedeckung ist der intravasale hydrostatische Druck. Gefäße der unteren Körperregion (besonders Venen) weisen eine höhere Perizytenbedeckung auf als solche in Regionen des Körpers, in denen ein niedriger hydrostatischer Druck herrscht. Zusammenfassend spielen Perizyten eine Rolle für die Regulation der Gefäßdurchlässigkeit, der Endothelzellproliferation und des Gefäßdurchmessers, da sie eine Gefäßkontraktion vermitteln können. Diese Funktionen werden insgesamt als mikrovaskuläre Endothel-Homöostase bezeichnet (Sims, 2000).

1.8 Pankreaskarzinom

Die Biologie des Pankreaskarzinoms ist durch zahlreiche adaptive Veränderungen des tumorumgebenden Stromas geprägt. Bis zu > 80% der Biomasse eines pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC) besteht nicht aus neoplastischen Karzinomzellen, sondern aus den verschiedenen Zellklassen und azellulären Komponenten, die zusammen das tumor microenvironment (TME) bilden (Mert Erkan et al., 2012). Der Untersuchung von den Wechselwirkungen zwischen Karzinomzellen und den zellulären Komponenten der Tumormikroumgebung haben sich in den vergangenen Jahren zahlreiche Studien gewidmet. Zunehmend setzt sich die Sicht durch, dass die Invasivität und Progression des Pankreaskarzinoms maßgeblich durch

die Zellen des TMEs beeinflusst wird (M. Erkan, C. Reiser-Erkan, et al., 2012; Ostman et al., 2013; Pietras et al., 2005; Zhan et al., 2017). Die entscheidenden zellulären Akteure im Tumormicroenvironment (TME) des Pankreaskarzinoms sind aktivierte Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen, Nervenzellen und Perizyten (Hanahan et al., 2011). Durch para- und autokrine Interaktion zwischen Tumor- und Stromazellen kommt es zu einer Aktivierung verschiedener extra- und intrazellulärer Signalkaskaden, zum Beispiel TGF α /SMAD, insulin-like growth factor 1, fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor (HGF/Met) und Sonic Hedgehog (Shh) (Mahadevan et al., 2007). Sie vermitteln eine Aktivierung der Fibroblasten, die im Pankreas als pankreatische Sternzellen (PSC) bezeichnet werden und ähnlich wie Perizyten mesenchymalen Zellursprungs sind (Apte et al., 1999; M. Erkan, G. Adler, et al., 2012; Nielsen et al., 2016). Durch Aktivierung produzieren PSCs erhebliche Mengen an kollagenreichem Bindegewebe und tragen auf diese Weise zu einem fibrotischen Gewebeumbau bei, der im Pankreaskarzinom als desmoplastische Reaktion bezeichnet wird (Apte et al., 1999; M. Erkan, G. Adler, et al., 2012; Nielsen et al., 2016). Die verschiedenen Signalwege greifen ineinander und prägen eine komplexe Interaktion zwischen den Tumor- und den Stromazellen, die zu einem unkontrollierten Wachstum der Karzinomzellen innerhalb ihrer Mikroumgebung führt. Weiterhin kommt es durch den fibrotischen Gewebeumbau des Tumorstromas zu einer Kompression intrapancreatischer Gefäße und einer Zunahme des interstitiellen Gewebedrucks. Die geringe Vaskularisation bei gleichzeitiger Gefäßkompression wird unter anderem als Ursache für das schlechte Ansprechen des Tumors auf eine Chemotherapie angesehen (Provenzano et al., 2012). Eine Depletion des Tumorstromas durch Inhibition des Sonic hedgehoge (Shh) Signalweges führte in Pankreaskarzinommodellen zu einer Reduktion der Tumorfibrose mit erhöhter Tumorgefäßdichte und konsekutiv verbesserter intratumoralen Durchblutung (Olive et al., 2009). Als Folge konnte eine verbesserte Aufnahme und Wirksamkeit von Chemotherapeutika erzielt werden. Diesen Beispielen stehen aktuelle Untersuchungen gegenüber, die über Inhibition des Shh-Liganden, ebenso einen anti-proliferativen und protektiven Effekt des Tumorstromas demonstrieren konnten (Ozdemir et al., 2014; Rhim et al., 2014). Die Inhibition des Shh-Liganden führte zu aggressiveren und undifferenzierten Tumoren mit erhöhter Vaskularität und Tumorproliferation (Rhim et al., 2014). Der Einfluss des TME auf die Tumorprogression wird aktuell als kontextabhängig und auch zeitabhängig bewertet (Ozdemir et al.,

2014). Die frühe desmoplastische Reaktion im Pankreaskarzinom wird als Bestrebung interpretiert, die de-differenzierten, neoplastischen Zellen von den gesunden Zellen zu isolieren. Im fortgeschrittenen Tumorstadium sind Tumorzellen in der Lage, gesunde Zellen des TME in tumorpermissive Zellen umzuprogrammieren (Kleeff et al., 2016). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse versucht man aktuell einen Tumorstroma-regulierenden Ansatz in der Pankreaskarzinomtherapie zu verfolgen (Sherman et al., 2014). Das Verständnis der Rolle jeder einzelnen Zellpopulation und auch der Rolle von Perizyten, innerhalb der Tumormikroumgebung kann hierzu einen Beitrag leisten.

1.9 Neuroplastizität im Pankreaskarzinom

Bei der Betrachtung der Interaktionen zwischen Tumorzellen und den Zellen des TME spielen beim Pankreaskarzinom auch Nerven eine entscheidende Rolle. Sie verlaufen im gesunden Pankreasgewebe als kleine Nervenfaserbündel innerhalb bindegewebiger Septen. Nerven unterliegen im Pankreaskarzinom erheblichen Veränderungen, zu den prominentesten zählen nervale Hypertrophie und eine erhöhte Nervendichte (erhöhte Anzahl an Nerven pro Gewebefläche) (Ceyhan, Demir, et al., 2009; Demir, Ceyhan, Rauch, et al., 2010). Insbesondere die erhöhte Nervendichte korreliert mit dem Ausmaß des charakteristischen neuropathischen Schmerzempfindens bei Pankreaskarzinompatienten (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009). Beide Phänomene (nervale Hypertrophie und erhöhte Nervendichte) werden unter dem Begriff der „Neuroplastizität“ zusammengefasst und sind vorwiegend mit dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas assoziiert und weniger ausgeprägt bei anderen malignen Erkrankungen des Pankreas zu finden (Ceyhan et al., 2009; Demir et al., 2010). Interessanterweise befinden sich die hypertroph veränderten Nerven nicht nur innerhalb der Haupttumormasse, sondern ebenso im tumor-umgebenden gesunden Gewebe (Ceyhan et al., 2009). Nervale Hypertrophie ist unabhängig von der Lokalisation des Tumors gleichmäßig im gesamten Organ ausgeprägt (Ceyhan et al., 2009). Spezielle Neuroplastizitätsassays dienen der *in vitro* Analyse dieser Phänomene und verwenden als Modell spinale Hinterhornganglien (Ganglion = Ansammlung von Zellkörpern), engl. dorsal root ganglia (DRG) von Mäuse- oder Rattenjungtieren. Die DRG werden in Neuroplastizitätsassays mit dem Zellüberstand oder direkt mit Pankreaskarzinomgewebe behandelt werden (Demir et al., 2010). Auf diese Weise ist es möglich den Einfluss von Karzinomzellen auf Neuritendichte, Neuritenverzweigung und die Perikaryongröße (Perikaryon = Zellkörper) der DRG-

Neurone zu untersuchen. So ist es gelungen neurotrophe Faktoren, die sich im Zellüberstand bzw. Pankreaskarzinomgewebe befinden, als Induktoren neuroplastischer Veränderungen zu identifizieren (Demir et al., 2010). Zu diesen neurotrophen Faktoren zählen der *glial-cell-derived neurotrophic factor* (GDNF), nerve growth factor (NGF), Artemin und neurale Chemokine (z.B. Fraktalkine) (Ceyhan et al., 2009). Die Expression von neurotrophen Faktoren im Gewebe von Pankreaskarzinompatienten korreliert mit dem Ausmaß neuroplastischer Veränderungen (Ceyhan et al., 2009). Insbesondere die nervale Hypertrophie ist von klinischer Relevanz, da sie ebenso eine Korrelation mit dem Ausmaß an neuropathischem Schmerzempfinden aufweist (Ceyhan et al., 2009). Die Gesamtheit der oben beschriebenen neuroplastischen Veränderungen (erhöhte Nervendichte und erhöhte Nervengröße) inklusive der pankreaskarzinomtypischen nervalen Invasion wird unter dem Überbegriff der pankreatischen Neuropathie zusammengefasst (Ceyhan, Demir, et al., 2009).

1.10 Molekularbiologie und Histopathologie des Pankreaskarzinoms

Unter den malignen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse macht das duktales Adenokarzinom, ausgehend von den Oberflächenzellen der Pankreasgänge, den Hauptteil (> 90%) unter den malignen Erkrankungen des Pankreas aus und wird oft als „not other specified“ (NOS) angegeben (Cubilla et al., 1978). Seltenerer histologische Subtypen umfassen das Mikroadenokarzinom, das muzinöse „kolloidale“ Adenokarzinom, das Azinuszellkarzinom sowie das adenosquamöse Karzinom (Cubilla et al., 1978). Ein wesentlicher Fortschritt im Verständnis der Biologie des Pankreaskarzinoms besteht in der Erkenntnis, dass dem invasiven Adenokarzinom histologische Vorläuferläsionen des Gangepithels vorausgehen (Basturk et al., 2015; Hruban, Iacobuzio-Donahue, et al., 2001). Diese mikroskopischen Vorläuferläsionen stellen intraepitheliale Neoplasien dar und werden als PanINs bezeichnet (Basturk et al., 2015; Klöppel, 1996). PanINs finden sich typischerweise in kleineren Seitengängen und zeigen einen schrittweise ansteigenden Grad dysplastischen Wachstums (Hruban, Adsay, et al., 2001). Sie unterteilen sich in I-III Grade mit einem steigenden Ausmaß chaotischer Epithelarchitektur, sowie Kernatypien. Letztlich kommt es zum Basalmembran-überschreitenden Wachstum und einen Übergang in ein invasives Karzinom. Zahlreiche molekulare Profiling-Studien haben nachgewiesen, dass eine PanIN-zu-Karzinom-Progression, wie bei vielen anderen Tumorentitäten, mit dem

sequenziellen Erwerb einer bestimmten Anzahl von charakteristischen Genmutationen verbunden ist (Hruban et al., 2000). Weitere histologische Strukturen mit malignem Potential sind makroskopische zystische Läsionen, wie die intraduktale papilläre muzinäre Neoplasie (IPNM) und die muzinäre zystische Neoplasie (Hezel et al., 2006; Tanaka, 2014). Ausführliche Genomsequenzierungen von Pankreastumoren haben eine Reihe von diesen Schlüsselmutationen in Protoonko- und Tumorsuppressorgenen identifiziert, die sich mit fast 90% Penetranz in fast allen Tumoren wiederfinden. Zu diesen zählen Mutationen im KRAS-Gen, TP53, CDKN2A, SMAD4, sowie TGF β -Signaling-Anomalien (Bailey et al., 2016; Collisson et al., 2019; Moffitt et al., 2015). Die Mutation, welche den molekularen Phänotyp des Pankreaskarzinoms am stärksten dominiert, ist eine Aktivierung des KRAS Onkogens (Mueller et al., 2018). Sie findet sich in >90% aller Pankreaskarzinome (Chang et al., 2014). Inaktivierende Mutationen in TP53, CDKN2A und SMAD4 finden sich in 50-80% der Pankreaskarzinomgenome und Mutationen in ARID1A, MLL3, und TGFBR2 sind in circa 10% der Tumorgenome verändert (Chang et al., 2014). Ein weiterer entscheidender Fortschritt im Verständnis des Pankreaskarzinom bestand in der Charakterisierung von molekularen Subtypen basierend auf der unterschiedlichen Genexpression in Pankreaskarzinomen. Durch RNA-Sequenzierung des Genmaterial von über 25.000 Patienten und den Zusammenschluss zu kooperativen Netzwerken wie dem *International Cancer Genome Consortium (ICGC)* und dem *Cancer Genome Atlas (TCGA)* gelang es eine neue Taxonomie für duktale Pankreastumore aufzustellen, die Tumore anhand ihrer unterschiedlichen Genexpressions-Profile in zwei Hauptgruppen einteilt („basal-like“ und „classical“) (Collisson et al., 2011; Hudson et al., 2010; Moffitt et al., 2015). Die zwei Hauptgruppen sind unabhängige Prädiktoren für das Gesamtüberleben und haben Bedeutung für das therapeutische Management, da sie ein Ansprechen auf bestimmte Chemotherapie Regime vorhersagen (Rashid et al., 2020). Zahlreiche weitere klinische Studien laufen derzeit, um auf dieser Basis eine zielgerichtete und individuelle Therapie für Pankreaskarzinompatientin zu ermöglichen (Connor et al., 2022).

1.11 KPC Mausmodell

Wie oben bereits beschrieben, ist die Aktivierung des KRAS Protoonko-Gens das Schlüsselevent bei der Genese des Pankreaskarzinoms und wird in >90% der PDACs gefunden (Hruban et al., 2000). Aktuelle Generationen von

Pankreaskarzinommausmodellen basieren auf dem Prinzip ein mutiertes KRAS-Allel (KRAS^{G12D}) in murine Pankreasvorläuferzellen einzubringen (Hingorani et al., 2003). Dadurch kommt es zur Entstehung der klassischen präneoplastischen Läsionen (PanINs) und bei gleichzeitigem Ausschalten von Tumorsuppressorgenen zum Übertritt in ein invasives PDAC (Guerra et al., 2013). Um die Expression des mutierten KRAS Gens auf pankreatische Zellen zu beschränken, war die Kenntnis von pankreasspezifischen Transkriptionsfaktoren entscheidend. Die Transkriptionsfaktoren PDX-1 und p48 werden circa am 8. Entwicklungstag in Mausembryonen exprimiert und regulieren, dass Zellen des Endoderms zu pankreatischen Zellen differenzieren (Kawaguchi et al., 2002). Für die Entwicklung der Mausmodelle wurde das KRAS-Gen durch eine G → A Punktmutation am Codon 12 verändert (Kras^{G12D}). Diese Mutation wird oft in humanen PDACs beobachtet und bewirkt einen Aminosäureaustausch, sodass das exprimierte Protein intrinsisch aktiviert ist und es zu einer permanenten Downstream-Aktivierung der Effektor-Proteine (z.B. ERK und c-myc) kommt, die Zellteilung steigern (Guerra et al., 2013; Hingorani et al., 2003). Zusätzlich wurde dem mutierten KRAS-Allel ein loxP-markiertes STOP Codon vorgeschaltet. Das STOP Codon bewirkt, dass der Transkriptions-/Translationsvorgang zunächst abgebrochen wird und die Expression des mutierten KRAS unterdrückt („silenced“) ist. Parallel wurde eine zweite Mauslinie etabliert, welche die Rekombinase, Cre exprimiert. LoxP-Markierungen stellen Bindungsstellen für Cre (cyclic recombinase) dar, welche in der Lage ist, Sequenzen zwischen den beiden loxP Markierungen auszuschneiden (Cre-Lox Rekombination = sequenzspezifische Rekombination). Sobald die Kreuzung von Mäusen mit „gesilencetem“ Kras^{G12D} stattfindet, bindet Cre an die Upstream-gelegene loxP Markierung und schneidet das flankierte STOP-Codon aus, sodass Kras^{G12D} exprimiert wird. Die Mauslinie wurde so designed, dass Cre unter Kontrolle der pankreasspezifischen Promotoren PDX-1 oder p48 exprimiert wird und es nur in pankreatischen Zellen zu einem Ausschneiden des STOP-Codons und folglich einer Expression des mutierten KRAS kommt. In späteren GEMM-Generationen wurden zusätzlich Tumorsuppressorgene genetisch ausgeschaltet (z.B. p53 knock-out oder p53 Mutation). Zusammenfassend zeichnet sich das KPC Mausmodell durch eine pankreasgewebe-spezifische (Ptf1a/p48-Cre) Expression von mutiertem K-ras (K-ras^{G12D}) sowie einem p53-knock-out bzw. p53 Mutation (p53^{flox/+} bzw. p53^{flox/flox} bzw. p53^{R172H}) aus. Die genannten Mutationen sind namensgebend für das Akronym „KC“

bzw. „KPC“. KPC-Mäuse mit diesem Genotyp entwickeln innerhalb von 5-10 Wochen die klassischen, PanINs und mit circa 10 – 20 Wochen invasive Pankreastumore (Hingorani et al., 2003; Hingorani et al., 2005). Das mediane Überleben dieser Tiere ist mit 5,5 Monaten signifikant verkürzt. 80% der KPC Mäuse entwickeln Metastasen in Leber, Lunge und Peritoneum (Hingorani et al., 2003; Hingorani et al., 2005).

2 Zentrale Fragestellung

Im Pankreaskarzinom kommt es neben hämatogener Metastasierung besonders häufig zu einer Invasion von intrapankreatischen Nerven durch Karzinomzellen. Voruntersuchungen humaner Pankreastumore zeigten, dass der Anteil der vaskularisierten Tumorfläche mit dem Anteil der innervierten Gewebefläche korreliert und deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Tumorangiogenese und Neurogenese hin (Kröger et al., unpublished). Vor diesem Hintergrund stellten wir die Hypothese auf, dass eine herabgesetzte Tumorgefäßdurchlässigkeit zu der pankreaskarzinomtypischen Neuroinvasivität beitragen könnte. Perizyten sind periendotheliale Zellen und entscheidend an der Regulation der Gefäßdurchlässigkeit, der Entstehung neuer Blutgefäße, sowie der Endothelzellhomöostase beteiligt (Armulik et al.). Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit Perizyten im Kontext neuraler Invasion. Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit lauteten:

- a.) Wie ist das Perizyten-Vorkommen an Tumorgefäßen im humanen Pankreaskarzinom und im Vergleich dazu in normalen Pankreasgewebe?
- b.) Besteht ein Zusammenhang zwischen neuraler Invasion und dem Perizyten-Vorkommen im PDAC? Besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Nerven und dem Perizyten-Vorkommen im PDAC?
- c.) Wie verhalten sich Perizyten im Laufe der Tumorprogression im Pankreaskarzinom-Mausmodell (KPC Mausmodell)?
- d.) Welchen Einfluss haben Pankreaskarzinomzellen auf Perizyten *in vitro* und welchen Einfluss haben aktivierte Neurone auf Perizyten *in vitro*?
- e.) Welche Gene werden in aktivierten Perizyten verändert exprimiert?

Um diese Fragestellungen zu beantworten, haben wir Tumorgefäße in humanem Pankreaskarzinomgewebe mithilfe ausgedehnter Immunfärbemethoden untersucht und auf das Vorhandensein von Perizyten analysiert, mit dem Ziel einen Perizyten-Coverage-Index zu erheben. Im KPC-Modell, haben wir den Perizyten-Coverage-Index zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression untersucht. Außerdem haben wir ein 3D Ko-Kultursystem entwickelt, um den Einfluss von Pankreaskarzinomzellen und aktivierten Neuronen auf Perizyten *in vitro* zu untersuchen. Auf molekularer Ebene haben wir Transkriptomanalysen von tumorzellstimulierten Perizyten durchgeführt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Materialien für Immunfluoreszenz

Geräte

Entwässerungsmaschine	Gewebeinfiltrationsautomat, Leica (Nussloch, GER)
Microtom	Leica JUNG RM2055 (Nussloch, GER)
Paraffineinbettautomat	EG 1160, Leica (Nussloch, GER)

Verbrauchsmaterialien

Dako Pen	Dako (Hamburg, GER)
Normal Goat serum 10 %	Invitrogen (Darmstadt, GER)
Roticlear	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
Triton X	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
Zitronensäure Monohydrat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺	Biochrom GmbH (Berlin, GER)
Mounting Medium	DAKO Fluorescence Mounting Medium, DAKO (Hamburg, GER)
DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochlorid), (D1306)	Invitrogen, Thermo Fischer, GER

Ansätze

10x Tris Buffered Saline (10x TBS)	
Tris base	24.2 g
NaCl	85 g
Aqua dest.	800 mL
pH auf 7,4 adjustieren	5 M HCl
Konstantes Volumen mit Aqua dest.	1000 mL

20x Zitratpuffer	
Zitronensäure Monohydrat	21 g
Aqua dest.	300 mL

pH auf 6,0 adjustieren	5 M NaOH
Konstantes Volumen mit Aqua dest.	500 mL

Waschpuffer (1x TBST)	
10x TBS	100 mL
Tween 20	1 mL
Konstantes Volumen mit Aqua dest.	1000 mL

Waschpuffer (1x PBST)	
PBS	9,55 mg
Tween 20	1 mL
Konstantes Volumen mit Aqua dest.	1000 mL

Antikörper

Antikörper	Spezies Host	Typ	Verd.	Firma
Anti-CD 31	Maus	monoklonal, IgG	1:100	DAKO, Hamburg, GER
Anti-CD 31	Kaninchen	polyklonal, IgG	1:400	Abcam, Cambridge, USA
Anti-CD146	Kaninchen	polyklonal, IgG	1:100	Sigma, Taufkirchen GER
Anti- α SMA	Maus	monoklonal, IgG	1:500	DAKO, Hamburg, GER
Anti-NG2	Kaninchen	polyklonal, IgG	1:100	Sigma, Taufkirchen, GER
Anti-ki 67	Kaninchen	polyklonal, IgG	1:100	Abcam, Cambridge, USA
Anti- β -III tubulin	Maus	polyklonal, IgG	1:200	Abcam, Cambridge, USA
Alexa-Fluor® 594 Antikörper Anti-rabbit	Ziege	polyklonal, IgG	1:400	Invitrogen, Darmstadt, GER
Alexa-Fluor® 488 Antikörper Anti-mouse	Ziege	polyklonal, IgG	1:400	Invitrogen, Darmstadt, GER
Alexa-Fluor® 594 Antikörper Anti-mouse	Ziege	polyklonal, IgG	1:400	Invitrogen, Darmstadt, GER
Alexa-Fluor® 488 Antikörper Anti-rabbit	Ziege	polyklonal, IgG	1:400	Invitrogen, Darmstadt, GER

3.1.2 Materialien für Zellkultur

Geräte

Sterile Werkbank	Safe 2020 Biologische Sicherheitsbank, Thermo Fischer (Dreieich, GER)
Zentrifuge 1	Centrifuge, 5810 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
Zentrifuge 2	Centrifuge, 5415 R, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, GER)
Inkubator	Galaxy 170S, New Brunswick an Eppendorf company (Wessling-Berzdorf, GER)
Wasserbad	Aqualine AL 18, Lauda (Lauda, Königshofen, GER)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior (Lauda, Königshofen, GER)

Verbrauchsmaterialien

24 well Platten	Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
6 well Platten	Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
BCA Protein Assay	Pierce BSA Protein Assay Kit, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
Coverslips	Runde Deckgläser, Stärke 1, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
Cryo-Tube	Nunc (Roskilde, DK)
Objekträger	Thermo Scientific (Dreieich, GER)
Parafilm	Pechiney, Plastic Packing (chicago, USA)
Pipetten in ml	Greiner, Frickenhausen, GER
Pipettenspitzen	Star Lab, Ahrenburg, GER
PP-Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner (Frickenhausen, GER)
Zellkulturflaschen	Cellstar, 75 cm ² , Greiner Bio One (Frickenhausen, GER)
Zellschaber	Cell Lifter, Costar (Carlsbad, USA)
Trypan Blue Stain 0,4%,	Invitrogen (Darmstadt, GER)

Zellen

Humane Perizyten	Humane brain derived vascular pericytes (HBVP) > 5x10 ⁵ Zellen, 1 ml/vial, Cat. No. 1200; Lot. No. 17597,
------------------	--

	P0, cryopreserved on 10/3/15, storage at -196 °C, ScienCell (Carlsbad, USA)
SU86.86	Humane PDAC-Zelllinie, erworben von American Type Culture Collection/ATCC und gemäß den Herstellerangaben kultiviert
T3M4	Humane PDAC-Zelllinie, freundlicherweise von Prof. R.S. Metzgar (Durham, North Carolina) zur Verfügung gestellt

Medien und Lösungen

RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria)
Pericyte Medium (PM)	ScienCell, (California, USA)
PBS	PAA Laboratories GmbH (Pasching Austria)
Fetal bovine serum (FCS)	Sigma Life Science (St. Louis, USA)
Penicilline und Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria)
0,25% Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen (Paisley, USA)
Poly-D-Lysine Hydrobromid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, GER)
Aqua	Braun (Melsung, GER)
DMSO	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, GER)

Ansätze

RPMI	10% FCS 1% Penicillin und Streptomycin
Pericyte Medium (PM)	500 ml PM 10 ml FCS 5 ml Pericyte growth supplements (PGS) 5 ml Penicillin und Streptomycin
Poly-D-Lysin 0,1 mg/dl	1,5 ml Poly-D-Lysin 8,5 ml steriles H ₂ O
Färbelösung	50% Zellsuspension 50% Trypan Blau stain solution
Einfriermedium	70% PM 20% FCS 10% DMSO

3.1.3 Materialien für Spinalganglienpräparation

Geräte

Semi-sterile Werkbank	Hera Guard, Thermo Science (Bonn, GER)
OP-Mikroskop	SMZ 1500 Nikon (Düsseldorf, GER)

OP-Lampe	KL 1500 LCD Zeiss (Jena, GER)
Präparationsbesteck	Dumont (Inox, CH)

Verbrauchsmaterialien

Petrischale 100x20 mm	Greiner (Frickenhauswn, GER)
Petrischale 60x15mm	BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
Spritze	Injekt, Baun (Melsung, GER)
Syringe filter	Nalgene (Rochester, USA)
Einmal-Injektions-Kanülen	Sterican, Braun (Melsungen, GER)

Medien und Lösungen

Minimal Essential Medium (MEM)	Promo Cell (Heidelberg, GER)
Hank's BSS (HBSS)	Promo Cell (Heidelberg, GER)
Metronidazol	Merck Pharma (Darmstadt, GER)
Kollagenase Typ 2	Worthington, Lakewood (New Jersey, USA)
Neurobasal Medium	Gibco, Invitrogen, Thermo Scientific (Dreieich, GER)
B-27 (NB Supplement)	Invitogen, Gibco, (Paisley, USA)
L-Glutamine (NB Supplement)	Invitrogen, Gibco (Paisley, USA)
ECM Gel	Sigma Aldrich (Taufkirchen, GER)

Ansätze

MEM	20mg/500ml Gentamicin 2,5mg/500ml Metronidazol
HBSS	20mg/500ml Gentamicin 2,5mg/500ml Metronidazol
Kollagenase 1%	100mg Kollagenase Typ 2 10 ml Bidest sterile Filtration durch 0,2 Nalgene Filter
Neurobasal Medium	1% Penicillin/Streptomycin 2% B 27 0,5 mM L-Glutamine

3.1.4 Materialien für RNA Isolation

Verbrauchsmaterialien

qRT-PCR Abklebefolie	Adhäs. PCR Folie, Sarstedt (Nürnberg, GER)
----------------------	--

qRT-PCR Platten	LightCycler 480 Multiwell Plate 96, Roche (Basel, CH)
cDNA Kit	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (Californien, USA)
RNase	Treatment of RNA Samples prior to RT-PCR Kit, Promega (Madison USA)
Mastermix	LightCycler 480 SYBR Green I Mastermix, Roche (Basel, CH)
RNA Micro Kit	Qiagen (Hilden, GER)
RNAeasy Kit	Qiagen (Hilden, GER)

3.1.5 Software

ImageJ	National Institutes of Health, USA, version 1.51s
Keyence Analyser	BZ, H1AE (Neu-Isenburg, GER)
AxioVision	V 4.8.2.0, Göttingen, GER
Office 2019	(Word, Excel) Microsoft for Mac 2019, Version 16.28
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, CA, USA
LightCycler® 480 Software	Version 1.44 Roche, Version 1.5, Basel, CH

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkohorte

Die Patientenkohorte für die Immunhistologischen Untersuchungen umfasste n=55 Patienten mit der Diagnose eines PDACs. Die histologische Begutachtung des Patientengewebes erfolgte gemäß der TNM Klassifikation von 2016 (Wittekind, 2016). Unter den Patienten befanden sich 54,5% Männer und 45,5% Frauen. Das Mediane Alter betrug bei den Männern 67 Jahre und bei den Frauen 70,2 Jahre. Bei 76% der Patientenkohorte lag nach TNM Klassifikation ein Stadium T3 vor und bei circa 49% der Gewebe zeigte sich ein G3 Stadium. Nachdem sämtliche Patientenpräparate immunhistologisch gefärbt wurden, erfolgte eine Begutachtung der Färbung hinsichtlich Qualität und Spezifität. Hierbei mussten 16 Patienten aus der Kohorte ausgeschlossen werden, sodass sich eine Endzahl von n=39 Patienten ergab. Außerdem musste ein Patient aufgrund der Fehldiagnose, Nierentumormetastase, aus

der Kohorte ausgeschlossen werden. Daneben etablierten wir eine Vergleichskohorte, die als Kontrolle diente. Die Kontrollkohorte umfasste normales Pankreasgewebe von Organspendern, die aufgrund von anderen Diagnosen einer Pankreatektomie unterzogen wurden. Diese Vergleichsgruppe setzte sich aus n= 16 Patienten zusammen, wobei eine Probe ausgeschlossen werden musste, sodass sich eine Kohorte von n=15 Proben ergab.

Das Ethikvotum der Technischen Universität München zur Verwendung humaner Gewebeproben liegt unter der Nummer 548/16s vor.

3.2.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Aufbereitung des Gewebes:

Für die histologischen Untersuchungen wurde das Pankreasgewebe nach der operativen Entnahme für 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd (PFA) gelagert. Nach der Fixation erfolgte eine 24-stündige Aufbereitung in PBS, woran sich die Entwässerung mittels eines Gewebeeinfiltrationsautomaten (Entwässerungsgerät) anschloss. Danach wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden nach entsprechender Abkühlzeit in 3 µm dicke, konsekutive Gewebeschnitte geschnitten. Eine 24-stündige Inkubation bei 37°C gewährleistete eine luftblasenfreie Fixation auf Glasobjektträgern. Vor jeder immunhistologischen Färbung erfolgte zunächst eine Deparaffinisierung mittels 3x10 minütigen Roticlear Bädern. Die Rehydratisierung des Gewebes wurde durch eine aufsteigende alkoholische Bäderserie gewährleistet. Danach wurden die Schnitte stets in stabilisierender Pufferlösung, PBST, gelagert. Nach der Gewebefärbung wurden die Gewebeschnitte mit einem dafür vorgesehen Fluoreszenz-Medium luftblasenfrei eingedeckelt und bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Durchführung:

Zur Antigen-Demaskierung erfolgte eine Behandlung mit Citratpuffer, wobei die Präparate für die Dauer von 10 Minuten in siedendem Citratpuffer gehalten wurden. Nach einer Abkühlungszeit von circa 20 Minuten, und gründlichen Waschungen mit PBST, nahmen wir eine Permeabilisierung mit Triton X (0,5% in PBS) vor. Die Blockierung von unspezifischen Antigenbindungen wurde durch eine einstündige Inkubation mit 10% Ziegenserum gewährleistet. Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 4°C mit einer Suspension aus den beiden primären Antikörpern

inkubiert. Hieran schlossen sich wiederum mehrfache Waschvorgänge mit PBST an. Der sekundär Antikörper gewährleistet durch das fluoreszierende Konjugat, Alexa Fluor TM, den spezifischen Nachweis gegen jenes Antigen, welches zuvor mittels des primären Antikörpers markiert wurde. Mit der Zugabe von DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), eines Farbstoffes, der die Markierung von DNA erlaubt, war eine Sichtbarmachung der Zellkerne in der Fluoreszenzmikroskopie zu erwarten. Wir wählten zur Kombination mit dem CD31-Antikörper einen Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher Wellenlängen des Spektrums 590 nm absorbiert und Licht der Wellenlänge 617nm emittiert. Somit war in der Fluoreszenzmikroskopie mit einer Rotfärbung der Gefäßendothelien zu rechnen. Ähnlich verfahren wir mit den gegen Perizyten gerichteten Antikörpern, α SMA, CD146 und NG2. Hierfür wählten wir einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher das Spektrum von 495 nm absorbiert und 519 nm emittiert. Unter Anregung durch Licht der entsprechenden Wellenlänge, erscheinen die Perizyten in der mikroskopischen Betrachtung grün.

Auswertungsparameter:

Das digitale Fotografieren des gesamten Objektträgers ermöglichte es uns, den vollständigen Gewebeschnitt auf das Vorhandensein von Perizyten zu untersuchen. Eine 100-fache Vergrößerung wurde standardmäßig gewählt. Anschließend wurden die Fotos in das betriebseigene Analyseprogramm des Mikroskops exportiert. Die Maßeinheit konnte demnach direkt übernommen werden. Ein vom Hersteller bereitgestelltes Analysetool, „Hybrid cell count“, Keyence Analyser, BZ, H1AE (Neu-Isenburg, GER) ist eigens für eine Kolokalisations-Auswertung konzipiert. Mithilfe dieses Programms, konnte zunächst ein colour-threshold für die Farbe Rot gewählt werden. Auf diese Weise konnten alle Gefäß-assoziierten Gewebereiche vorausgewählt werden. Die Kopplung des CD31-Antikörpers mit dem Fluoreszenzkonjugat, Alexa Fluor 594, erlaubte dem Mikroskop eine Visualisierung jener Bereiche durch ein rotes Signal. Dieser Bereich stellt die sog. „vascularized area“ dar. Perizyten liegen abluminal des Gefäßendothels. Aus diesem Grund wurde die „vascularized area“ auf das zweifache expandiert, um so die Lage der Perizyten, distal der Gefäßwand zu erfassen. Mit dem Festlegen eines zweiten „colour-thresholds“ für die Farbe Grün, wurde die zuvor definierte „vascularized area“ auf das Vorhandensein von Perizyten, sprich eines grünen Signals untersucht. Analog des ersten Antikörpers kombinierten wir auch den Perizytenmarker, CD 146, mit einem Fluoreszenzkonjugat.

Dessen Eigenschaft, Licht der Wellenlänge 519 nm zu emittieren, visualisiert das Fluoreszenzmikroskop durch eine Grünfärbung aller Perizyten.

3.2.3 Zellbiologische Untersuchungen

Zellkultivierung von Perizyten:

Humane Perizyten bestellten wir von der Firma Sciencell (Carlsbad, CA, USA). Dem Hersteller zufolge wurden die Zellen aus humanem Gehirn isoliert, in Passage 1 nach der Isolation kryokonserviert und als gefrorenes Präparat geliefert. Die einzelne Ampulle enthielt nach Angaben des Herstellers $>5 \times 10^5$ Perizyten in einem Volumen eines Milliliters. Eine Negativität gegenüber HIV-1, HBV, HCV, Mycoplasmen, Bakterien, Hefen und Pilzen konnte durch den Hersteller garantiert werden. Außerdem garantierte der Hersteller eine Intaktheit der Zellen über 15 Passagen hinweg. Bei der Zellkultivierung von Perizyten ist es entscheidend eine Poly-D-Lysin Beschichtung der Zellkulturflasche vorzunehmen. Dies gewährleistet optimales Anhaften der Perizyten. Nach den Empfehlungen des Herstellers verwendeten wir $2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Poly-D-Lysin pro T-75 Flask. Nachdem die Zellkulturflaschen über Nacht (oder wenigsten für eine Stunde) bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert wurden, spülten wir diese zwei Mal mit sterilem Wasser und befüllten sie mit supplementiertem Perizyten-Medium, welches neben Penicillin/Streptomycin und FCS, auch Pericyte growth supplement enthält. Die Kultivierung der Perizyten erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C , 95% Luftfeuchtigkeit, angereichert mit 5% CO_2 . Nach dem Etablieren einer Zellkultur wurde das Perizyten Medium (PM) jeden zweiten Tag, bzw. nach dem Erreichen von $> 50\%$ Konfluenz jeden Tag gewechselt. Bei einer Konfluenz von 90% subkultivierten wir die Zellen. Hierzu wurden diese zweimalig mit PBS gewaschen, um verbliebenes FCS auszuspülen. Mittels Trypsin-EDTA konnte eine enzymatische Trennung der Zell-Matrix-verbindungen und ein Ablösen der Zellen von der Kulturunterlage erreicht werden. Nach 5-minütiger Einwirkzeit wurde die enzymatische Reaktion mit 10% Serumzusatz enthaltendem PM abgestoppt. Die Zellen wurden in ein Falcon-tube überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert, in 10 – 15 ml frischem Medium resuspendiert und in eine frische, Poly-D-Lysin beschichtete Flasche ausgesät. Die Aussaat der Zellen zur Subkultivierung erfolgte dabei wie vom Hersteller empfohlen in einer Dichte von 5000 Zellen/ cm^2 .

Kultivierung von Tumorzelllinien:

Für die Versuche kultivierten wir außerdem die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie SU.86.86. Diese erwarben wir von der Firma ATCC (Manassas, VA, USA). Nach Angaben des Herstellers wurde diese Zelllinie aus einer pankreatischen Lebermetastase isoliert und immortalisiert. Es handelt sich um epitheliale, adhärenente Zellen eines duktales Adenokarzinoms. Die Patientin war 57 Jahre alt und kaukasischer Herkunft. Wir kultivierten die Zelllinie in 75cm² Flaschen in RPMI-1640 Medium mit 10% Serumzusatz. Die Subkultivierung erfolgte in 1:2 bzw. 1:3 Verdünnung. Mediumwechsel erfolgte 2-3 mal pro Woche. Darüber hinaus züchteten wir Zellen der Linie T3M4. Diese stammen aus Isolaten einer Lymphknotenmetastase eines PDAC eines 64 Jahre alten Mannes.

Zellzahlbestimmung:

Die Zellzahlbestimmung erfolgte anhand eines Hämozytometers. Hierfür fertigten wir eine 1:1 Verdünnung der zu untersuchenden Zellsuspension und des Zellfarbstoffes Trypanblau an. Diese Suspension wurde dann in die Zählkammer, vom Typ Neubauer, überführt. Mit der folgenden Formel konnte die Konzentration der Zellen pro Milliliter berechnet werden: $(Y / 4) \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen ml}^{-1}$, Y = Summe der Zellen in allen 4 Quadraten

3.2.4 Proliferation-Assays

Einfluss von Pankreaskarzinomzelllinien auf Perizyten

Bei einer Konfluenz von circa 80% wurden Perizyten der Passagen 2-4 aus den Zellkulturflaschen entnommen. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, gezählt und in einer Konzentration von 5000 Zellen/Well in einer 24 Well Platte ausgesät. Die 24-Well Platte wurde zuvor mit Coverslips (runde Glasobjektträger) bestückt, welche mit Poly-D-Lysin beschichtet wurden. Damit die Zellen optimal anhaften wurde zunächst eine 24 stündige Inkubation in FCS-haltigem PM im Inkubator bei 37°C in 95% Luftfeuchtigkeit mit 5% CO₂ Sättigung eingehalten. Nach dieser „recovery“ Zeit erfolgte die eine 24 stündige Stimulation mit dem Überstand folgender PCC-Linien: a) SU86.86 und b) T3M4. Der Überstand dieser PCC-Linien wurde in der unten beschriebenen Weise gewonnen und in einer Zielkonzentration von 100µg/ml in serumfreien PM suspendiert und auf die Perizyten transferiert. Das Zielvolumen von insgesamt 500µl setzte sich aus den folgenden

Komponenten zusammen: PCC-Überstand: a) SU86.86 bzw. b) T3M4 auf 100µl und Perizytenmedium ohne FCS auf 400µl. Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden. Parallel dazu wurden die PCC-Linien SU86.86 und T3M4 ebenfalls in der 24 well Platte ausgesät. Tumorzelllinien erhielten den Zellüberstand von Perizyten, welcher auf die gleiche Weise gewonnen wurde und in der gleichen Zielkonzentration auf PCC-Linien transferiert wurde. Es ergab sich folgendes Pipettierschema:

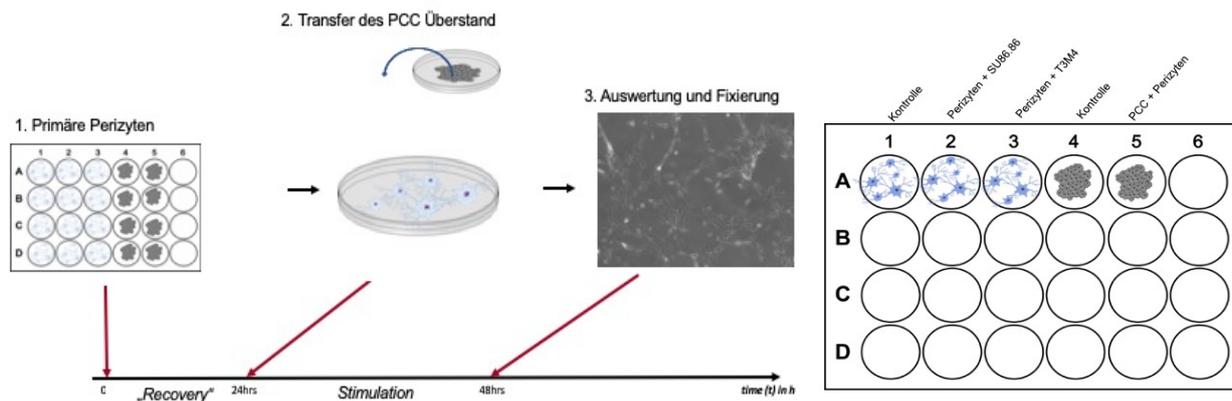


Abbildung 2. Versuchsaufbau des Proliferations-Assays mit dazugehörigem Pipettierschema. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 48 Stunden.

Gewinnung von Pankreaskarzinomzellüberständen

Für den Proliferations-Assay und die RNA-Extraktion verwendeten wir zur Stimulation von Perizyten die Überstände von den folgenden Pankreaskarzinomzelllinien (PCC-Linien) SU86.86 und T3M4. Die genannten PCC-Linien wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% gezüchtet. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsdynamik wurde zunächst das serumhaltige Medium unter sterilen Bedingungen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5ml PBS gewaschen, um die verbleibenden Serumzusätze herauszulösen. Anschließend wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgestellt und für 24h unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Das Medium mit den von den PCC-Linien abgesonderten Wachstumsfaktoren wurde nach 24h entnommen und in ein Falcontube überführt. Die Proben wurden bei 1500 rpm für 5 Minuten bei 5°C zentrifugiert, in ein frisches Falcontube überführt und bei -80°C eingefroren. Zum Zwecke späterer Proteinkonzentrationsbestimmung wurde aus jedem PCC-Überstand eine 500 µl Probe entnommen und auf Eis gelagert.

Auswertung des Proliferation Assays

Nach Beendigung der 24-stündigen Stimulation wurde das Medium vorsichtig aspiriert und die Zellen in den 24well Platten mit je 500 µl PBS gewaschen. Zur Fixation auf den Coverslips wurden sie mit 4% Formaldehyd-Lösung in PBS für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Danach luxierten wir die Coverslips vorsichtig mittels Pinzetten aus den 24welll Platten und platzierten diese auf einen planen Objektträger, welcher mit einem Paraffinfilm beschichtet ist. Die Zellen wurden dann zur Permeabilisierung mit 0,5% TritonX in PBS für 5 Minuten inkubiert, worauf ein weiterer 5-minütiger Waschvorgang in PBS folgte. Hieran schloss sich eine einstündige Inkubation mit 10% Ziegenerum an. Der Primärantikörper, ki67, zur Zellfärbung wurde in einer Verdünnung von 1:200 in PBS suspendiert und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer auf den Zellen belassen. Am darauffolgenden Morgen wurden die Zellen dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Für eine Stunde wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit dem fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper, Alexa Fluor 594, inkubiert, welcher rotes Licht emittiert. Nach Beendigung der Inkubationszeiten wurden die Zellen wiederum dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Abschließend wurden die einzelnen Coverslips, mit den darauf befindlichen Zellen, mittels DAKO Fluorescence Mounting Media auf einem klassischen Glasobjektträger eingedeckelt. Die Zellen wurden bei 4°C kühl und lichtgeschützt gelagert. Die Auszählung der Zellen und Ermittlung des Proliferationsquotienten erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Keyence BZ 9000. Durch die zuvor vorgenommen Immunofluoreszenzfärbung war es möglich die proliferierenden Zellen anhand der Antikörpermarkierung zu detektieren. Wir fertigten vom gesamten Objektträger eine zusammengesetzte Übersichtsaufnahme an und importierten das Foto in das Bildbearbeitungsprogramm, ImageJ (imageJ 1,51t31 Wayne Rasband). Da proliferierende Zellen durch den Zellkernmarker, ki67, markiert wurden und dieser wiederum mit einem rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper gekoppelt wurde, konnten wir die proliferierenden Zellen durch einen entsprechenden „colour-threshold“ extrahieren. Alle übrigen Zellkerne wurden durch den interkalierenden Farbstoff, DAPI, markiert. Der Proliferationsindex ergab sich demnach aus dem Quotienten der pinken und der blauen „counts“.

3.2.5 Einfluss aktivierter DRG-Neurone auf Perizyten

Die Verwendung muriner Gewebe wurde durch den Zuchtantrag Nummer 55.2-1-54-2532-2015 genehmigt. Dorsal root ganglia (DRG) wurden aus 10-14 Tage alten genetisch nicht belasteten Mäusen isoliert. Die Tiere wurden artgerecht anästhesiert

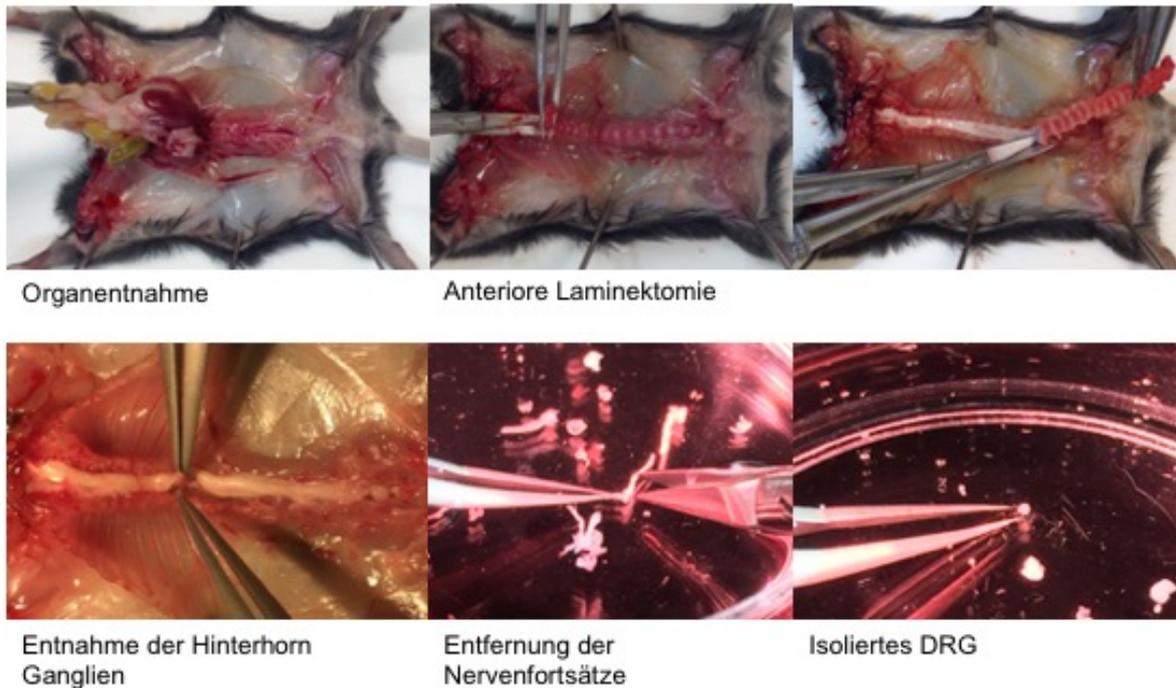


Abbildung 3. Schrittweise Entnahme von DRG. DRG wurden aus 10-14 Tage alten Mäusen entnommen zur Untersuchung des Einflusses aktivierter Neurone auf Perizyten. Die DRG wurden nach der Entnahme mit dem Überstand von PCC-Linien aktiviert und in einem zweiten Schritt auf Perizyten transferiert. Abbildung aus Fangmann L, Teller S, Stupakov P, Friess H, Ceyhan GO, Demir IE. 3D Cancer Migration Assay with Schwann Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1739:317-325. doi: 10.1007/978-1-4939-7649-2_20. PMID: 29546716.

und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Es erfolgte eine anteriore Laparotomie, mit Entnahme des Organpaketes und Präparation der Wirbelsäule. Anschließend wurde eine anteriore Laminektomie (blockweise Entnahme der Wirbelkörper) durchgeführt, was die Aufsicht auf den Spinalkanal ermöglicht. Es erfolgte die Mikroskop-assistierte Dissektion des Rückenmarks mit Entnahme der Hinterhornganglien (DRG) von zervikal nach lumbal absteigend. Nach der Entnahme wurden die DRG in Minimal Essential Medium (MEM-Medium) auf Eis gelagert. Um eine spätere Kontamination durch Fibroblasten auszuschließen, wurden die Wurzelfortsätze (Gesamtheit der Axone) der DRG unter Schonung des Ganglions (Gesamtheit der Perikaryons) vorgenommen. Das Medium wurde anschließend aspiriert und die DRG in HBSS, welches mit Kollagenase II versetzt ist, resuspendiert und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Ablauf des 3D Kokultur-Assays

Eine 24well Platte, bestückt mit Poly-D-Lysin beschichteten Coverslips wurde vorbereitet. Unter sterilen Bedingungen wurde jeweils ein DRG entnommen und mittig auf dem Objektträger platziert. Nachdem überschüssiges Medium aspiriert wurde, inkubierten wir die DRG für 5 Minuten bei 37°C. Zur Stabilisation gaben wir 25 µl ECM-Gel auf jeden DRG und inkubierten wiederum für 10 Minuten bei 37°C. Abschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Neurobasal Medium plus FCS versorgt und für 24 Stunden inkubiert. Parallel dazu wurde in der oben bereits beschriebenen Weise 5000 Perizyten pro Well ausgesät und eine 24-stündige Periode zum Recovery und Anhaftung der Zellen erlaubt. Die erste Behandlung stellte die Stimulation der DRG dar. Hierfür wurde der Überstand von PCC-Linien in einer Zielkonzentration von 100µg/ml auf die DRG transferiert. Die Stimulation erfolgte für 48 Stunden. Nach dieser Stimulation gelten DRG als aktiviert. Der Zellüberstand dieser aktivierten DRG wurde anschließend vorsichtig aspiriert und auf die Perizyten transferiert. Gleichzeitig erhielten DRG den Zellüberstand von Perizyten. Nach einer weiteren 24-stündigen Stimulation erfolgte die Fixation. Das folgende Pipettierschema wurde dabei respektiert.

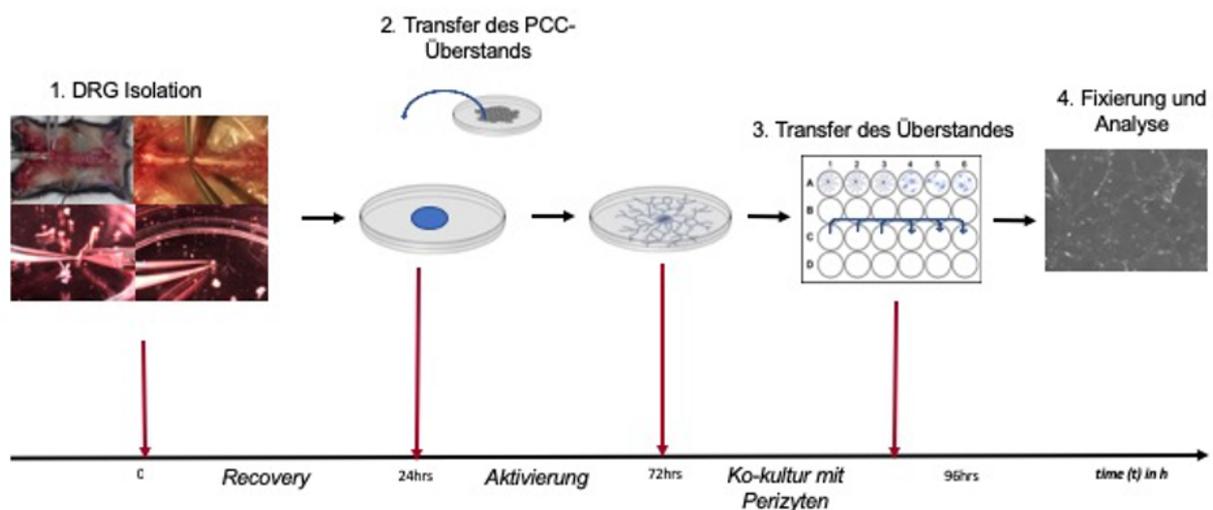


Abbildung 4. Ablauf des 3D-Kokultur-Assay. DRG wurden mit dem Überstand von PCC-Linien aktiviert. Anschließend wurde der Zellüberstand auf Perizyten transferiert. Parallel dazu wurde der Zellüberstand der Perizyten auf die aktivierten DRG-Neurone transferiert.

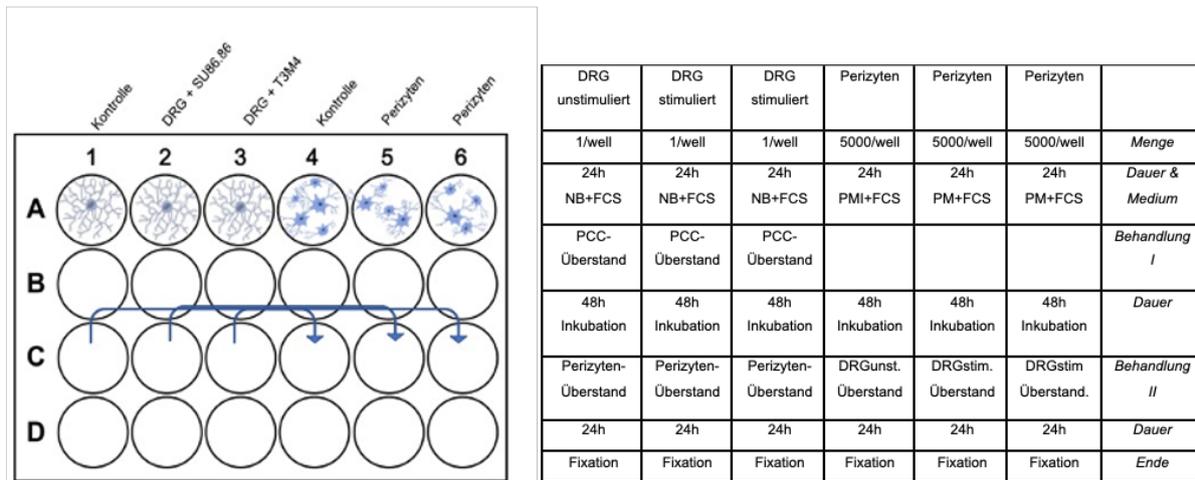


Abbildung 5. Pipettierschema für den Ablauf des 3D-Kokultur-Assay. DRG wurden 48h mit dem Überstand von PCC-Linien aktiviert. Anschließend wurde der Zellüberstand auf Perizyten transferiert. Parallel dazu wurde der Zellüberstand der Perizyten auf die aktivierten DRG-Neurone transferiert.

Auswertung: Neuritendichte

Nach Beendigung des Assay wurde das Zellmedium aus jeder Well-Kammer unter Schonung der am Boden haftenden Zellen aspiriert und verworfen. Vorsichtig wurden die Zellen mit jeweils 500µl PBS gewaschen. Für 15 Minuten wurden die Zellen mit je 500µl 4%igem PFA fixiert. Anschließend wurden die Coverslips, mit den darauf haftenden Zellen, vorsichtig mobilisiert und auf ein Parafilm-Schema transferiert. Hierbei galt es zu beachten, dass die Zellen stets in einer flüssigen Phase aus PBS gehalten wurden. Nach einem 5-minütigen Waschvorgang erfolgte die Permeabilisierung mit 0,5% TritonX in PBS. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Zellen mit 10%igem Ziegen Serum inkubiert und anschließend mit Primärantikörpern, beta-III-tubulin und ki67 behandelt. Abschließend wurden die Zellen wiederum gewaschen. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Fluoreszenz Mikroskops Keyence BZ 9000. Wir fertigten Übersichtsaufnahmen an, welche durch die „stacking-Funktion“ eine besondere Tiefenschärfe erhielten. Dies ermöglicht eine näherungsweise 3D-Rekonstruktion. Anschließend wurde die Neuritendichte der DRG-Kulturen ausgewertet. Die Neuritendichte wird hierbei in 4 repräsentativen, standardisierten Fotoausschnitten evaluiert, die bei einer 200x-fachen Vergrößerung aufgenommen wurden und Bereiche mit dichtem Neuritenwachstum zeigen. Anschließend wird ein standardisiertes 50x50 µm Gitter über das Foto gelegt und jeder Schnittpunkt eines Neuriten innerhalb eines Rechtecks mit der Horizontalen gezählt. Alle Versuche wurden drei Mal wiederholt. Auswertung der Proliferation und Fläche

von stimulierten Perizyten erfolgte analog des zuvor beschriebenen einfachen Proliferations-Assays.

3.2.6 RNA Untersuchungen

Alle Experimente wurden, falls nicht anderes angegeben, auf Eis durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontamination wurden alle Arbeitsflächen mit RNase-Inhibitoren desinfiziert. Zur Verwendung kamen ausschließlich sterilisierte und RNase-frei gelieferte bzw. autoklavierte Produkte. DNA wurde bei -20°C gelagert und RNA bei -80°C .

RNA Isolation

Für die Isolation von RNA aus Zellen verwendeten wir ein Kombinationsverfahren, bei dem zum einen Trizol und zum anderen das RNeasy Mini Kit von Qiagen zur Verwendung kommt. Durch die Stoffeigenschaften von Trizol, welches eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat ist, können Fragmente von RNA aus Zell- und Gewebeproben unterschiedlichen Ursprungs isoliert werden. Zunächst wurden 100.000 Perizyten pro well in einer 6 well Platte angezüchtet. Nach einer 24-stündigen Recovery-Zeit wurden die Zellen mit dem Überstand von PCC-Linien für weitere 24 Stunden stimuliert. Auf gleiche Weise haben wir die PCC-Linien, SU86.86 und T3M4, ebenfalls in 6 well Platten anwachsen lassen und mit dem Überstand von Perizyten stimuliert. Nach Beendigung der Stimulationsphase wurde das Zellmedium unter Schonung des am Boden haftenden Zellrasens vorsichtig aspiriert und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Lysierung eines vollbewachsenen Zellrasens wurde jeweils 1 ml Trizol verwendet. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der Wells abgetragen und in ein steriles, RNase-freies Eppendorf-Tube überführt. Nach Homogenisierung der Probe mit Trizol wurden $200\mu\text{l}$ Chloroform hinzugeben. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm trennt sich das Homogenisat in eine klare wässrige obere Schicht, welche die RNA enthält, sowie eine Grenzschicht und eine rote organische untere Schicht, welche DNA und Proteine enthält. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Ausfällung 15 Minuten bei Raumtemperatur mit $450\mu\text{l}$ Isopropanol inkubiert. Die folgenden Waschvorgänge dienen der Entfernung von Verunreinigungen. Für diesen Zweck verwendeten wir ein System aus Wasch- und Trennsäulen von Qiagen, welches unter Einsatz

verschiedener Pufferlösungen und Zentrifugationsschritte ein reines RNA-Endprodukt liefert. Zunächst wurden bis zu 700µl der klaren Lösung auf eine „RNAeasy spin column“ transferiert. Diese wurde in einem Auffangbehälter platziert und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen, wobei die RNA selektiv durch eine Silikatgel-Membran in dem Filter gebunden blieb. Durch das zuvor hinzugefügt Isopropanol konnten die hierfür die Bindungsbedingungen adjustiert werden. Die in dem Filter der „spin column“ gebundene RNA wurde mit 700µl RW1-Puffer versetzt und für 15 Sekunden bei bei 10.000 rpm in der Zentrifuge gewaschen. Das Filtrat wurde erneut verworfen und die immer noch gebundene RNA wurde zwei Mal mit 500µl RPE Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nachdem ein frisches Sammelgefäß eingesetzt wurde, trocknete man die RNA durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Schließlich konnte die gebundene RNA eluiert werden, indem 40µl RNase freies Wasser auf die Mitte der Silikat-Membran pipettiert wurden und für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Die finale Konzentration und Reinheit des RNA-Produktes lässt sich durch die Messung der UV-Absorption bei 260nm im Photometer (Nanodrop) bestimmen. Zur Eichung des Photometers benötigt man einen Referenzwert ohne Probe. Für diesen Leerwert benutzt man den Puffer, in diesem Fall destilliertes Wasser, in dem sich die Probe befindet. Während Nukleinsäuren ein Absorptionmaximum bei 260nm zeigen, absorbieren Proteine am besten Licht der Wellenlänge 280nm. Liegt der Quotient aus den gemessenen Extinktionen bei 260nm dividiert durch die Extinktion bei 280nm bei 2, kann angenommen werden, dass es sich um reine RNA handelt ohne Verunreinigung durch Proteine.

3.2.7 Affymetrix GeneChip® Expressions Array

Für die Untersuchung von möglicherweise veränderten Expressionsmustern in karzinomzellaktivierten Perizyten wurde eine Mikroarray-basierte Expressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde RNA aus karzinomzellaktivierten Perizyten mithilfe des RNEasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und eine Mindestmenge von 900ng/µl RNA gewonnen. Die Proben wurden zur weiteren Analyse an das Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (Regensburg, Deutschland) gesendet, wo eine Analyse mittels Affymetrix GeneChip® Array durchgeführt wird. Anschließend erfolgte eine sog. „pathway“ Analyse mittels Gene Set Enrichment

Analyse (GSEA) v2.1.0 software of Broad Institute (Cambridge, MA, USA) und KEGG-basierter „pathway“-Analyse.

3.2.8 Versuchstiere: KPC Mausmodell

Wir verwendeten ein genetisch verändertes Mausmodell (genetically engineered mouse model, GEMM), das als murines Pankreaskarzinommodell etabliert ist und die Tumorentwicklung von der Initiierung bis hin zum invasiven Karzinom nachbildet. Das KPC Mausmodell zeichnet sich durch eine pankreasgewebe-spezifische (Ptf1a/p48-Cre) Expression von mutiertem K-ras (K-ras^{G12D}) sowie einem p53-knock-out bzw. p53 Mutation (p53^{flox/+} bzw. p53^{flox/flox} bzw. p53^{R172H}) aus. Die genannten Mutationen sind namensgebend für das Akronym „KPC“. Mäuse mit diesem Genotyp entwickeln innerhalb von 5-10 Wochen die klassischen, präinvasiven intradukalen, neoplastischen Vorläuferläsionen der Pankreasgänge, sog. pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und mit circa 10 – 20 Wochen invasive Pankreastumore (Hinograni et al., 2003, Hingorani et al., 2006). Das mediane Überleben dieser Tiere ist mit 5,5 Monaten signifikant verkürzt. 80% der KPC Mäuse entwickeln Metastasen in Leber, Lunge und Peritoneum (Hinograni et al., 2003, Hingorani et al., 2006). Wir untersuchten Perizyten in Mäusen mit dem KPC Genotyp (Ptf1a-p48, K-ras^{G12D}, p53^{flox/+} bzw. p53^{flox/flox} bzw. p53^{R172H}) im Alter von 3 Wochen (Kontrollgruppe), 10 Wochen und 20 Wochen (jeweils n = 3 Mäuse) mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung) mit dem Perizyten-Antikörper anti-NG2. Hierfür wurde Pankreasgewebe entnommen und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die weiteren immunhistochemischen Untersuchungen verliefen analog der oben beschriebenen Versuchsabläufe.

3.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics v25 (New York) und die graphische Aufbereitung mit GraphPad Prism 5 software (San Diego, USA). Zwei unverbundene, normalverteilte Gruppen mit gleichen Varianzen wurden mittels t-Test auf statistische Signifikanz verglichen. Drei oder mehr unverbundene, normalverteilte Gruppen mit gleichen Varianzen wurden mittels ANOVA Test untersucht. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (mean) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Zur Untersuchung von Korrelationen zwischen PCV bzw. PCI und weiteren histopathologischen bzw. klinischen Parametern wurde Spearmans Rangkorrelation

durchgeführt. Das Überleben wurde vom Zeitpunkt der Pankreatektomie bis zum Tod bzw. *last follow-up* kalkuliert. Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier Methode angefertigt und hinsichtlich statistischer Signifikanz mit log rank test überprüft. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Perizyten im Pankreaskarzinom

Die ersten experimentellen Untersuchungen umfassten den Nachweis von vaskulären Perizyten im humanen Pankreaskarzinom (PCa). Hierfür wurde Pankreaskarzinomgewebe von 39 Patienten verwendet und immunhistologisch untersucht. Als Kontrolle diente normales Pankreasgewebe (NP) von 15 Patienten, die aus nicht onkologischen Gründen eine Pankreasresektion erhalten hatten. Perizyten, die sich peri-endothelial an kleinen Arteriolen, Kapillaren und Venolen befinden, exprimieren das Oberflächenantigen CD146, syn. melanoma cell adhesion molecule (MCAM) (Sweeney et al., 2016, Crisan et al., 2008, Genedatabase) und wurden durch den monoklonalen Antikörper anti-CD146 markiert. Gleichzeitig wurden Endothelzellen durch den Antikörper anti-CD31 markiert. In einer zweiten Untersuchungsgruppe (identischen Patientenkohorte) und Kontrollkohorte wurden jene Perizyten untersucht, die sich peri-endothelial an Arterien und Arteriolen befinden und das Actinprotein α -smooth-muscle-actin (α SMA), exprimieren. Diese wurden durch den Antikörper, anti- α -smooth muscle actin (anti- α SMA) markiert. Arterien und Arteriolen werden in Abgrenzung zu Kapillaren im weiteren Verlauf als sogenannte „Marco-Vessels“ bezeichnet. Insgesamt ergaben sich 2 Untersuchungsgruppen und 2 Kontrollgruppen:

Untersuchungsgruppe 1:

anti-CD146/CD31 in PCa

Kontrollgruppe 1:

anti-CD146/CD31 in NP

Untersuchungsgruppe 2:

anti- α SMA/CD31 in PCa

Kontrollgruppe 2:

anti- α SMA/CD31 in NP

Die Primärantikörper zur Markierung von Perizyten und Gefäßendothelzellen wurden mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper gekoppelt. Perizytenantikörper wurden grundsätzlich mit einem Sekundärantikörper gekoppelt, welcher bei Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop ein grünes Fluoreszenz-Signal emittiert. Der Endothelzellantikörper (anti-CD31) wurde mit einem Sekundärantikörper gekoppelt, welcher bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge rot

fluoresziert. Die primären Ziele der immunhistologischen Untersuchungen waren folgende:

- a) eine *selektive* und *spezifische* Markierung von Perizyten und Endothelzellen im Pankreaskarzinomgewebe und normalem Pankreasgewebe nachzuweisen
- b) Unterschiede zwischen normalem Pankreasgewebe und Karzinomgewebe hinsichtlich des Vorkommens und der Morphologie von Perizyten zu detektieren

Die untenstehenden Abbildungen zeigen repräsentative digitale Fotoaufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Untersuchungsgruppe 1 (Spalte I und II) und Kontrollgruppe 1 (Spalte III). Es sind humane Perizyten an Arterien, Arteriolen und Kapillaren (sowie Venolen und Venen) zu sehen, die sich durch den Primärantikörper, anti-CD146 (■ grün) darstellen. Außerdem sind Endothelzellen durch den Antikörper anti-CD31 (■ rot) zu sehen und Zellkerne durch Anwendung des Zellkernfarbstoffs DAPI in (■ blau). Die erste (I) und zweite (II) Spalte zeigen repräsentative Fotoaufnahmen von zwei verschiedenen Pankreaskarzinompatienten aus der Untersuchungskohorte in zunehmender Vergrößerung. Die dritte (III) Spalte zeigt im Vergleich dazu gesundes Pankreasgewebe eines Patienten aus der Kontrollkohorte. Im Karzinomgewebe war eine Zunahme von Perizyten an Tumorgefäßen zu erkennen. In den vergrößerten Fotoaufnahmen (Zeile 3 und 4) konnte man außerdem erkennen, dass insbesondere die kleinen Gefäße mehr Perizyten aufweisen (I.B – II.C). Tumorgefäße erschienen desorganisiert und ungleichmäßig im Vergleich zu gesunden Gefäßen (I.C – II.C). Perizyten bildeten im Karzinomgewebe lange Zellausläufer mit vergrößerter Zelloberfläche (Pfeile II.D). Dies bewirkte eine Signalüberlagerung von grünem und rotem Licht, sodass ein gelbes Signal in den IF-Mikroskop Fotoaufnahmen erschien (Pfeile II.D). Ein gelbes Fluoreszenzsignal kam wesentlich ausgeprägter im Karzinomgewebe vor im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe. Bei Betrachtung des gesunden Pankreasgewebe (Spalte III) stellten sich die Gefäße regelmäßig und gleichförmig dar (III.A - III.B). Insgesamt wiesen weniger Gefäße einen Perizyten-Mantel auf (III.C – III.D). Hauptsächlich die größeren Arterien und Arteriolen waren im gesunden Gewebe von Perizyten ummantelt (Pfeile III.B, III.C, III.D).

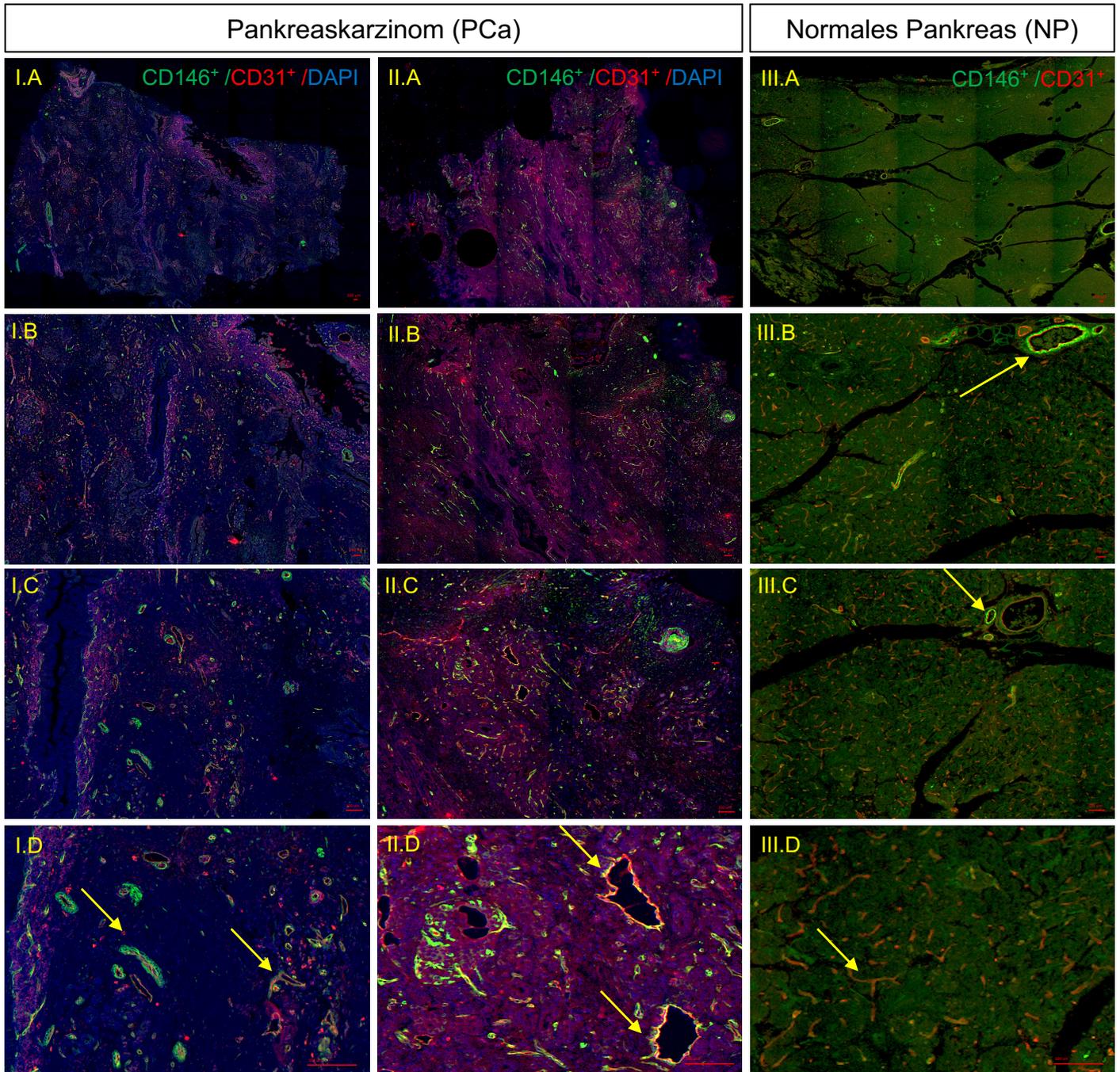


Abbildung 6. CD146⁺ Perizyten im humanen Pankreaskarzinom. Gefäß-assoziierte Perizyten wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung im humanen Pankreaskarzinom (PCa) untersucht. Spalte I und II zeigen repräsentative Fotoaufnahmen von zwei verschiedenen Pankreaskarzinompatienten in zunehmender Vergrößerung (nach unten). Perizyten wurden mit dem Antikörper anti-CD146 markiert (■ grün), Endothelzellen wurden mit dem Antikörper anti-CD31 (■ rot) markiert und Zellkerne mit DAPI (■ blau). Als Kontrolle diente gesundes Pankreasgewebe (Spalte III). Im Karzinomgewebe zeigt sich eine Zunahme von Perizyten an Tumorgefäßen, insbesondere an kleinen Gefäßen (I.B – III.C). Tumorgefäße erscheinen desorganisiert und ungleichmäßig im Vergleich zu gesundem Gewebe (I.C – III.C). Perizyten bilden im Karzinomgewebe längere Zellausläufer mit vergrößerter Zelloberfläche (II.D). Dadurch kommt es zur Signalüberlagerung von grünem und rotem Licht, sodass ein gelbes Signal erscheint (Pfeile II.D).

Die folgende Abbildung 7 zeigt repräsentative Fotoaufnahmen der Untersuchungsgruppe 2 (Spalte I und II) und Kontrollgruppe 2 (Spalte III). Hier wurden Perizyten im humanen Pankreaskarzinom untersucht, die sich an Gefäßen proximal (oberhalb) des Kapillar-Niveaus befinden. Diese Gefäße exprimieren das Antigen α SMA, wohingegen Kapillar-assoziierte Perizyten kein α SMA exprimieren und bei der unten dargestellten Immunfärbung nicht erfasst wurden. Spalte I und II zeigen Fotoaufnahmen von zwei verschiedenen Pankreaskarzinompatienten in zunehmender Vergrößerung. Perizyten wurden mit dem Antikörper anti- α SMA (■ grün) markiert, Endothelzellen wurden mit dem Antikörper anti-CD31 (■ rot) markiert und Zellkerne mit DAPI (■ blau). Die Kontrollkohorte mit einer repräsentativen Gewebeprobe aus gesundem Pankreasgewebe ist in Spalte III abgebildet. Im Karzinomgewebe (Spalte I und II) zeigte sich eine Zunahme von Perizyten an Tumorgefäßen (I.B - II.C). Im Vergleich dazu wiesen Gefäße im gesundem Pankreasgewebe weniger α SMA-positive Perizyten auf (III.A – III.D). Periendothelial fanden sich kaum Perizyten (Pfeile III.D.). Im gesunden Pankreasgewebe kam es kaum zu der beschriebenen gelben Signalüberlagerung. Nebenbefundlich war im Karzinomgewebe eine ausgeprägte Tumorfibrose zu sehen. Diese desmoplastische Reaktion war in Form von ausgeprägten, grün-fluoreszierenden, α SMA-positiven Bereichen zu erkennen (Sterne * I.A – II.B).

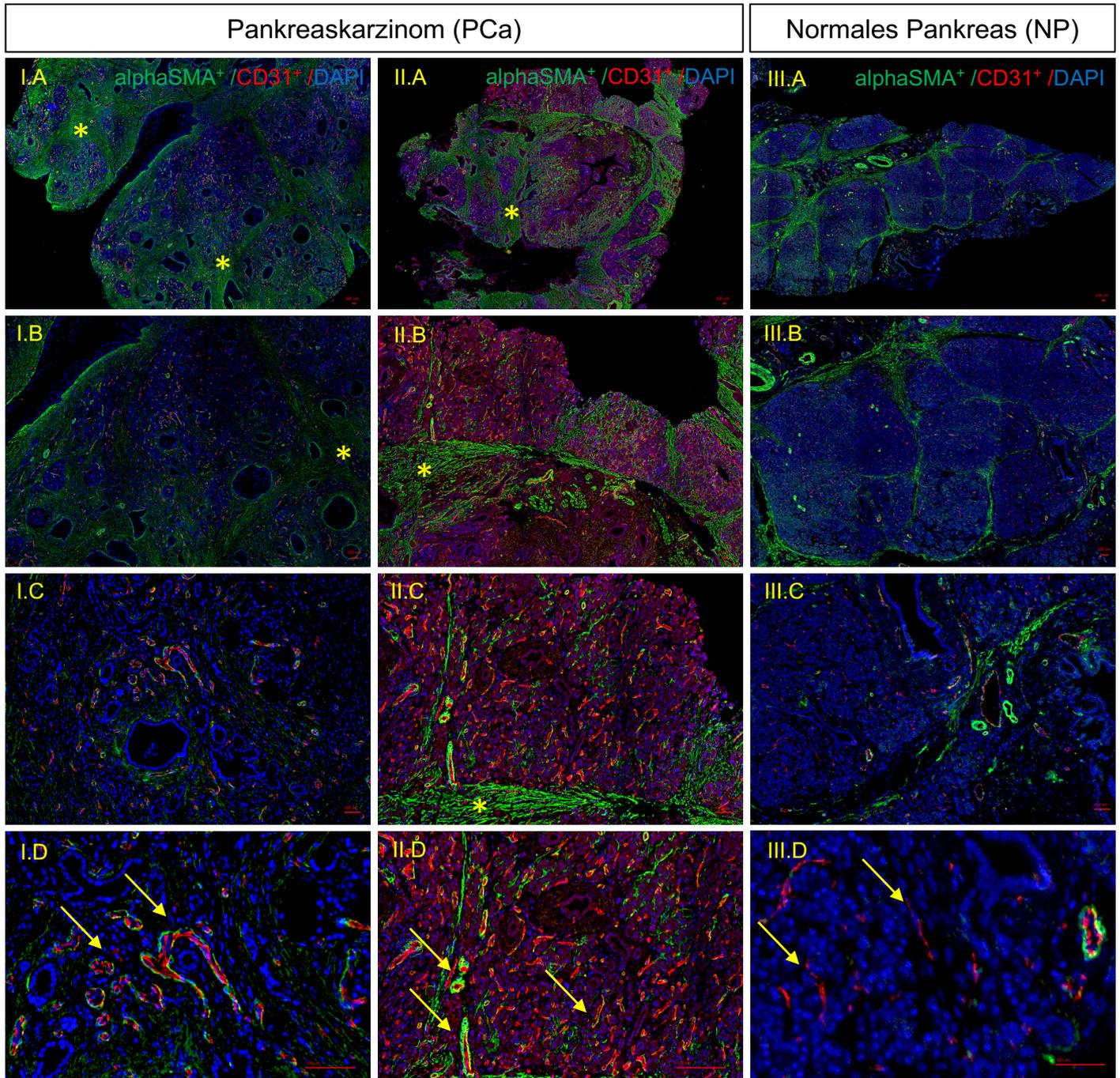


Abbildung 7. alphaSMA⁺Perizyten im humanen Pankreaskarzinom. Perizyten, die sich an Gefäßen überhalb des Kapillar-Niveaus befinden, exprimieren das Antigen alphaSMA. Spalte I und II zeigen repräsentative Fotoaufnahmen aus zwei verschiedenen humanen Pankreaskarzinomgewebeproben in zunehmender Vergrößerung (nach unten). Perizyten wurden mit dem Antikörper anti-alphaSMA markiert (■ grün), Endothelzellen wurden mit dem Antikörper anti-CD31 (■ rot) markiert, Zellkerne mit DAPI (■ blau). Als Kontrolle diente gesundes Pankreasgewebe (Kolumne III). Im Karzinomgewebe zeigt sich eine Zunahme von Perizyten an Tumorgefäßen (I.B - II.C). In gesundem Pankreasgewebe weisen Gefäße weniger α SMA-positive Perizyten auf (Kolumne III). Nebenbefundlich ist im Karzinomgewebe eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion in Form von α SMA-positiven Bereichen zu erkennen (Sterne * I.A – II.B).

Die folgenden Abbildungen zeigen weitere Detailaufnahmen von humanen Tumorperizyten im Pankreaskarzinomgewebe eines Patienten aus der Untersuchungsgruppe 1.

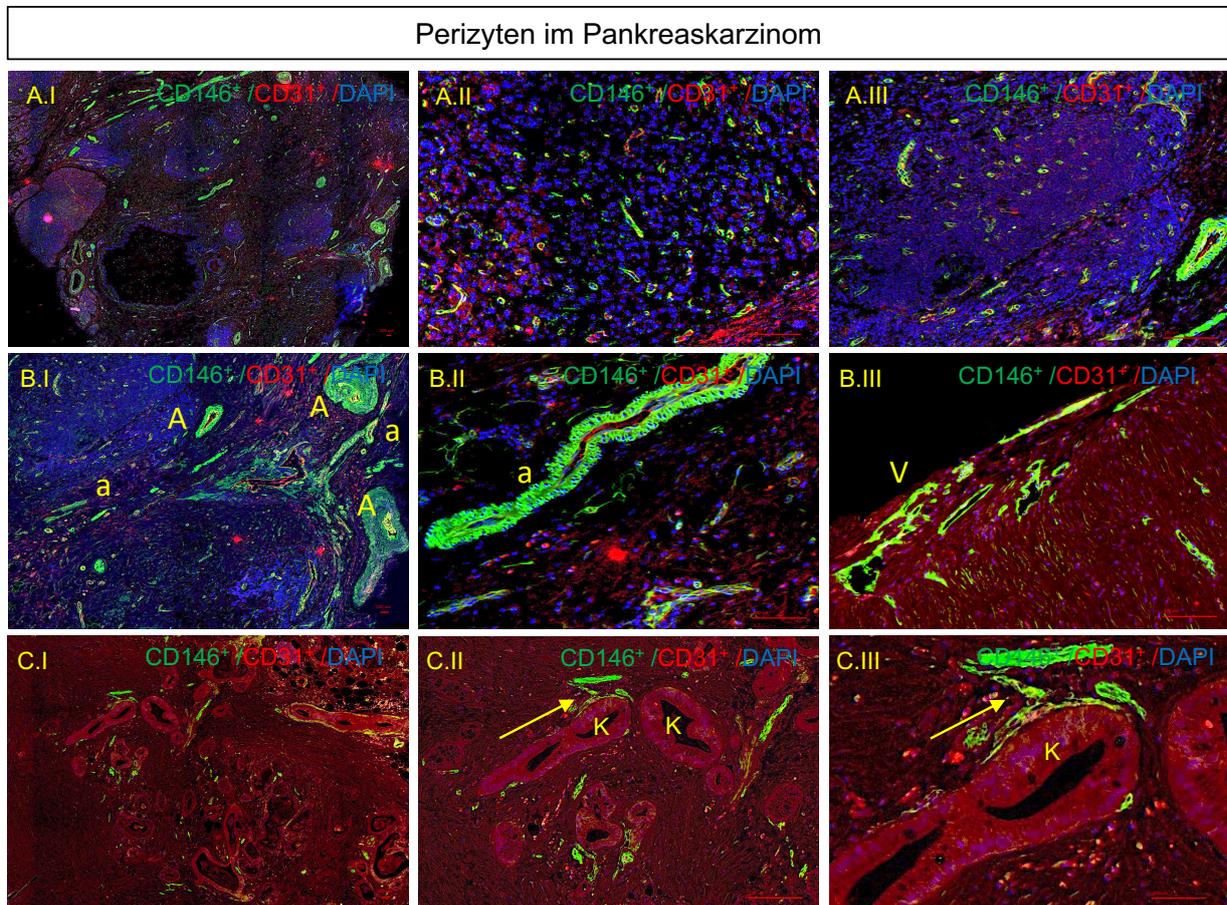


Abbildung 8. Perizyten an humanen Tumorgefäßen des Pankreaskarzinoms. A.I - III: Zahlreiches Vorkommen von Perizyten an humanen Tumorgefäßen. Hier insbesondere an kleinen Gefäßen (A.II – A.III). Dies ist durch ein ausgeprägtes grünes Fluoreszenzsignal erkenntlich. B.I – B.III: Tumorperizyten an Arterien (A) und Arteriolen (a) (B.I - B.II), sowie an post-kapillären Venolen (V) (B.III). C.I – C.III: Tumorperizyten (Pfeile) in direkter Nachbarschaft zu Karzinomzellen (K) eines duktales Adenokarzinoms.

Es ist ein zahlreiches Vorkommen von Perizyten (■ grün) an Tumorgefäßen zu sehen. In den obenstehenden Fotoaufnahmen stellten sich insbesondere kleine Gefäße perizytenreich dar (A.II – A.III). Es zeigte sich erneut ein ausgeprägtes grünes Fluoreszenzsignal (Zeile A.I – III). Perizyten befanden sich an Arterien (A) und Arteriolen (a) (B.I-B.II), sowie an post-kapillären Venolen (V) (B.III) (Zeile B.I – III). Tumorperizyten befanden sich auch in direkter Nachbarschaft zu Karzinomzellen (K) eines duktales Adenokarzinoms (Pfeile) (Zeile C.I – III).

Neurale Invasion (NI)

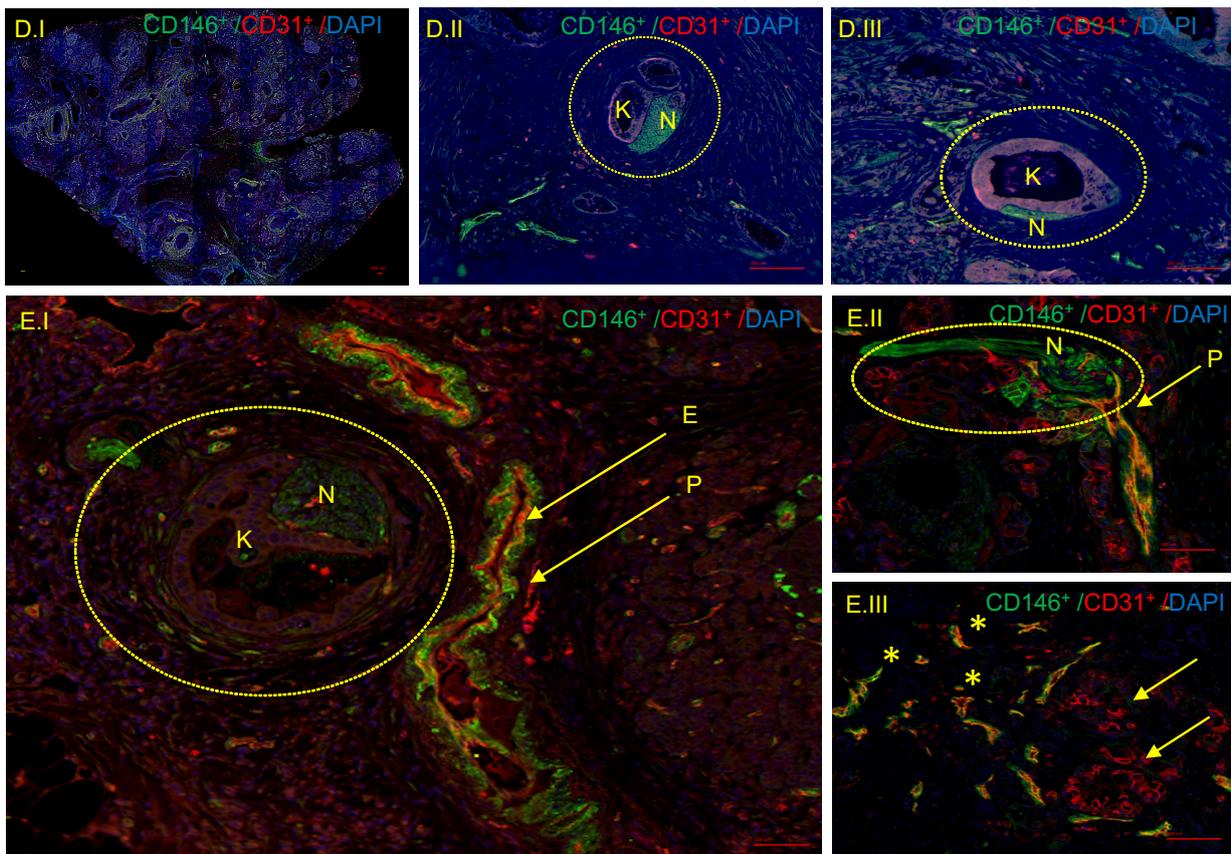


Abbildung 9. Perizyten und neurale Invasion. Invasion von Karzinomzellen (K) entlang eines intrapankreatischen Nervs (N), neurale Invasion genannt (Kreise). E.I - II: Neurale Invasion (Kreis) in direkter Nachbarschaft zu Tumorgefäßen (E=Endothel), die einen ausgeprägten Perizytenbesatz (P=Perizyten) aufweisen (Pfeile). E.II. – E.III: Das Gefäßendothel eines Tumorgefäßes, sowie die gefäßumgebenden Perizyten erscheinen hier besonders ungeordnet und gewunden (engl. "tortuous"). Endothelzellen (E) und Perizyten (P) sind kaum voneinander abgrenzbar. Es kommt zu der charakteristischen Fluoreszenzsignal-Überlagerung mit dem typischen gelben Farbsignal für Tumorperizyten (Sternchen). Daneben sind auch Gefäße ohne Perizytenmantel zu erkennen (Pfeilchen).

Die obenstehenden digitalen Fotoaufnahmen zeigen die Invasion von Karzinomzellen (K) entlang eines intrapankreatischen Nervs (N), neurale Invasion genannt, als charakteristisches Merkmal duktaler Adenokarzinome des Pankreas (Kreise in Zeile D.I - D.III). Neurale Invasion (Kreis) trat in direkter Nachbarschaft zu Tumorgefäßen auf, die hier einen ausgeprägten Perizytenbesatz aufwiesen (Pfeile in Zeile E.I – II). Dies ist insofern interessant, da neurale Invasion, neben Angioinvasion, einen weiteren Pfad der Tumordissemination im Pankreaskarzinom darstellt. Eine zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit untersucht, ob ein vermehrtes Vorkommen von Perizyten an Tumorgefäßen dazu führt, dass Krebszellen vermehrt Nerven zur lokalen Tumorausdehnung nutzen (Zeile E.I – II). Das Gefäßendothel eines Tumorgefäßes sowie die gefäßumgebenden Tumor-Perizyten erschienen hier besonders ungeordnet

und gewunden (engl. "tortuous"). Endothelzellen und Perizyten waren kaum voneinander abgrenzbar. Die Perizyten erschienen plump und in ihrer Zelloberfläche vergrößert. So kam es wiederum zur Fluoreszenzsignal-Überlagerung mit dem charakteristischen gelben Farbsignal für Tumorperizyten im Pankreaskarzinom (Sternchen). Daneben waren ebenso einige Gefäße ohne Perizytenmantel zu erkennen (Pfeilchen Zeile E II. – E.III).

Zusammenfassend haben die oben dargestellten Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen geführt:

(1) Im Pankreaskarzinom zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen von Perizyten an Tumorgefäßen im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe. Dies betraf insbesondere kleine Gefäße.

(2) Tumorgefäße waren ungeordnet, desorganisiert und mit Perizyten besetzt, die lange Zellausläufer bilden, welche in das Tumorstroma hinein reichen. Im normalen Pankreasgewebe zeigten sich Perizyten morphologisch lang, flach und deutlich von Endothelzellen abzugrenzbar. Tumorendothelzellen und Tumorperizyten erschienen verbreitert und plump. Dies führte vermehrt zu Fluoreszenzsignalüberlagerungen mit charakteristischer gelber Farbe in den IF-Mikroskop Fotoaufnahmen.

(3) Tumorperizyten befanden sich in direkter Nachbarschaft zu Nerven, die von Karzinomzellen invadiert wurden (neurale Invasion).

Um von diesen Beobachtungen zu vergleichbaren und quantifizierbaren Ergebnissen zu gelangen, wurden von allen Gewebeproben aus der Untersuchungsgruppe (Pankreaskarzinom, n=39), sowie von der Kontrollgruppe (gesundes Pankreasgewebe, n=15) „whole-tissue“ Fotoaufnahmen erstellt (Aufnahmen des gesamten Gewebepreparats) und mit dem Analysetool, „Hybrid cell count“, Keyence Analyser software, BZ, H1AE (Neu-Isenburg, GER) ausgewertet (siehe Material und Methoden). Ziel dabei war es, den oben geschilderten histologischen Befund auch quantitativ zu erfassen. Die Anzahl und Fläche der Gefäße pro Gewebepreparat wurden ermittelt. Dazu wurde im Fluoreszenzmikroskop eine Beleuchtungsschwelle angelegt, sodass ausschließlich rotfluoreszierende Bereiche, die das Gefäßendothel darstellen, angezeigt werden. Durch Zuhilfenahme einer Skalierung kann die rot markierte Fläche ausgemessen werden. Dieser Wert beschreibt die **Gefäßfläche pro**

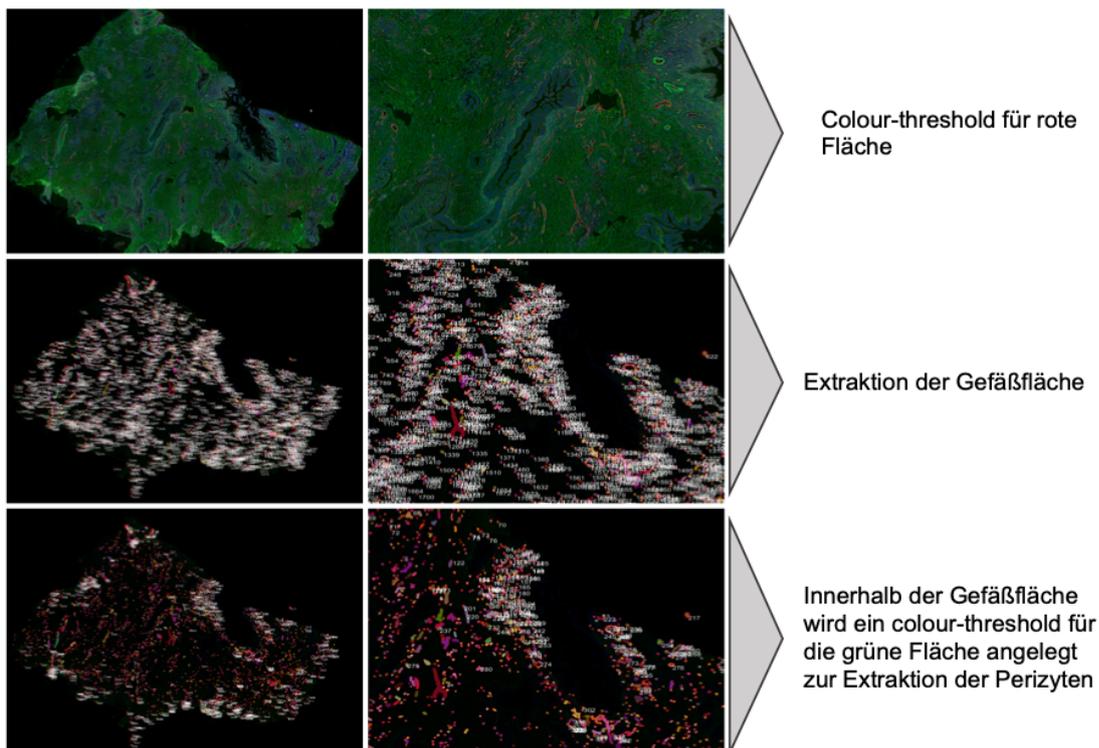
Patient. Außerdem wurde die **Anzahl der Gefäße pro Gewebeprobe** ausgezählt. Die Gefäßfläche wurde dann auf das 2-fache vergrößert, um so die Lokalisation der periendothelial gelegenen Perizyten zu berücksichtigen. Innerhalb dieser definierten Fläche wurde anschließend erneut eine Beleuchtungsschwelle zur Erfassung des grünen Fluoreszenzsignal angelegt. Mithilfe des Auswertungsprogramms wurden auf diese Weise alle Perizyten innerhalb der Gefäßfläche ausgemessen und gezählt. Insgesamt wurden zwei Werte generiert und zwei Quotienten gebildet, nämlich:

1) PCI = pericyte coverage index

2) PCV = pericyte covered vessels

Der PCI ist der Quotient aus der Perizytenfläche in Relation zur Gefäßfläche. Der PCV stellt den Prozentsatz derjenigen Gefäße dar, die mit Perizyten besetzt sind.

Exemplarische Fotoaufnahme zur Generierung des PCI und des PCV



$$\text{I.) } \frac{\text{Perizyten-Fläche}}{\text{Gefäß-Fläche}} = \text{Pericyte-Coverage Index} = \text{PCI}$$

$$\text{II.) } \frac{\text{Perizyten Anzahl}}{\text{Gefäß Anzahl}} = \text{Pericyte-Covered Vessels} = \text{PVC}$$

4.1.1 PCV und PCI für Mikrovaskuläre/Kapillar-assoziierte Perizyten

In der untersuchten Pankreaskarzinomkohorte betrug die Anzahl „perizytenbedeckter“ Gefäße im Pankreaskarzinom $PCV_{PDAC} = 38,8 \pm 3,4 \%$. Der PCV in der Kontrollkohorte aus normalem Pankreasgewebe betrug $PCV_{NP} = 23,4 \pm 3,7\%$ ($p = 0,0049$). Es zeigte sich ein Anstieg der Anzahl von mikrovaskulären CD146 positiven Perizyten im Pankreaskarzinom (Abbildung 10.A-B.).

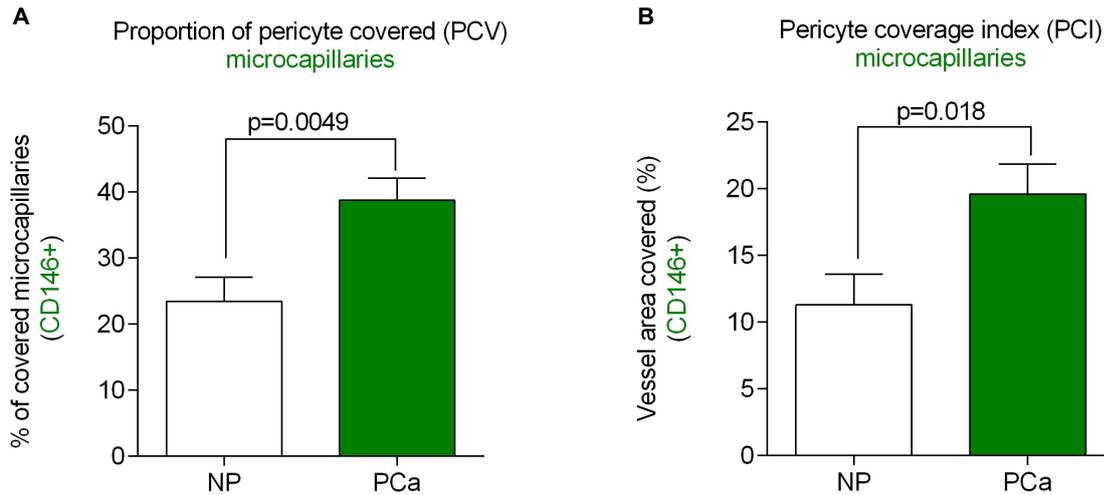


Abbildung 10. CD146⁺ Perizyten-Index im humanen Pankreaskarzinom. A) Der Anteil von Kapillaren/Microvessels, die von Perizyten bedeckt sind („pericyte covered vessels, PCV“) liegt im Pankreaskarzinom bei $PCV=38,8\pm3\%$, im gesunden Pankreasgewebe beträgt der $PCV=23,4\pm4\%$, $p=0,0049$. **B)** Die Fläche von Kapillar-assoziierten Perizyten in Relation zu der Gefäßfläche beträgt im Pankreaskarzinom $PCI=19,6\pm2\%$ und im gesundem Pankreasgewebe beträgt der $PCI=11,3\pm2\%$, $p=0,018$, Werte dargestellt als $MW\pm SD$; statistischer Test: t-Test.

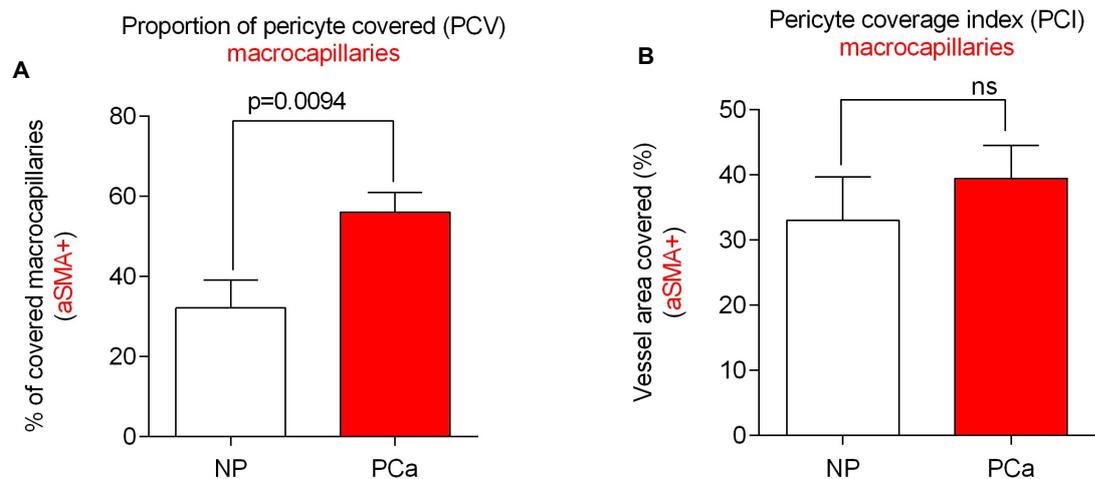


Abbildung 11. alphaSMA⁺ Perizyten-Index im humanen Pankreaskarzinom. A) Der Anteil an Gefäßen, die von alphaSMA-positiven Perizyten bedeckt sind, liegt im Pankreaskarzinom bei $PCV=56\pm5\%$, im gesunden Pankreasgewebe beträgt der $PCV=32,2\pm7\%$, $p=0,0094$. **B)** Die Fläche von Gefäß-assoziierten Perizyten beträgt im Pankreaskarzinom $PCI=39,5\pm5\%$ und im gesundem Pankreasgewebe $PCI=33\pm7\%$, $p=0,4701$, Werte dargestellt als $MW\pm SD$; statistischer Test: t-Test.

Die Untersuchung der Perizytenfläche im Pankreaskarzinom zeigte, dass $19,6 \pm 2,2\%$ der gesamten Gefäßfläche mit Perizyten bedeckt ist. Im Vergleich dazu waren im normalen Pankreasgewebe $11,3 \pm 2,3\%$ der Gefäßfläche von Perizyten bedeckt, $PCI_{PDAC} = 19,6 \pm 2,2\%$ vs. $PCI_{NP} = 11,3 \pm 2,3\%$ ($p = 0,018$). Insgesamt stieg somit die Perizytenanzahl, PCV, und die Perizytenfläche, PCI, im Pankreaskarzinom an.

4.1.2 PCV und PCI für makrovaskuläre Perizyten

Die oben beschriebene Analyse führten wir in gleicher Weise für α SMA-positive Perizyten durch, die sich ausschließlich an Gefäßen proximal (oberhalb) des Kapillar-Niveaus befinden. Im Folgenden werden sie daher als „Macrocapillaries“ bezeichnet. Hier zeigte sich, dass die Anzahl der makrovaskulären Perizyten im Pankreaskarzinom im Durchschnitt bei $PCV_{PDAC} = 56 \pm 5\%$ lag, während der PCV in der Kontrollkohorte $PCV_{NP} = 32,2 \pm 7\%$ betrug ($p = 0,01$, Abbildung 11.A). Bei der Untersuchung der perizytenbedeckten Gefäßfläche lag der durchschnittliche Perizyten-Coverage-Index im Pankreaskarzinom bei $PCI_{PDAC} = 39,5 \pm 5\%$. In der Kontrollkohorte betrug der $PCI_{NP} = 33 \pm 7\%$. Der Unterschied zwischen dem PCI im Pankreaskarzinom und dem PCI in gesundem Gewebe war nicht signifikant ($p = 0,4701$, Abbildung 11.B).

Zusammenfassend ergaben beide Analysen, dass der grundlegende Unterschied zwischen Tumorgefäßen und normalen Gefäßen des Pankreas darin besteht, dass CD146-positive Perizyten an kleinen Tumorgefäße in Anzahl (PCV) und Fläche (PCI) erhöht sind. Tumorgefäße proximal des Kapillar-Niveaus („macrocapillaries“) wiesen ebenfalls häufiger eine Perizytenbedeckung auf, allerdings ist die Zellfläche von α SMA⁺-Perizyten im Pankreaskarzinom nicht vergrößert.

4.2 Besteht ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten PCV bzw. PCI und neuraler Invasion?

Um zu untersuchen, ob ein vermehrtes Perizytenvorkommen an Tumorgefäßen in Zusammenhang mit neuraler Invasion steht, wurde in Voruntersuchungen der Grad der neuralen Invasion in der identischen Patientenkohorte ermittelt. Neurale Invasion beschreibt den Prozess, bei dem Tumorzellen Nerven invadieren und kann in 3 Stadien eingeteilt werden. Die Erfassung der neuralen Invasion erfolgte durch die gleichzeitige immunhistologische Darstellung von Karzinomzellen und Nervenfasern. In einem Gradingssystem wird anschließend ermittelt, wie viele der intrapankreatischen Nerven von Tumorzellen invadiert sind und wie ausgeprägt die Invasion ist. Die Ausprägung richtet sich danach, wie tief Tumorzellen in einen Nerv vordringen (Grad I = Kontakt zu Nerven, Grad II = Invasion des Epi- und äußeren Perineuriums, Grad III = Invasion des Endoneuriums) (Liebl et al., 2014). Der Grad der neuralen Invasion (= NI severity Index) für jeden Pankreaskarzinompatienten aus unserer Untersuchungskohorte ermittelt. Anschließend führten wir eine Korrelation des PCVs bzw. PCs mit dem NI severity Index durch. In den untenstehenden Diagrammen ist der Grad der neuralen Invasion auf der y-Achse als sog. NI Severity Index abgebildet. Auf der x-Achse ist der PVC bzw. der PCI aufgetragen. Jeder Punkt in den abgebildeten Streudiagrammen stellt einen Patienten der Untersuchungskohorte dar. Die Stärke des Zusammenhangs wird durch den Korrelationskoeffizienten wiedergegeben und berechnet sich nach Spearman. Ein p-Wert $\leq 0,05$ gibt eine statistisch signifikante Korrelation an und kann auf einen Zusammenhang hindeuten.

Bei der Gegenüberstellung des PCVs, als auch des PCs für CD146-positive Perizyten mit dem Grad der neuralen Invasion zeigte sich keine Korrelation (Abbildung 12.A Spearman $r=-0,1874$, $p=0,2962$, Abbildung 12.B Spearman $r=-0,09135$, $p=0,6131$). In einem nächsten Schritt untersuchten wir den Zusammenhang der α SMA-positiven Perizyten an Tumorgefäßen proximal (oberhalb) des Kapillar-Niveaus und dem NI severity Index. Ebenfalls konnte hier kein Zusammenhang festgestellt werden (Abbildung 13.C Spearman $r=0,2065$, $p=0,2201$, Abbildung 13.D Spearman $r=0,096$, $p=0,5733$, $ns=p>0,05$).

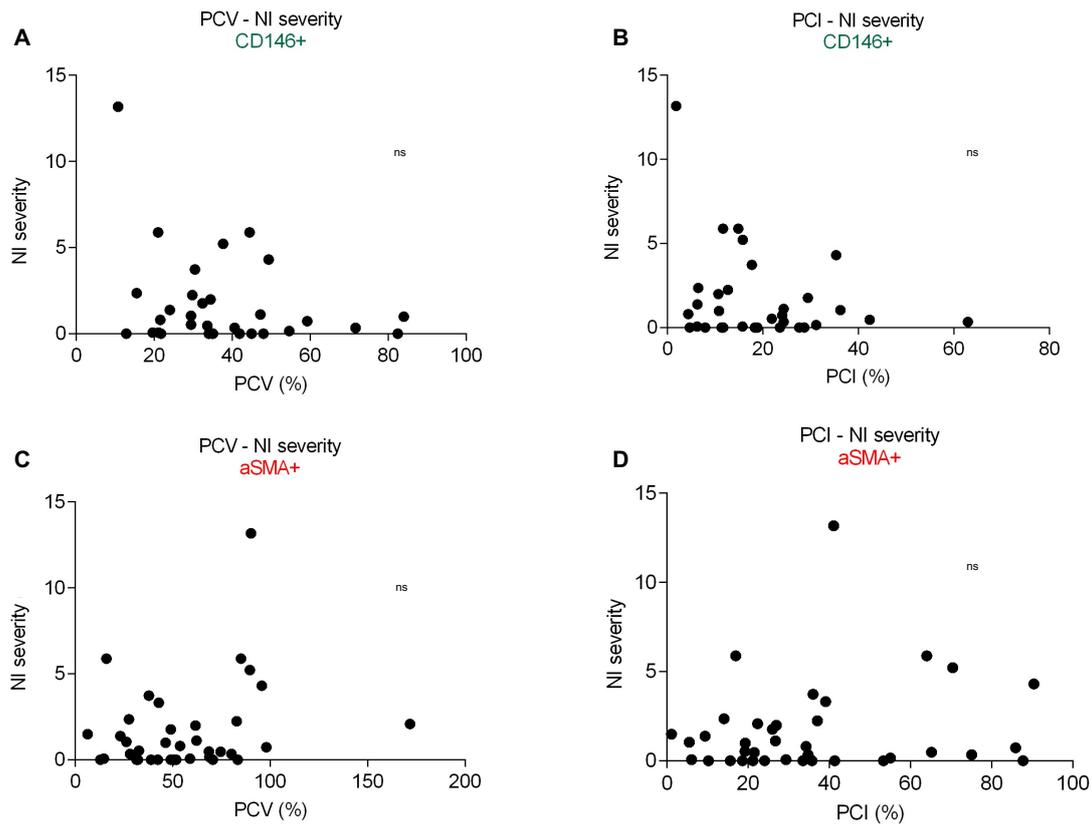


Abbildung 12. Zusammenhang zwischen Perizyten und neuraler Invasion im humanen Pankreaskarzinom. Die Perizyten-Indices (PCI und PCV) für mikrovaskuläre (CD146⁺) und makro-(α SMA⁺) vaskuläre Perizyten wurden mit dem NI severity Index korreliert. NI ist auf der y-Achse dargestellt, Perizyten-Indices auf der X-Achse abgebildet. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Es zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen den PCV/PCI und NI für CD146⁺Perizyten (**A und B**). Außerdem zeigte sich keine Korrelation zwischen PCV/PCI und NI für α SMA⁺Perizyten (**C und D**). **A** Spearman $r=-0,1874$, $p=0,2962$. **B** Spearman $r=-0,09135$, $p=0,6131$. **C** Spearman $r=0,2065$, $p=0,2201$. **D** Spearman $r=0,096$, $p=0,5733$. ns= $p>0,05$.

Im Pankreaskarzinom kommt es neben neuraler Invasion zu weiteren charakteristischen neuropathischen Veränderungen. Dazu zählt ein vermehrtes Vorkommen von intrapankreatischen Nerven. Bei den $n=39$ Pankreaskarzinompatienten der Untersuchungskohorte wurden in Voruntersuchungen jeweils die Gesamtfläche der Nerven pro Gewebefläche eines Tumors ermittelt (=innervierte Gewebefläche). Anschließend haben wir die Perizyten-Indices (PCI und PCV) für CD146-positive-Perizyten und α SMA-positive-Perizyten mit der innervierten Gewebefläche korreliert (Abbildung 13.A-D). Die Darstellung der innervierten Gewebefläche pro Patient ist auf der y-Achse. Die Perizyten-Indices sind auf der x-Achse abgebildet. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Wir konnten in der Untersuchungskohorte keine statistische Korrelation zwischen der innervierten Gewebefläche und dem PCV bzw. PCI für CD146⁺Perizyten detektieren (Abbildung 13.A und B: A.) Spearman $r=-0,05546$, $p=0,7554$. B) Spearman $r=-0,05147$,

p=0,7761). Weiterhin erwies sich keine Korrelation zwischen PCV bzw. PCI und innervierter Gewebefläche für α SMA+Perizyten (Abbildung 13.C und D: C) Spearman $r=-0,07368$, $p=0,6557$. D) Spearman $r=-0,1474$, $p=0,3772$. ns= $p>0,05$.

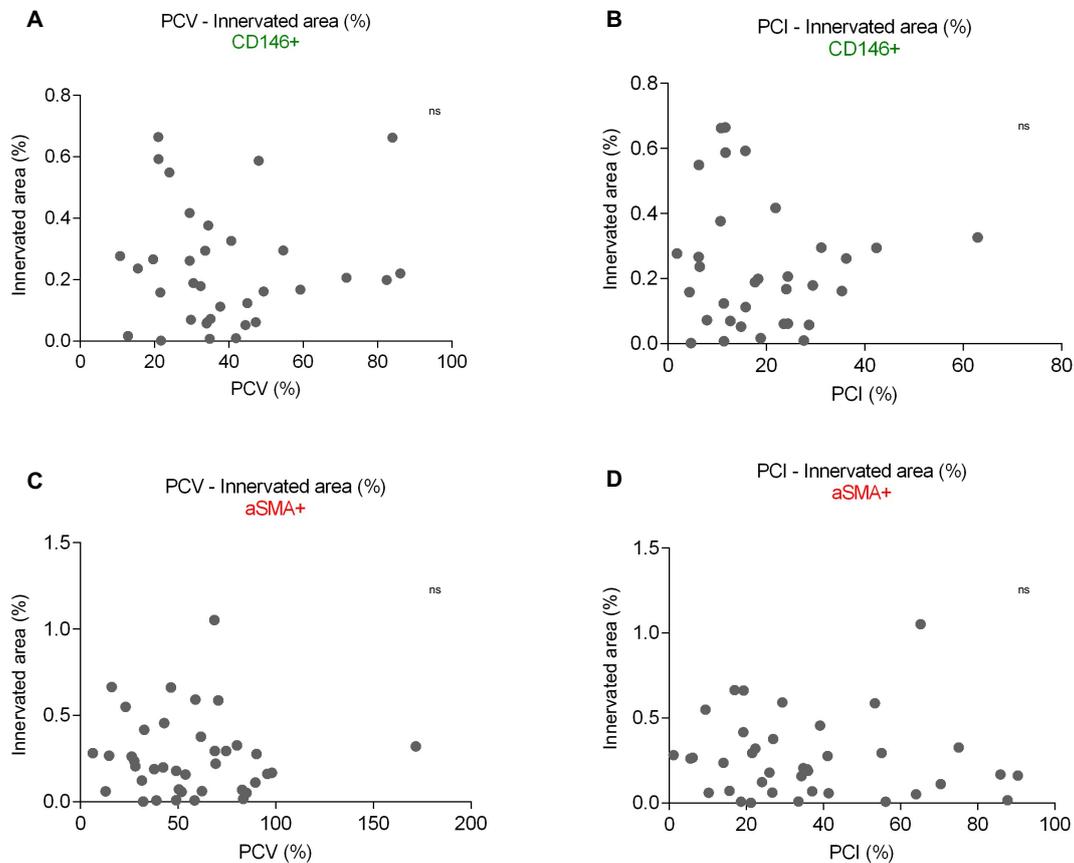


Abbildung 13. Zusammenhang zwischen Perizyten und Nervendichte im humanen Pankreaskarzinom. Die Perizyten-Indices (PCI/PCV) für mikrovaskuläre-(CD146⁺)-Perizyten und makrovaskuläre-(α SMA)-Perizyten wurden mit der innervierten Gewebefläche korreliert. Darstellung der innervierten Gewebefläche auf der y-Achse. Die Perizyten-Indices sind auf der x-Achse dargestellt. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Es zeigte sich keine statistische Korrelation zwischen der innervierten Gewebefläche und dem PCV/PCI für CD146⁺Perizyten (**A und B**). Außerdem zeigte sich keine Korrelation zwischen PCV/PCI und für α SMA⁺Perizyten (**C und D**). **A** Spearman $r=-0,05546$, $p=0,7761$. **B** Spearman $r=-0,05147$, $p=0,7761$. **C** Spearman $r=-0,07368$, $p=0,6557$. **D** Spearman $r=-0,1474$, $p=0,3772$. ns= $p>0,05$.

Anschließend analysierten wir den Zusammenhang zwischen Perizyten-Vorkommen und Gefäß-Vorkommen im Pankreaskarzinom (Abbildung 14). Die Gefäßdichte, engl. *mean vessel density (MVD)*, wurde ebenfalls histologisch untersucht und beschreibt den Quotienten aus Endothelzellfläche und gesamter Gewebefläche pro Tumorschnitt. Die MVD wurde im Rahmen von Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe für die Untersuchungskohorte ausgewertet. Die Perizyten-Indices (PCI und PCV) für mikrovaskuläre-(CD146⁺)-Perizyten und makro-(α SMA)-vaskuläre Perizyten wurden mit der Gefäßdichte korreliert. Es ließ sich keine Korrelation zwischen dem PCV bzw. PCI und der Gefäßdichte für mikrovaskuläre-(CD146⁺)-Perizyten detektieren

(Abbildung 14.A und B: A) Spearman $r=-0,0381$, $p=0,8254$. B) Spearman $r=-0,1323$, $p=0,4351$. Außerdem war keine Korrelation zwischen dem PCV bzw. PCI und der Gefäßdichte für makrovaskuläre-(α SMA+)-Perizyten nachzuweisen (Abbildung 14.C und D: C) Spearman $r=-0,04111$, $p=0,8203$. D) Spearman $r=0,07687$, $p=0,6707$. $ns=p>0,05$.

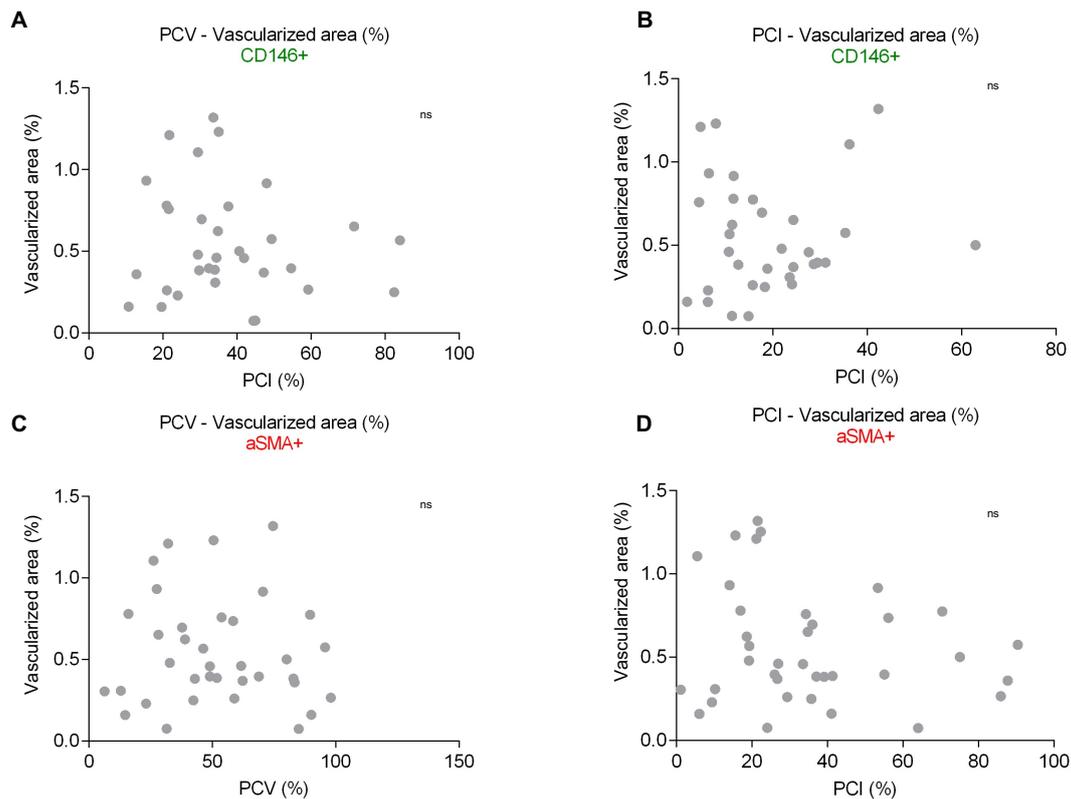


Abbildung 14. Zusammenhang zwischen Perizyten und Gefäßdichte im humanen Pankreaskarzinom. Die Perizyten-Indices (PCI und PCV) für mikrovaskuläre-(CD146⁺)-Perizyten und makrovaskuläre-(α SMA)-Perizyten wurden mit der Gefäßdichte korreliert. Darstellung der Gefäßdichte auf der y-Achse. Darstellung der Perizyten-Indices auf der x-Achse. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen den PCV/PCI und der Gefäßdichte für mikrovaskuläre (CD146⁺) Perizyten (**A und B**) und keine Korrelation zwischen dem PCV/PCI und der Gefäßdichte für makrovaskuläre (α SMA⁺) Perizyten. **A** Spearman $r=-0,0381$, $p=0,8254$, **B** Spearman $r=-0,1323$, $p=0,4351$, **C** Spearman $r=-0,04111$, $p=0,8203$ **D** Spearman $r=0,07687$, $p=0,6707$, $ns=p>0,05$.

Abschließend lässt sich festhalten, dass in der von uns untersuchten Patientenkohorte ein vermehrtes Vorkommen von Perizyten nicht mit einer erhöhten Rate an neuraler Invasion assoziiert war. Eine erhöhte Nervendichte im Pankreaskarzinom zeigte ebenfalls keine Korrelation zum Perizyten-Vorkommen. Das Vorkommen von Perizyten an Tumorgefäßen korrelierte auch nicht mit der Tumorgefäßdichte.

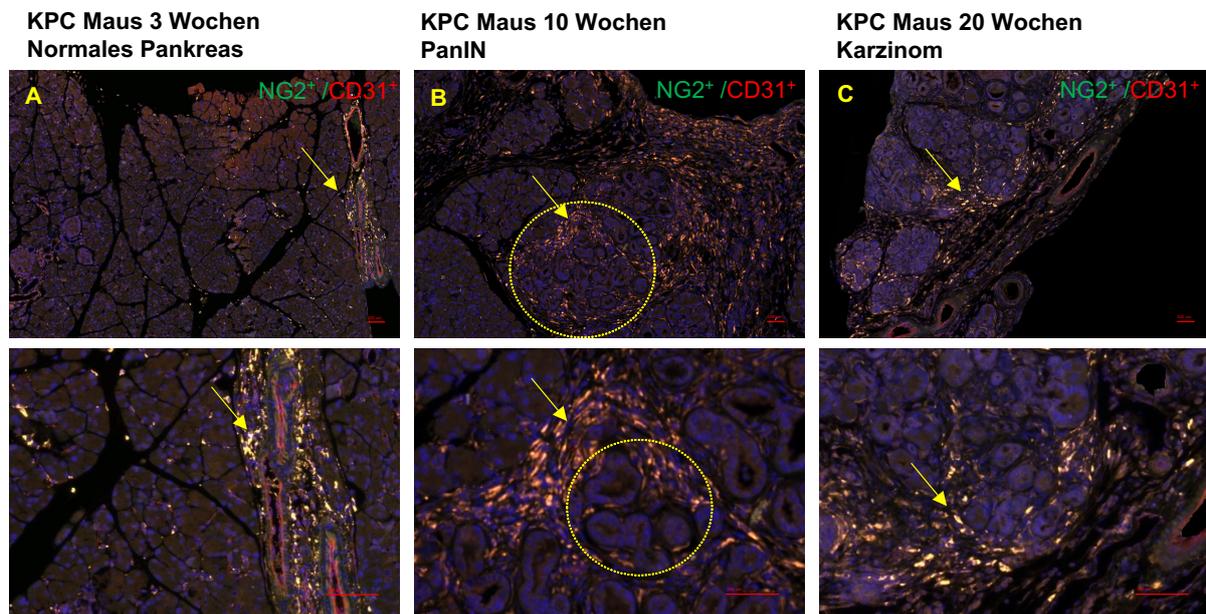
Wie zu Beginn ausgeführt, war eine Hypothese dieser Arbeit, dass vermehrtes Vorkommen von Perizyten an Tumorgefäßen dazu führen könnte, dass Tumorgefäße

im Pankreaskarzinom weniger suszeptibel gegenüber Invasion von Karzinomzellen sind und Nerven eine höhere Affinität für Karzinomzellen darstellen. Unseren Untersuchungen entsprechend, stellte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Perizyten-Coverage und neuraler Invasion dar. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für weitergehende Untersuchung von den Perizyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression und werden auf den folgenden Seiten präsentiert.

4.3 Untersuchungen von Perizyten im Pankreaskarzinom-Mausmodell

Da unsere Daten demonstrierten, dass im Pankreaskarzinomgewebe vermehrt Perizyten vorkommen, stellte sich die Frage, ob ein dynamischer Prozess vorliegt. Wir untersuchten daher die Perizyten-Coverage zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression. Das Ziel war hierbei festzustellen, ob eine veränderte Perizytencoverage mit der Tumorinitiierung einhergeht oder ein spätes Phänomen der Tumorprogression darstellt. Das Perizytenvorkommen wurde zu definierten Zeitpunkten im KPC Mausmodell analysiert, welches sich durch eine pankreasgewebe-spezifische (Ptf1a/p48-Cre) Expression von mutiertem K-ras (K-ras^{G12D}) sowie einem pankreas-spezifischen p53-knock-out bzw. p53-Mutation (p53^{flox/+} bzw. p53^{flox/flox} bzw. p53^{R172H}) auszeichnet. Wir untersuchten Perizyten in Mäusen mit dem KPC Genotyp (Ptf1a-p48, LSL-K-ras^{G12D}, p53^{flox/+} bzw. p53^{flox/flox}) im Alter von 3 Wochen (Kontrollgruppe), 10 Wochen und 20 Wochen (jeweils n = 3 Mäuse) und führten anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung (IF-Färbung) mit dem Perizyten-Antikörper anti-NG2 durch. NG2 ist ein Marker für „aktivierte“ Perizyten und ist stark während Neovaskularisation und Gefäßremodelling exprimiert (Stellcup et al., 1995, 2008, 2018). In reifen und ausdifferenzierten Perizyten wird NG2 als Oberflächenantigen herunterreguliert (Stellcup et al., 1995, 2008, 2018). Die Quantifizierung der Perizyten erfolgte durch Ausmessung der NG2-positiven Fläche. Die untenstehenden Bilder zeigen repräsentative Fotoaufnahmen der IF-Färbungen. Die 3 Wochen alten KPC Mäuse wiesen normales Pankreasgewebe auf mit normaler duktaler Gangarchitektur ohne die Charakteristika von PanIN Läsionen (Abbildung 15.A). NG2⁺-Perizyten befanden sich peri-endothelial an großen Gefäßen (Abbildung 15.A, Pfeile). Aufgrund der Fluoreszenzüberlagerung kam es zur charakteristischen, bereits beschriebenen Darstellung als gelbes Signal (Abbildung 15.A, Pfeile, Detailaufnahme). Die Perizytenfläche im normalen Pankreasgewebe von 3 Wochen alten KPC Mäusen betrug $A=0,0062 \pm 0,003\%$ (Abbildung 15.D). Im Vergleich dazu wiesen KPC Mäuse im Alter von 10 Wochen typische Veränderungen der Pankreasgänge auf, die den histologischen Eigenschaften von humanen PanIN-Läsionen (Grad I-III) entsprechen (Abbildung 15.B, Kreise). NG2⁺ Perizyten waren ausgeprägt in Bereich von PanIN Läsion nachzuweisen (Abbildung 15.B, Pfeile). Perizyten stellten sich gruppiert an der basalen bzw. der stroma-zugewandten Seite

von PanIN Läsionen dar (Abbildung 15.B, Pfeile) mit einer deutlichen Flächenzunahme (A=0,050 ±0,04%, p=0,0105, Abbildung 15 D). Es



D Fläche NG2⁺/CD31⁺ Perizyten in KPC Mäusen

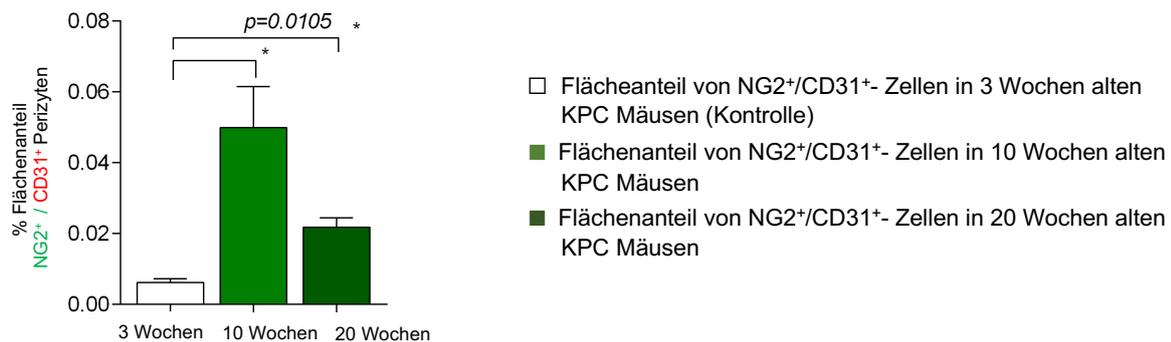


Abbildung 15. Perizyten im KPC Mausmodell. Die Fläche von NG2⁺/CD31⁺-Perizyten in 3 Wochen, 10 Wochen und 20 Wochen KPC Mausmodell **A)** Normales Pankreasgewebe in 3 Wochen alten KPC Mäusen (Kontrolle). NG2⁺/CD31⁺-Perizyten sind durch IF-Signalüberlagerung gelb (Pfeile). **B)** Typische PanIN Läsionen in 10 Wochen alten KPC Mäusen (Kreise). Peri-Läsional ausgeprägte Anreicherung von stroma-ansässigen NG2⁺/CD31⁺-Perizyten. **C)** NG2⁺/CD31⁺-Perizyten in 20 Wochen alten KPC Mäusen mit fortgeschrittenen Pankreastumoren. **D)** Der Flächenanteil von NG2⁺/CD31⁺-Perizyten liegt in 3 Wochen alten KPC Mäusen bei A=0,0062±0,003% in 10 Wochen alten KPC Mäusen bei A=0,050±0,04% und in 20 Wochen alten KPC Mäusen bei A=0,022±0,02% (p=0,011); Werte dargestellt als MW±SD; statistischer Test: t-Test; * ≤ 0,05

ist ebenfalls zu erkennen, dass NG2⁺-Perizytenanreicherungen nicht in direkter Nachbarschaft von Gefäßen stehen, sondern im Tumorstroma waren (Abbildung 15.B, Pfeile). In 20 Wochen alten KPC Mäusen waren PanIN Läsionen Grad III mit Zellatypien, Kernpolaritätsverlust und intraepithelialer Neoplasie bis hin zu Basalmembran überschreitendem Wachstum (invasives Karzinom) zu sehen

(Abbildung 15.C). In diesem Tumorstadium zeigt sich im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe ebenfalls eine Flächenzunahme von gruppierten NG2⁺-Perizyten ($A=0,022 \pm 0,02\%$, $p=0,011$, Abbildung 15.C-D, Pfeile). Im Vergleich zu 10 Wochen alten KPC Mäusen waren die Anreicherungen weniger ausgeprägt, blieben aber über dem Niveau von gesundem Pankreasgewebe bestehen; Werte dargestellt als $MW \pm SD$; statistischer Test: t-Test; * = $p \leq 0,05$, Abbildung 15.D). Die vorliegenden Ergebnisse im KPC Mausmodell demonstrieren, dass Perizyten zum Zeitpunkt der Tumorentstehung besonders ausgeprägt nachweisbar waren und mit dem Vorkommen von PanIN-Läsionen einhergehen. Bei fortgeschrittenen, invasiven Pankreastumoren war das Perizytenvorkommen im Vergleich zum präinvasiven Stadium nicht mehr so stark ausgeprägt. Es blieb aber insgesamt über dem Niveau von gesundem Pankreasgewebe bestehen.

4.4 Einfluss von Pankreaskarzinomzellen auf Perizyten

Um den Einfluss von Pankreaskarzinomzelllinien (PCC-Linien) auf humane Perizyten *in vitro* zu untersuchen, haben wir humane Perizyten für 24 Stunden mit dem Zellüberstand von zwei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien (PCC¹-Linie=SU86.86 und PCC²-Linie= T3M4) stimuliert und anschließend die Proliferationsrate von Perizyten gemessen. Anschließend wurde der Zellüberstand auf humane Perizyten transferiert. Als Kontrolle dienten Perizyten, die ausschließlich FCS-freies PCC-Linienmedium erhielten. Abbildung 16.A-C zeigt stimulierte versus nicht-stimulierte Perizyten unter dem Lichtmikroskop. Stimulierte Perizyten wiesen eine veränderte Zellmorphologie auf. Sie bildeten bereite Zellausläufer (Abbildung 16.C, Pfeile) und gruppierten sich zu Klustern (Abbildung 16.B, Kreis). Nicht-stimulierte Perizyten wiesen im Vergleich dazu eine kleine Zelloberfläche auf (Abbildung 16.A). Abbildung 16.D-F zeigt Perizyten nach Fixation und IF-Färbung mit dem Proliferationsmarker anti-ki67 (■ rot), sowie die dem DNA-Farbstoff DAPI (■ blau). Das nukleare Antigen ki67 ist als Marker proliferierender Zellen etabliert (Yerushalmi et al., 2010). Die nukleäre Expression des Antigens ki67 ist während der G1- und der frühen S-Phase minimal und steigt zu einem Maximum während der Mitosephase (G2 – frühe M Phase) stark an. Proliferierende Perizyten stellen sich durch Kopplung des Antikörpers mit einem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper pink dar (Abbildung 16.D-F, Pfeile), nicht-proliferierende Zellen stellen sich blau dar (Abbildung 16.D-F, Sterne). Der Proliferations-Index ergibt sich aus dem Verhältnis von pinken zu blauen Zellkernen. Die Proliferationsrate (R) von Perizyten, die mit dem Überstand der PCC-Linie¹ (SU86.86) stimuliert wurden, lag bei $R=15,05\pm 9\%$. Die Proliferationsrate von Perizyten, die mit der PCC-Linie² (T3M4) stimuliert wurden, lag bei $R=18,77\pm 8\%$. Die Proliferationsrate der Kontrollen liegt bei $R=23,42 \pm 15\%$. Der Zellüberstand von Pankreaskarzinomzellen induzierte keine erhöhte Proliferationsrate in humanen Perizyten im Vergleich zur Kontrolle. Werte wurden als $MW\pm SD$ dargestellt; statistischer Test: one-way-ANOVA; ns = nicht signifikant.

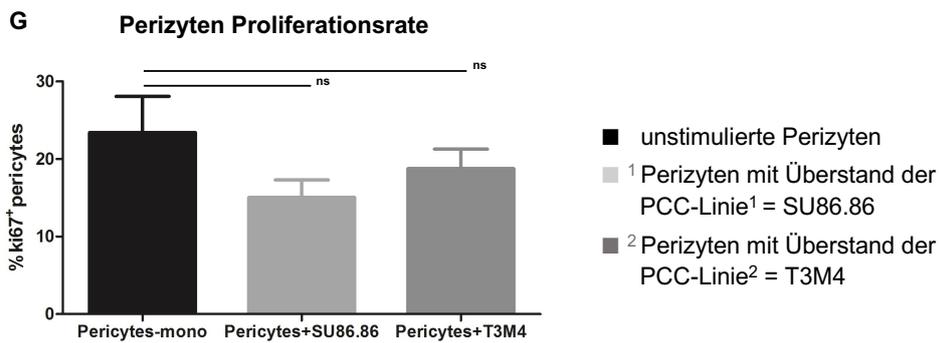
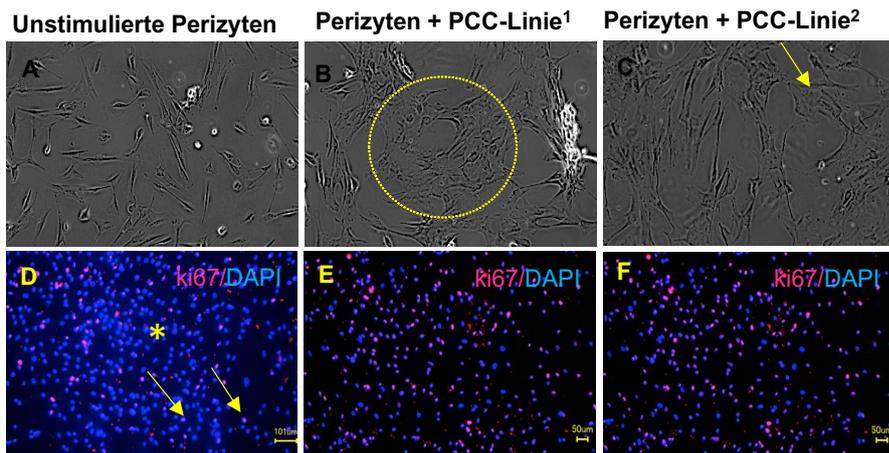


Abbildung 16. Einfluss von Pankreaskarzinomzelllinien (PCC) auf die Proliferationsrate humaner Perizyten. Humane Perizyten wurden für 24 h mit dem Zellüberstand der PCC¹-Linie=SU86.86, sowie der PCC²-Linie= T3M4 inkubiert. **A-C)** Zeigt stimulierte versus nicht-stimulierte Perizyten unter dem Lichtmikroskop. **D-F)** Nach Stimulation wurden Perizyten fixiert und mit dem Proliferationsmarker ki67 (■ rot), sowie die dem DNA-Farbstoff DAPI (■ blau) angefärbt. Proliferierende Perizyten stellen sich pink dar (Pfeile), nicht-proliferierende Zellen stellen sich blau dar (Sterne). **G)** PCC-Linien induzieren keine erhöhte Proliferationsrate in Perizyten im Vergleich zur Kontrolle, Ctrl=23,42 ± 15, Perizyten+PCC¹=15,05±9, Perizyten+PCC²=18,77±8; p=0,0514; Werte wurden als MW±SD dargestellt; statistischer Test: one-way-ANOVA; ns = nicht signifikant.

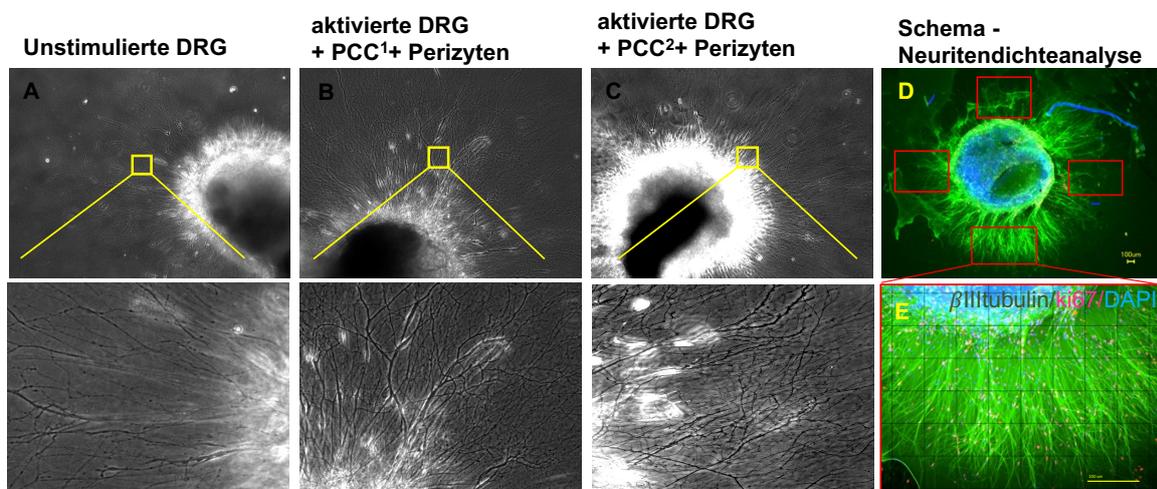
4.5 3D Kokultur Assay

Nerven sind eine wichtige Komponente der Tumormikroumgebung im Pankreaskarzinom. Um ein Einfluss von Nerven auf Perizyten *in vitro* zu untersuchen haben wir ein 3D-Kokultur Modell entwickelt, in dem karzinomzell-aktivierte Nervenzellen innerhalb einer mikrostrukturierten ECM-Gel-Umgebung kultiviert und im Anschluss deren Überstand auf humane Perizyten transferiert wurde. In Vorexperimenten mussten für die Untersuchungen zunächst aktivierte Neurone hergestellt und der Aktivierungszustand validiert werden. Die verwendeten Nervenzellen stammen aus murinen Hinterhornganglien, engl. dorsal root ganglia (DRG). DRG sind ein etabliertes Modell zur Untersuchung neuraler Invasion im Rahmen von Migration-assays. Die „Aktivierung“ der Neurone erfolgt durch 48-stündige Stimulation mit dem Zellüberstand von PCC-Linien. Für die Experimente wurden pro Versuchsgruppe drei komplette thorakale Hinterhornganglien aus 5-10 Tage alten Mäusen isoliert. Anschließend wurden jeweils 3 Ganglien nach Aufbereitung und Aufreinigung (mechanische Dissoziation) in ECM-Gel eingebettet. Durch die Kultivierung der DRG in einer mikrostrukturierten ECM-Gel-Umgebung entsteht eine dreidimensionale Zellkultur. Diese ermöglicht das Aussprossen von Neuriten (Nerven-Fortsätze) entlang des Matrigel/(ECM)-Gerüsts. Für unsere Experimente verwendeten wir analog zu den vorhergehenden Experimenten die PCC-Linie ¹ = SU86.86 und PCC-Linie ² = T3M4.

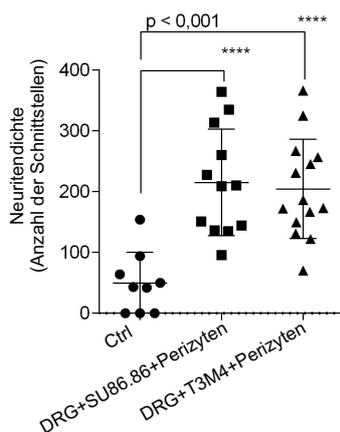
4.5.1 Neuritendichte Assay

Um zu bestätigen, dass tatsächlich eine Aktivierung stattgefunden hat, haben wir die Neuritendichte von stimulierten versus nicht-stimulierten Ganglien gemessen. Hierfür wurden sowohl die aktivierten Ganglien als auch die Kontrollganglien mit dem Neuriten-Antikörper β -III-tubulin (■ grün) angefärbt sowie mit dem Proliferationsmarker ki67 (■ rot) und dem DNA-Farbstoff DAPI (■ blau). Anschließend wurde die Anzahl der Neuriten in vier repräsentativen Fotoaufnahmen pro Ganglion ausgemessen. Abbildung 17.A-C zeigt exemplarisch stimulierte versus nicht-stimulierte Ganglien. Es ist zu erkennen, dass stimulierte Ganglien ein wesentlich dichteres Geflecht von Neuriten im Vergleich zu Kontrollganglien aufwiesen. Abbildung 17.D-E zeigt exemplarisch ein karzinomzellstimuliertes Ganglion nach IF-Färbung. Anschließend wurden pro Ganglion 4 repräsentative Fotoaufnahmen des

Neuritengeflechts angefertigt (Abbildung 17.D rote Quadrate). Mithilfe eines standardisierten Rasters können die Schnittstellen der Neuriten ausgezählt werden (Abbildung 17.E). Diese werden als sog. „number of intersections“ pro Fotoaufnahme angeben. „Number of intersections“ beschreibt die Anzahl an Schnittstellen zwischen Neuriten und Rasternetz. Dem Versuch liegen 3 biologische Replikate zugrunde. Unstimulierte DRG wiesen durchschnittlich $n=50\pm 17$ Schnittstellen auf und nach Stimulation lag die Anzahl der Schnittstellen pro Ganglion bei $\text{DRG}+\text{PCC}^1+\text{Pericytes}=215\pm 88$, bzw. $\text{DRG}+\text{PCC}^2+\text{Pericytes}=205\pm 82$, ($p^{****}<0,0001$; Werte dargestellt als $\text{MW}\pm\text{SD}$; statistischer Test: jeweils Student's t-Test).



F Neuritendichte von DRG + PCC + Perizyten



- nicht-aktivierte DRG mit Überstand von Perizyten
- aktivierte DRG (+PCC-Linie¹=SU86.86) und Perizyten
- ▲ aktivierte DRG (+PCC-Linie²=T3M4) und Perizyten

Abbildung 17. Einfluss von Perizyten und PCC-Linien auf die Neuritendichte von DRG-Neuronen. DRG Neurone wurden für 48h mit dem Zellüberstand der PCC-Linie¹ SU86.86, sowie der PCC-Linie² T3M4 inkubiert und anschließend für 24h mit dem Zellüberstand von humanen Perizyten stimuliert. **A-C)** Zeigt aktivierte versus nicht-aktivierte DRG Neurone. Aktivierte Neurone weisen ein dichteres Netz an Neuriten auf. **D)** DRG Neurone wurden mit dem Neuritenmarker β III-tubulin (■ grün) und dem Proliferationsmarker ki67 (■ rot), sowie dem Zellkernfarbstoff DAPI (■ blau) angefärbt. Zur Auswertung wurden DRG mind. 3 repräsentative Fotoaufnahmen angefertigt (rote Quadrate) **E)** Auf die Fotoaufnahmen wurden ein standardisiertes Gitternetz aus 6x8 Feldern gelegt. Anschließend wurden die Schnittstellen zwischen Neuriten und Gitternetz ausgezählt. **F)** Unstimulierte DRG zeigen pro Gitternetz durchschnittl. $n=50\pm 17$ Schnittstellen, nach Stimulation $\text{DRG}+\text{PCC}^1+\text{Pericytes}=215\pm 88$, bzw. $\text{DRG}+\text{PCC}^2+\text{Pericytes}=205\pm 82$ Schnittstellen, $p^{****}<0,0001$; Werte dargestellt als $\text{MW}\pm\text{SD}$; statistischer Test: jeweils student's t-Test.

4.5.2 Einfluss von aktivierten Neuronen auf Perizyten

Nachdem wir validiert hatten, dass tatsächlich eine Aktivierung der Ganglien durch beide Pankreaskarzinomzelllinien induziert wurde, haben wir erneut aktivierte Neurone generiert und deren Überstand auf humane Perizyten transferiert. Anschließend haben wir die Rate an proliferierenden Perizyten gemessen. Der Proliferations-Index von Perizyten, die mit dem Zellüberstand von aktivierten Neuronen stimuliert wurden, lag bei Perizyten+DRG+PCC¹=25,08±25 (PCC¹ = SU86.86) bzw. Perizyten+DRG+PCC²=16,27±19 (PCC² = T3M4). Kontroll-Perizyten, die mit dem Überstand von nicht-aktivierten Neuronen inkubiert wurden, zeigten eine Proliferationsrate von Ctrl=25,88 ± 24; p=0,83. Aktivierte Neurone induzierten keine erhöhte Proliferationsrate in Perizyten im Vergleich zur Kontrolle. Werte dargestellt als MW±SD; statistischer Test: one-way-ANOVA; ns = nicht signifikant.

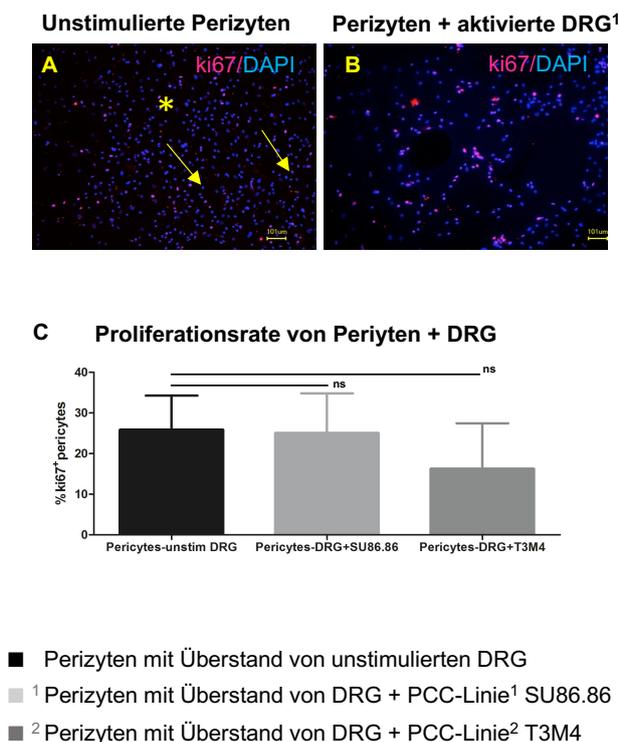


Abbildung 18. Einfluss aktivierter Neurone auf die Proliferationsrate humaner Perizyten. Humane Perizyten wurden für 24 h mit dem Zellüberstand von aktivierten DRG-Neuronen stimuliert. Die Aktivierung der DRG-Neurone erfolgte durch Inkubation mit dem Zellüberstand der PCC-Linie¹=SU86.86, sowie der PCC-Linie²=T3M4. **A&B)** Nach Stimulation wurden Perizyten fixiert und mit dem Proliferationsmarker ki67 (■ rot), sowie die dem DNA-Farbstoff DAPI (■ blau) angefärbt. Proliferierende Perizyten stellen sich pink dar (Pfeile). **C)** Aktivierte Neurone induzieren keine erhöhte Proliferationsrate in Perizyten im Vergleich zur Kontrolle, Ctrl=25,88 ± 24, Perizyten+DRG+PCC¹=25,08±25, Perizyten+DRG+PCC²=16,27±19; p=0,83; Werte dargestellt als MW±SD; statistischer Test: one-way-ANOVA; ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend sind aktivierte Perizyten primär durch einen vergrößerten Zellkörper mit breiten Zellfortsätzen zu erkennen. Dies beobachteten wir als eine Reaktion auf die Stimulation mit dem Überstand von Pankreaskrebskarzinomzelllinien und mit dem Überstand von aktivierten Neuronen. Es geht nicht mit einer erhöhten Proliferationsrate einher. Die phänotypischen Veränderungen bzw. vergrößerte Zelloberfläche haben wir in der nächsten Versuchsreihe genauer untersucht.

4.6 Messung der Zellfläche *in vitro* aktivierter Perizyten

Analog dem bereits beschriebenen Versuchsaufbau (Abschnitt 4.4) wurden humane Perizyten erneut mit dem Überstand der Karzinomzelllinie PCC-Linie¹ = SU86.86 und der Karzinomzelllinie PCC-Linie² = T3M4 stimuliert. Als Kontrolle dienten Perizyten, die ausschließlich FCS-freies Karzinomzellmedium erhielten. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das Experiment beendet. Pro Versuchsgruppe wurden mindestens 6 Einzelfotographien der Zellen im Nativpräparat angefertigt (Abbildung 19.G, Schema). Bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop wiesen stimulierte Perizyten deutlich längere und zahlreiche Zellfortsätze auf (Abbildung 19.A-C, Pfeile).

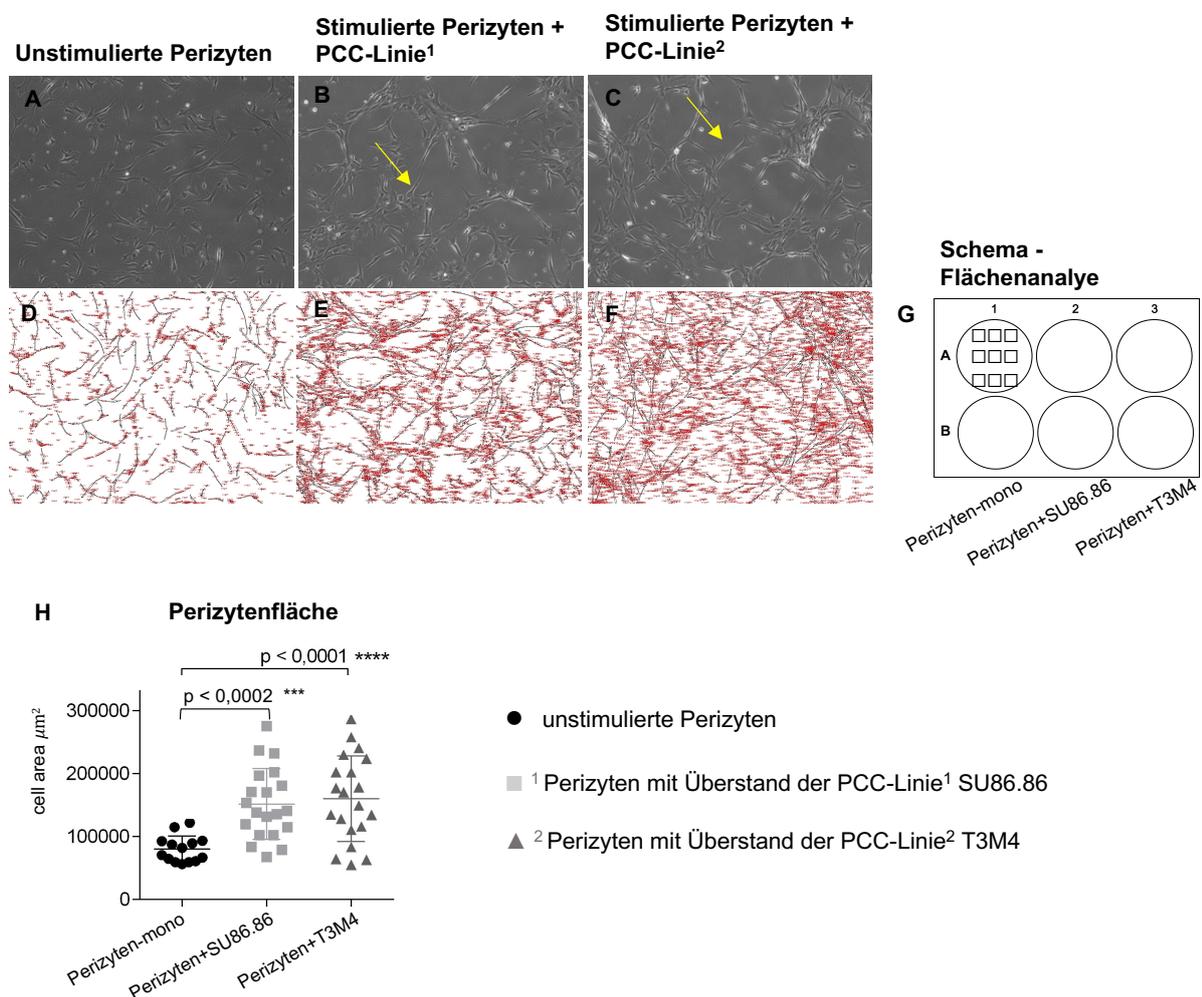


Abbildung 19. Einfluss von Pankreaskrebszelllinien (PCC) auf die Zellfläche von humanen Perizyten. Humane Perizyten wurden für 24 h mit dem Zellüberstand der PCC-Linie¹ SU86.86, sowie der PCC-Linie² T3M4 inkubiert. **A-C)** Zeigt stimulierte versus nicht-stimulierte Perizyten. Stimulierte Perizyten weisen deutlich längere und zahlreiche Zellfortsätze auf (Pfeile). **D-F)** Computersoftware-gestützte Messung der Zelloberfläche von mind. 3x3 repräsentativen Fotoaufnahmen von stimulierten Perizyten und Kontrollen (ImageJ). **G)** Schema des Versuchsaufbaus in einer 6-Wellplatte. Es wurden 3 biologische Replikate angefertigt. **H)** Perizyten+SU86.86 haben eine größere Zellfläche von $A=151.867 \pm 65.000 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$) bzw. Perizyten+T3M4 $A=160.586 \pm 68.000 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0002$) im Vergleich zu unstimulierten Perizyten, Kontrolle $A=80.135 \pm 21.000 \mu\text{m}^2$; Werte dargestellt als MW \pm SD; statistischer Test: jeweils Student's t-Test.

Ferner gruppierten sich stimulierte Perizyten zu Zellklustern. Perizyten+PCC-Linie¹ zeigten eine durchschnittlich größere Zelloberfläche ($A=151.867\pm 65.000\mu\text{m}^2$, $p<0,0001$) bzw. Perizyten+PCC-Linie² ($A=160.586\pm 68.000\mu\text{m}^2$, $p<0,0002$, Abbildung 19.H) im Vergleich zu Kontroll-Perizyten, dessen Zelloberfläche beträgt $A=80.135\pm 21.000\mu\text{m}^2$ betrug. Dem Versuch liegen 3 biologische Replikate zu Grunde, sodass pro Versuchsgruppe mindestens 18 Einzelfotoaufnahmen ausgewertet wurden. Jeder Punkt im Diagramm der Abbildung 19.H stellt eine Einzelfotoaufnahme der jeweiligen Versuchsgruppe dar, welche auf der X-Achse abgebildet sind. Die Zellfläche ist in der Einheit μm^2 auf der y-Achse dargestellt. Werte dargestellt als $MW\pm SD$; statistischer Test: jeweils Student's t-Test.

4.7 Transkriptomanalysen zu aktivierten Perizyten

Um relevante Gene zu identifizieren, die in aktivierten Perizyten verändert exprimiert werden, haben wir ein Micro-Array basiertes Genexpressions-Profilung durchgeführt. Hierfür wurden Perizyten erneut mit dem Überstand von beiden Pankreaskarzinomzelllinien stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Perizyten. Es zeigte sich, dass durch die Stimulation von Perizyten mit Pankreaskarzinomzellen der Linie T3M4 insgesamt 88 von 176 Gen-Sets hochreguliert waren (Abbildung 20.A -B). Von diesen war ein Gen-Set auf einem Signifikanzniveau von $FDR < 25\%$ erhöht, sowie 3 Gene-Sets auf einem Signifikanzniveau von *nominal p value* $< 1\%$, sowie 7 weitere Gen-Sets auf einem Signifikanzniveau von *nominal p-value* $< 5\%$. Hierunter war auch der Angiogenesefaktor, Ang2 (Abbildung 20.A). Die hochregulierten Signalkaskaden umfassten zu 30% Zellzyklusregulation, zu 30% Stoffwechselwege, zu weiteren 30% neuronale Signaltransduktion, sowie zu 10% Entzündungs-assoziierte Signalwege (Abbildung 20.B). In Perizyten, die mit der Tumorzelllinie SU86.86 stimuliert wurden, umfassten die hochregulierten Signalkaskaden zu 30% Entzündungs-assoziierte Signalwege und zu 50% Stoffwechsel-assoziierte Signalwege und zu 20% Signalkaskaden neuronaler Transduktion (Abbildung 20.B, rechts). Insgesamt waren 55 der 176 getesteten Gen-Sets hochreguliert, davon 10 Gen-Sets auf einem Signifikanzniveau von $FDR < 25\%$ erhöht, 7 Gen-Sets auf einem Signifikanzniveau mit *nominal p value* $< 1\%$, sowie 3 Gen-sets auf einem Signifikanzniveau von $< 5\%$. In der Heatmap war das Gen für den Wachstumsfaktor

Angiopoietin2 auf signifikantem Niveau herunterreguliert (Abbildung 20. A, unten). Genexpressionsprofilstudien von tumorzellaktivierten Perizyten deuten auf ein inflammatorisches Genexpressionsprofil hin mit erhöhter Expression von entzündungs- und stoffwechsel-assoziierten Rezeptoren und Wachstumsfaktoren sowie reduzierter Expression der Angiogenese Faktoren, Ang2 und PDGFR.

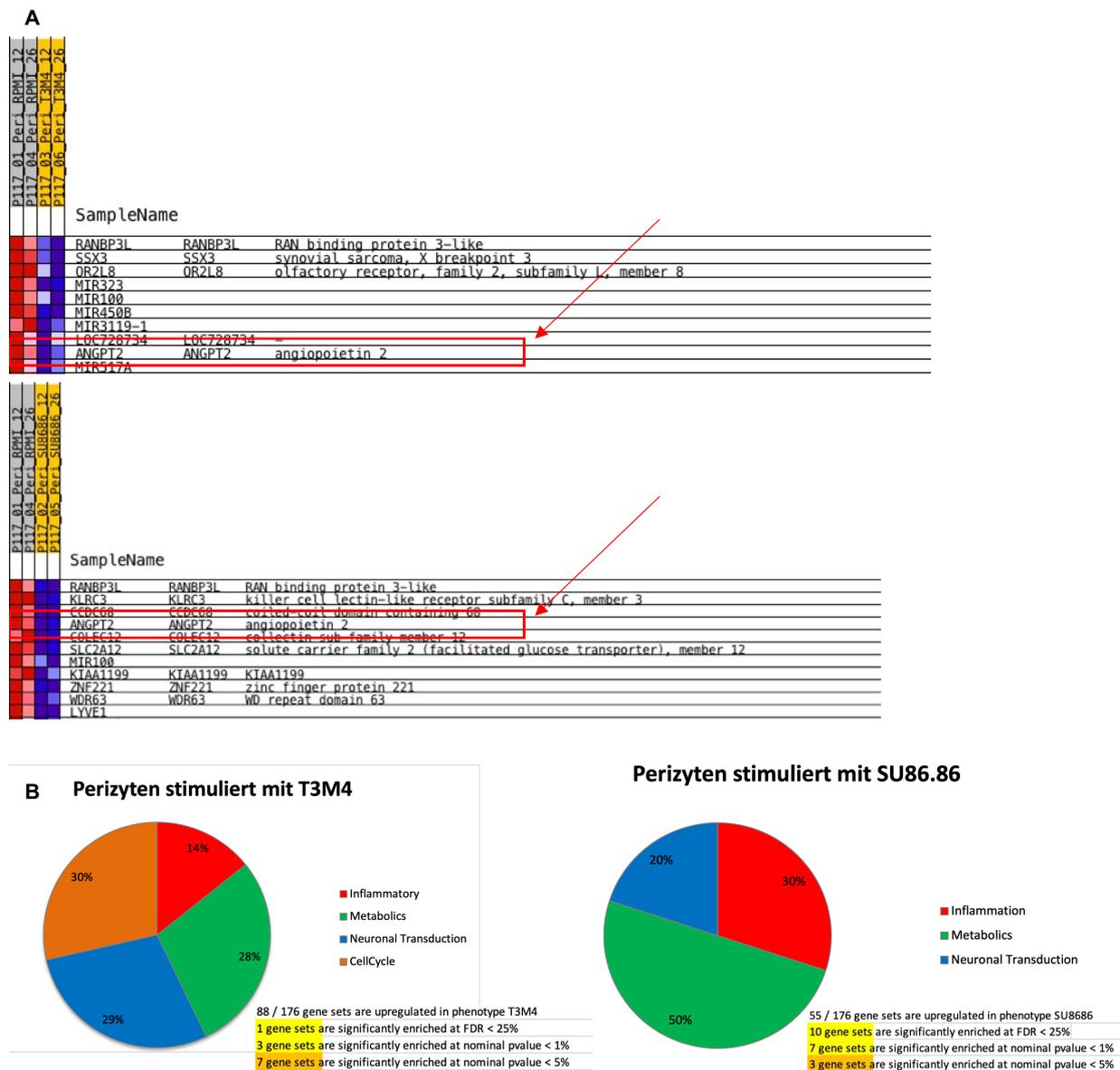


Abbildung 20. Gene set enrichment analysis (GESA) and KEGG Signalweg Analyse von karzinomzell-stimulierten Perizyten. A) Heatmap der 10 am stärksten regulierten Gen-Sets in stimulierten versus nicht-stimulierten Perizyten (oben T3M4 versus Kontrolle bzw. unten SU86.86 versus Kontrolle). Unter den signifikant regulierten Genen war der Angiogenesefaktor Ang2 (Pfeile). **B)** Nach KEGG Signalweg Analyse zeigten die Tortendiagramme die Zugehörigkeit der verändert exprimierten Genen von stimulierten Perizyten (versus Kontrolle) zu den entsprechenden "Signalweg-Familien".

5 Diskussion

In einigen Tumorentitäten wurde die Rolle von Tumorgefäß-assoziierten Perizyten als gate-keeper für hämatogene Metastasierung beschrieben (Xian et al., 2006). Hypoxische, fortgeschrittene Karzinome zeigen oft einen Verlust von Perizyten an Tumorgefäßen, was mit einer hohen Rate hämatogener Metastasierung und niedrigem Gesamtüberleben einhergeht (O'Keeffe et al., 2008; Stefansson et al., 2006; Yonenaga et al., 2005). Dagegen sind Gefäße mit intakter Perizyten-Endothelzellfunktion weniger suszeptibel gegenüber Tumorzellinvasion (McCarty et al., 2007). Das Pankreaskarzinom zeigt eine frühe und ausgeprägte Invasion von Nerven durch Karzinomzellen. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen potenziellen Zusammenhang zwischen Tumorgefäß-assoziierten Perizyten und neuraler Invasion zu untersuchen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass Tumorgefäße im Pankreaskarzinom eine erhöhte Bedeckung von α SMA-positiven und CD146-positiven Perizyten als im gesunden Pankreasgewebe aufweisen. Eine der ersten Studien, die sich mit Perizyten an Tumorgefäßen befasst hat und Perizyten-Indices in verschiedenen Tumorentitäten verglichen hat, demonstrierte, dass eine erhebliche Variabilität des PCIs innerhalb der verschiedenen Tumorentitäten besteht (Eberhard et al., 2000). Im Mammakarzinom wurde eine durchschnittliche Perizyten-Coverage von 68 % ermittelt (Eberhard et al., 2000). Das Kolorektalektkarzinom besitzt ebenfalls eine sehr hohe durchschnittliche Perizyten-Coverage von 70% (Yonenaga et al., 2005). Der niedrigste PCI findet sich beim Harnblasenkarzinom, mit circa 11% (O'Keeffe et al., 2008). Das Pankreaskarzinom liegt nach unseren Analysen mit einem PCI von 40% ungefähr im Mittelfeld. Der Grund für die Heterogenität des Perizyten Vorkommens wird in der destabilisierenden Wirkung von Angiogenese-Faktoren, wie zum Beispiel VEGF und Ang2 auf die Perizyten-Rekrutierung vermutet (Eberhard et al., 2000; Raza et al., 2010). Karzinome mit dichtem Gefäßnetz und VEGF-getriebener Tumorangio-genese, wie das Glioblastom und Nierenzellkarzinom, weisen in den meisten Studien eine niedrige Perizyten-Coverage auf (Eberhard et al., 2000; Raza et al., 2010). Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese formuliert, dass die Ausstattung mit Perizyten am Tumorgefäßbetts bestimmt, wie anfällig Gefäße für die Invasion von Tumorzellen sind (Eberhard et al., 2000; Raza et al., 2010). Da das Pankreaskarzinom als ein tendenziell hypoxischer Tumor gilt, rechneten wir analog der oben beschriebenen Theorie mit

einer VEGE-F- und Ang2-getriebenen dysfunktionalen Angiogenese und mit einem konsekutivem Perizyten-drop-out. Dies scheint im Pankreaskarzinom nicht zwangsläufig der Fall zu sein. Unsere Daten deuten eher auf eine Aktivierung von Perizyten im Pankreaskarzinom hin. Diese kann im Kontext einer frühen Aktivierung der Tumormikroumgebung des Pankreaskarzinoms interpretiert werden. Die Diskrepanz zwischen den Perizyten-Indices auf Basis von α SMA und CD146 spricht möglicher Weise dafür, dass unterschiedliche Perizytenpopulationen durch die von uns verwendeten Antikörper erfasst werden. Perizyten, die sich an Kapillaren („microvessels“) befinden exprimieren kein α SMA und besitzen kleine Zellkörper mit langen schlanken Zellfortsätzen (Armulik et al., 2011). Dagegen ähneln α SMA-positive Perizyten morphologisch eher glatten Muskelzellen mit einer großen Zelloberfläche (Armulik et al., 2011; Holm et al., 2018). Unsere Daten unterstützen diese Beobachtungen auch deshalb, weil der PCI auf Basis von α SMA 40% beträgt und in der identischen Kohorte für mikrovaskuläre Perizyten circa 20% beträgt. In beiden Fällen liegt dem Perizyten-Index jeweils die gesamte Perizyten-Zellfläche in Relation zur Gefäßfläche zu Grunde. Die Gegenüberstellung des PCIs bzw. PCVs in Karzinomgewebe versus gesunde Gewebe zeigt, dass der Anteil an mikrovaskulären Perizyten stärker ansteigt. Daher vermuten wir, dass insbesondere kleine Gefäße bzw. Kapillaren von einem mikrovaskulären Umbau mit vermehrtem Perizyten-Vorkommen betroffen sind. Für die Identifikation von Perizyten richteten wir uns nach den durch Armulik et al. postulierten Kriterien. Demnach sollte eine Analyse von Perizyten auf mindestens zwei verschiedenen etablierten Perizyten-Antikörpern basieren. Außerdem sollte bei der Untersuchung von Perizyten ein Gefäßendothelmarker als sog. „Negativ-Antikörper“ berücksichtigt werden, um eine Abgrenzung zum Gefäßendothel nachzuweisen. Die Darstellung von Perizyten sollte mittels hochauflösender Mikroskopie erfolgen, wobei Elektronenemissionsmikroskopie nicht vorausgesetzt ist. In der Regel berücksichtigen die meisten Untersuchungen von Perizyten in humanen, formalinfixierten Gewebeschnitten lediglich repräsentative Ausschnitte mit einer definierten Größe. Für diese als „hot-spots“ oder „region of interest (ROI)“ bezeichneten Ausschnitte wählen die Untersucher meistens Areale, die vornherein einer hohen Gefäßdichte unterliegen. Dadurch basieren diese Analysen auf vorselektionierten Gewebebereichen. Unsere Analysen hingegen berücksichtigten den gesamten histologischen Gewebeschnitt ohne Vorselektion von hot-spots bzw. ROIs. Wir gehen daher davon aus, dass die hier vorgelegten Ergebnisse ein

umfassenderes Bild des Perizytenvorkommens im humanen Pankreaskarzinom darstellen und deshalb der Perizyten-Index im Falle einer reinen hot-spot bzw. ROI Analyse möglicher Weise noch ausgeprägter wäre. Bei der Untersuchung von Perizyten sollten immer potenzielle Störfaktoren berücksichtigt werden. Wir konnten durch Verwendung des Antikörpers anti-CD146 neben vaskulären Perizyten auch Inselzell-assoziierte Perizyten, Nerven und Immunzellen detektieren. In der Literatur ist beschrieben, dass anti-CD146 auch von Fibroblasten und MSCs (mesenchymalen Stammzellen) exprimiert wird (Q. Li et al., 2003; Middleton et al., 2005; Sacchetti et al., 2007). Im Tumorstroma ansässige Fibroblasten, sog. „cancer associated fibroblasts - CAFs“ exprimieren ebenfalls das Antigen CD146 (Covas et al., 2008). Das gleiche gilt für die Verwendung des Antikörpers anti- α SMA als sog. Perizytenmarker. Auch dieser bindet an Myofibroblasten und pankreatische Sternzellen. Alle der oben genannten Zellen stellen wesentliche Komponenten des Tumorstromas im Pankreaskarzinom dar. Wir konnten jedoch ausschließen, dass die genannten Zellen als Störfaktoren in die Auswertung mit eingingen, weil ausschließlich das Gewebe unmittelbar um die Gefäße analysiert wurde. Zellen, die sich in Bereichen jenseits des peri-endothelialen Kompartiments befanden, wurden grundsätzlich ausgeschlossen. Alle Zellen innerhalb des peri-endothelialen Kompartimentes mit Expression der obengenannten Zell-Marker können per definitionem als Perizyten angesehen werden (Armulik et al., 2011).

Zur Erklärung des von uns nachgewiesenen vermehrten Perizyten-Vorkommens im Pankreaskarzinom können die folgenden Hypothesen in Betracht gezogen werden: (i) verstärkte Proliferation von präexistenten, gewebsansässigen Perizyten durch Aktivierung, (ii) vergrößerte Zellfläche von gewebsansässigen Perizyten durch z.B. Transdifferenzierung oder im Sinne einer Zellhypertrophie, (iii) vermehrte Rekrutierung bzw. Migration von Perizyten aus dem Knochenmark oder alternativen Stammzellquellen.

Pankreaskarzinomzellen sezernieren Wachstumsfaktoren, wie z.B. platelet-derived growth factor (PDGF) (Ebert et al., 1995), transforming growth factor β (TGF β) (Friess et al., 1993), fibroblast growth factor (FGF) und weitere Cytokine (Bachem et al., 2008), die bei Rezeptorbindung in Form von autokrinen Signalschleifen eine autonome Zellproliferation anregen und gleichzeitig parakrin Zellen der Tumormikroumgebung stimulieren können. Am Beispiel von pankreatischen Sternzellen (PSCs) konnte der proliferative Einfluss von Pankreaskarzinomzellen

bereits demonstriert werden. PSCs (trans-) differenzieren bei *in vitro* Stimulation mit dem Zellüberstand von Pankreaskarzinomzellen in α SMA-produzierende Myofibroblasten und weisen eine erhöhte Zellproliferationsrate auf (Bachem et al., 2005). Dieses Beispiel für die Wechselwirkung zwischen Zellen des TMEs und Karzinomzellen ist in vergleichbarer Weise auch für Perizyten denkbar. Nach unseren Beobachtungen reagieren Perizyten *in vitro* ähnlich wie Sternzellen auf Stimulation mit Pankreaskarzinomzellen, allerdings mit dem wesentlichen Unterschied keine erhöhte Proliferationsrate aufzuweisen. Obwohl bekannt ist, dass Perizyten die korrespondierenden Rezeptoren zu den oben aufgeführten Liganden exprimieren (PDGFR-beta, TGFR-beta-2/Akl1, Erb-2) und diese im Zusammenhang mit erhöhter Zellproliferation beschrieben wurden, legen unsere Daten nahe, dass eine Aktivierung von Perizyten nicht zwangsläufig mit erhöhter Proliferation einhergehen muss. Eine denkbare Erklärung für die niedrige *in vitro* gemessene Proliferationsrate von Perizyten wäre, dass eine erforderliche Mindestkonzentration der Liganden (PDGF-beta und TGF-beta1), die für einen proliferativen Effekt notwendig ist, nicht in ausreichendem Maße im Überstand der Karzinomzellen enthalten ist. Es ist weiterhin denkbar, dass die Wachstumskinetik der Perizyten nicht zum richtigen Zeitpunkt erfasst wurde. Ferner wäre ein zweistufiger Prozess denkbar, infolgedessen es zuerst zu einer veränderten Zellmorphologie und anschließend einer erhöhten Proliferationsrate kommt. Dennoch gibt es Parallelen zwischen Perizyten und pankreatischen Sternzellen, da sie einen gemeinsamen embryologischen Ursprung aufweisen. Perizyten, Fibroblasten, Myofibroblasten und pankreatische Sternzellen entwickeln sich während der Embryogenese im Rahmen der Epithelialen-zu-Mesenchymalen Transition (EMT) aus dem Epithel des Mesoderms, auch Mesothel genannt, und migrieren anschließend in unterschiedliche Zellkompartimente (Armulik et al., 2011). Im Rahmen adulter Angiogenese ist ebenso beschrieben, dass sich Perizyten aus gewebesansässigen, mesenchymalen Stammzellen entwickeln können, die auch als potenzielle Quelle von Myofibroblasten und Sternzellen diskutiert werden (Birbrair et al., 2014). Es gibt bisher keine Untersuchungen, ob sich Perizyten auch direkt aus pankreatischen Sternzellen ableiten können bzw. ob PSCs direkt in Perizyten transdifferenzieren können.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den erhöhten Perizyten-Index im Pankreaskarzinomgewebe wäre, dass karzinomzellaktivierte Perizyten transdifferenzieren und als Ausdruck dessen längere Zellausläufer ausbilden, was sich

insgesamt in einer erhöhten Zelloberfläche äußert. Formell geht in den Perizyten-Index die gesamte Perizyten-Zellfläche in Relation zur Gefäßfläche ein. Es ist möglich, dass die vergrößerte Zelloberfläche vor allem auf die verlängerten Zellausläufer von transdifferenzierten Perizyten im Pankreaskarzinom zurückzuführen ist. Dies konnten wir durch die *in vitro* Messung der Zelloberfläche von aktivierten Perizyten nachvollziehen. Hierbei wäre eine Zellhypertrophie denkbar. Jedoch beschreibt Zellhypertrophie formell einen Prozess, bei dem es vorrangig durch intrazelluläre Flüssigkeitseinlagerung zu einer Vergrößerung des Zellkörpers kommt. Ebenso ist eine Hypertrophie *per definitionem* nicht durch karzinomatöse De-differenzierung bedingt. Eine offensichtliche De-differenzierung humaner Perizyten, z.B. in Richtung enthemmter Proliferation, konnten wir durch *in vitro* Stimulation mit Pankreaskrebszelllinien nicht nachweisen. Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren aus dem Überstand der Pankreaskarzinomzellen hat lediglich für die Dauer von 24h stattgefunden, was für die Induktion eines De-differenzierungsprozesses zu kurz erscheint. Vergleichbare Veränderungen der Morphologie von Perizyten an Tumorgefäßen wurden von Morikawa et al. im Jahr 2002 beschrieben, die in drei verschiedenen Tumormausmodellen (Insulinommausmodell, Brustkrebsmausmodell und Lewis-Lung Karzinommodell) veranschaulichten, dass Tumorperizyten ungewöhnlich lange zytoplasmatische Zellfortsätze aufweisen, die weit in das Tumorstroma hineinreichen. Die Zellfortsätze waren bis zu 80% länger als Endothelzellfortsätze und besonders ausgeprägt an Gefäßknospen ("angiogenic sprouts") vorhanden. Außerdem wurde ein Verlust der engen räumlichen Beziehung zu Endothelzellen beschrieben (Morikawa et al., 2002). In unseren Analysen im humanen Pankreaskarzinom war die typische enge Assoziation zwischen Perizyten und Endothelzellen ebenfalls aufgehoben. Morikawa et al. zeigten weiterhin, dass >97% der Tumorgefäße in den untersuchten Mausmodellen mit α SMA-positiven Perizyten assoziierte waren. Unter Berücksichtigung der von uns *in vitro* beobachteten Veränderungen von karzinomzellstimulierten Perizyten und derer von Morikawa et al., erscheint es wahrscheinlich, dass der erhöhte Perizyten-Index im Pankreaskarzinom primär durch eine vergrößerte Zelloberfläche von Perizyten bedingt ist, die wiederum Ausdruck einer Transdifferenzierung sein könnte.

Theoretisch ist eine verstärkte Rekrutierung von Perizyten aus externen Stammzellnischen zu Tumorgefäßen des Pankreas in Betracht zu ziehen. Die Rekrutierung von Perizyten wird über verschiedene Liganden-Rezeptor-Komplexe

vermittelt (z.B. PDGF-B/PDGFR β , SDF1 α /CXCR4, HB-/ErbEGF, Ang1/Tie2), wobei die PDGFR-beta Achse eine der entscheidenden darstellt (Armulik et al., 2011). Endothelzellen sezernieren PDGF-B während der Angiogenese, sodass Perizyten entlang eines Chemotaxis Gradienten durch PDGF-beta-Rezeptorbindung zu Endothelzellen rekrutiert werden. PDGF-Rezeptor-knockout resultiert in nicht-tumorbelasteten Mausmodellen in durchlässige Gefäße mit Aneurysmen und Hämorrhagien (Levéen et al., 1994). Vergleichbar mit einer physiologischen, adulten Angiogenese werden Perizyten während Tumorangioene ebenfalls via PDGF-B/PDFGR β Signaling zu Tumorgefäßen rekrutiert (Hellström et al., 1999). Interessanter Weise kann die Endothelzell-Perizyten Bindung bzw. der Perizyten-Index durch PDGF β Depletion in Tumormausmodellen herabgesetzt werden und sogar durch PDGF-B Re-expression in Karzinomzellen wiederhergestellt werden (Abramsson et al., 2003). Allerdings bleibt die Endothel-Bindung dysfunktional (Armulik et al., 2011). Daher erscheint für die Vermittlung einer intakten Perizyten-Endothelzell Bindung eine Endothelzell-spezifische PDGF-B Expression notwendig zu sein (S. Song et al., 2005). Vor diesem Hintergrund könnte PDGF-B Sekretion durch Pankreaskarzinomzellen einen erhöhten Perizyten-Index erklären. Da es sich hierbei nicht um endothelzellspezifische PDGF-B Expression handelt, bleibt die Perizyten-Endothelzell-Bindung dysfunktional mit dem oben beschriebenen veränderten perizytären Phänotyp. Es ist eine kompensatorische Achse zur Rekrutierung von Perizyten beschrieben worden (N. Song et al., 2009), die via PDGF-B Sekretion von Tumorzellen die Expression von SDF1 α via HIF-1 α in Endothelzellen induziert. SD1 α kann so einen kompensatorischen Chemotaxis Gradienten zur Perizytenrekrutierung aufbauen, was zu einer intakten Anlagerung von Perizyten führt (N. Song et al., 2009). Alternativ könnten sich Perizyten auch von adulten pluripotenten Stammzellen ableiten, die entweder im Knochenmark ansässig sind (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSK) und während der Tumorinitiierung über den Blutstrom rekrutiert werden („blood-born“) oder von gewebsansässigen adulten Stammzellen (MSC) (Armulik et al., 2011). Durch LacZ – Expression in murinen Perizyten konnte nachvollzogen werden, dass bei Injektion von Tumorzellen die LacZ-positiven Perizyten zu Tumorgefäßen rekrutiert wurden. Gleichzeitige Injektion von Tumorzellen und LacZ- exprimierenden murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) zeigte, dass auch exogen zugeführte MEFs zu Tumorgefäßen rekrutiert werden, wobei hier der Pool an zur Verfügung stehenden exogenen bzw. wirtseigenen MSCs als

limitierender Faktor für die Perizyten-Coverage diskutiert wurde (Abramsson et al., 2002). Dies könnte bedeuten, je größer der Pool an rekrutierbaren MSCs desto höher das Potential eines erhöhten Perizyten-Index. Das Pankreaskarzinom besitzt tatsächlich eine MSC-Nische, die als Quelle für Perizyten in Frage käme. Neben pankreasansässigen MSC wurden aus dem Knochenmark rekrutierbare, mesenchymale Stammzellen bereits nachgewiesen. Bei Transplantation von GFP+positivem MSCs in das Knochenmark bestrahlter Mäuse ist eine spezifische Anreicherung von GFP+positiven Zellen in perivaskuläre Kompartimente nachvollziehbar, die via SDF-1 α Signaling vermittelt wird (Du et al., 2008). Vergleichbares ist für den Ursprung sog. „cancer-associated fibroblasts - CAFs“ im Adenokarzinom des Magen beschrieben worden. Während der Tumorprogression expandieren MSCs im Knochenmark und werden SDF1 α -und TGF-beta-abhängig über den Blutkreislauf zu neoplastischen Läsionen rekrutiert (Quante et al., 2011). Hier siedeln sich die Zellen an, um eine neue MSC Nische zu generieren, die als Ursprung für CAFs angesehen wird und ihrerseits unterstützend zur Tumorprogression beitragen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich weiterhin mit der Untersuchung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen Angioinvasion (hämatogener Metastasierung) und Neuroinvasion. Den Anstoß dafür gaben die Ergebnisse einer von unserer Arbeitsgruppe etablierten Kombination aus Immunfluoreszenz- und Immunhistochemischer Antikörper-Färbung. Mit dieser Tripel-Färbung konnten simultan intrapankreatische Nerven, Tumorgefäße und Krebszellen in humanen Pankreaskarzinompräparaten und Kolorektalkarzinomen dargestellt werden. Die Analysen ergaben interessanterweise, dass Pankreaskarzinome (PCA) und Kolorektalkarzinome (CRC) mit einem hohen Anteil vaskularisierter Gewebefläche gleichzeitig einen hohen Anteil innervierter Tumorfläche aufwiesen (PCA: $p = 0,04$ und CRC: $p = 0,04$). Dies deutete auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Angiogenese und Neurogenese in Adenokarzinomen hin. Bemerkenswert war, dass Kolorektalkarzinome mit gering vaskularisierter Tumorfläche gleichzeitig ein großes Ausmaß neuraler Invasion aufwiesen ($p = 0,046$). Umgekehrt wiesen stark vaskularisierte Kolorektalkarzinome eine geringere Anzahl befallener Nerven auf. Dieser Befund unterstützte die Hypothese, dass geringe Tumolvaskularisation zum vermehrten Befall von Nerven beitragen könnte. Beim Pankreaskarzinomen stellte sich das Ergebnis der Tripel-Färbung komplexer dar: es konnte zwar eine starke

Tendenz einer positiven Korrelation zwischen innervierter Tumorfläche und neuraler Invasion festgestellt werden ($p = 0,059$), allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen Vaskularisation und neuraler Invasion ($p = 0,097$). Dies führte zu der Hypothese, dass nicht die Tumolvaskularisation als rein numerische Anzahl vorhandener Tumorgefäße, sondern die Gefäßdurchlässigkeit der entscheidende Einflussfaktor bei der pankreaskarzinomtypischen neuralen Invasion darstellt. Dies gab Anlass die Struktur und Durchlässigkeit von Tumorgefäßen im humanen Pankreaskarzinom zu untersuchen, welche maßgeblich von Perizyten reguliert wird. Unsere Analyse konnte keine Korrelation zwischen Perizyten-Index und dem Score für neurale Invasion feststellen. Deshalb gehen wir im Pankreaskarzinom nicht von einem direkten Zusammenhang zwischen Angio- und Neuroinvasion aus. Aktuelle Studien zeigen, dass ein Zusammenspiel verschiedener Mechanismen zu neuraler Invasion führt. Entscheidend ist die Sekretion neurotropher Faktoren wie NF, Armin und Pleiotrophin sowie die Aktivierung zytoskeletaler Komponenten und axon guidance Molekülen in Tumorzellen. Daneben scheint die Aktivierung von Gliazellen (Schwanzellen) ein weiterer wichtiger Mechanismus zu sein (Demir et al., 2017). Letztendlich ist der Aufbau eines Chemotaxis-Gradienten entscheidend, entlang dessen Karzinomzellen die Nerven über die perineurale Scheide bis ins Endoneurium invadieren (Demir et al., 2015). Als Quelle neurotropher Faktoren wurden Tumorzellen und Nerven, aber auch endoneuralen Makrophagen und Mastzellen identifiziert (Demir et al., 2012, Demir et al., 2013) Da man von einem gegenseitigen Tropismus zwischen Pankeaskarzinomzellen und Nerven ausgeht, war es ebenso von Interesse, im Rahmend des 3D Kokultur Assays den Einfluss von Karzinomzellen, Nerven und Perizyten *in vitro* zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit führte insbesondere die Ko-Stimulation von DRG mit Zellüberstand von Pankreaskarzinomzelllinien und Perizyten zu einer erheblich gesteigerten Neuritendichte. Interessanterweise produzieren humane Perizyten-Zelllinien ebenfalls neurotrophe Faktoren (GDNF und BDNF), und zwar in vergleichbaren Mengen wie zum Beispiel kultivierte Astrozyten (Shimizu et al., 2012; Sweeney et al., 2016). Demnach ist es denkbar, dass Perizyten als eine alternative oder zusätzliche Quelle neurotropher Faktoren die Rolle von Co-Induktoren wahrnehmen. Umgekehrt zeigte sich im Rahmen unserer Experimente, dass der Überstand aktivierter (karzinomzell-stimulierter) DRG keinen Einfluss auf Perizyten hat (kein erhöhter ki67-Index), sodass nicht von einem gegenseitigen Effekt auszugehen ist. Die funktionelle Bedeutung von Perizyten als Quelle neurotropher

Faktoren ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Shimizu et al. schlagen vor, dass die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sowie der Blut-Nerv-Schranke, wesentlich über die Sekretion neurotropher Faktoren von Perizyten reguliert wird. Ein weiteres Beispiel für Neuro-Perizyten-Interaktion zeigte eine Studie, in der lediglich Perizyten-Medium dazu in der Lage war, Insulinsensitivität in hypothalamischen Neuronen zu steigern (Takahashi et al., 2015). Neben Perizyten gelten auch pankreatische Sternzellen als Quelle neurotropher Faktoren und Mediatoren neuroplastischer Veränderungen im Pankreaskarzinom (Zhou et al., 2012). Übereinstimmend mit der oben beschriebenen Hypothese, weisen DRG Neurone in Anwesenheit von pankreatischen Sternzellen ebenfalls eine erhöhte Neuritendichte und Neuritenaussprossung auf (X. Li et al., 2014). Zusammenfassend halten wir fest, dass Perizyten eine Rolle in der Pathogenese neuropathischer Veränderungen im Pankreaskarzinom spielen könnten, da sie erstens zusammen mit Pankreaskarzinomzellen eine erhöhte Neuritendichte *in vitro* generieren und zweitens in der Literatur als Quelle neurotropher Faktoren beschrieben wurden und drittens eine ontogenetischen Verwandtschaft zu Sternzellen aufweisen, die ebenfalls als Co-Mediatoren für Neuroplastizität im Pankreaskarzinom gelten. Perizyten könnten demnach eine potenzielle Rolle als Co-Mediatoren neuroplastischer Veränderungen im Pankreaskarzinom wahrnehmen.

Allgemein sind Perizyten als relevanter Teil der Tumormikroumgebung (TME) im Pankreaskarzinom zu sehen, welche von D. Hanahan und R.A. Weinberg seit 2011 in den Meilensteinen der Karzinogenese beschrieben wird. Unsere Daten deuten ebenfalls auf eine potenzielle Rolle von Perizyten innerhalb des TME hin. Aus diesem Grund haben wir Perizyten während der Tumorprogression im KPC Mausmodell untersucht. Dazu wurde der Perizyten-Index in Pankreaskarzinommausmodellen zu einem prämaligen Stadium (PanIN-Stadium) und zu einem Zeitpunkt des invasiven Tumorwachstums erhoben. Das verwendete KPC Mausmodell zeichnet sich durch den schrittweisen Progress von intraepithelialer Neoplasie (PanIN) zu einem invasivem duktalem Adenokarzinom aus (Hingorani et al., 2003). Die verstärkte perizytläre Aktivierung während des Initiierungsstadium (PanIN Stadium) ging mit der vermehrten Expression des Oberflächenantigen NG2 einher. NG2 ist in der Literatur in Zusammenhang mit aktivierten Perizyten beschrieben worden und wird verstärkt während Angiogenese und Gefäßremodelling von Perizyten exprimiert (Birbrair, 2018). Im invasiven Tumorstadium der KPC Mauslinie ist der Perizyten-Index im

Vergleich zum Vorläuferstadium niedriger, blieb aber über dem Niveau des im normalen Gewebe gemessenen Perizyten-Index. Insgesamt zeichnet sich hier ein dynamischer Prozess der Perizyten-Aktivierung im Laufe der Tumorprogression ab, der in ähnlicher Form auch für das tumormicroenvironment im Allgemeinen beschrieben wurde (Quail et al., 2013). Aktuelle Studien gehen davon aus, dass die Gesamtheit der tumorumgebenden Zellen, insbesondere Immunzellen, zu Beginn der Karzinogenese aktiviert sind und inhibierend auf das Wachstum neoplastischer Zellen einwirken. Erst im Laufe der Tumorprogression findet eine sogenannte „Umprogrammierung“ in ein „tumorpermissives“ Mikroenvironment statt (Kleeff et al., 2016; Quail et al., 2013). Damit schafft sich der Tumor sein „eigenes“ unterstützendes Umfeld. Diese Theorie ist auch für die Rolle von Perizyten im Pankreaskarzinom denkbar. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsprofilstudien von tumorzellaktivierten Perizyten deuteten auf ein inflammatorisches Genexpressionsprofil hin mit erhöhter Expression von entzündungs- und stoffwechsel-assoziierten Rezeptoren und Wachstumsfaktoren sowie reduzierter Expression der Angiogenese Faktoren, Ang2 und PDGFR. Für pankreatische Sternzellen ist die kontextabhängige, bidirektionale Rolle innerhalb des TME bereits demonstriert worden (Apte et al., 2013). Eine prokarzinogene Wirkung von PSC wurde in einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Analysen anschaulich dargestellt und umfasst unter anderem den direkten proliferativen, pro-migratorischen und anti-apoptotischen Einfluss auf Pankreaskarzinomzellen (Bachem et al., 2008). Weiterhin können PSC in Interaktion mit anderen Stroma-assoziierten Zellen treten, zum Beispiel Immunzellen, Nerven und Endothelzellen, die wiederum ihrerseits Tumorwachstum fördern (Kleeff et al., 2016, Apte et al., 2013). Ganz wesentlich trägt auch die von PSCs vermittelte, ausgehende desmoplastische Reaktion über zahlreiche Mechanismen zu der tumorpermissiven Wirkung des TME bei. Bei Pankreaskarzinompatienten führt sie zu einer Kompression intratumoraler Gefäße und stellt eine Barriere für intravenös verabreichte Chemotherapeutika dar. Demgegenüber stehen Studien, die einen protektiven Effekt von Sternzellen bzw. des desmoplastischen Tumorstromas und den darin residenten CAFs dargestellt haben (Ozdemir et al., 2014; Rhim et al., 2014). Genetische und pharmakologische Tumorstromadepletion via Sonic hedgehog (Shh) führte zu aggressiveren und undifferenzierten Tumoren mit erhöhter Vaskularität und Tumorproliferation (Rhim et al., 2014). Ebenso beschleunigte eine Depletion von CAFs und der damit einhergehenden Tumorfibrose in Pankreaskarzinommausmodellen die

Tumorprogression über Immunsuppression durch CD4+Foxp3+Treg Anreicherung (Ozdemir et al., 2014). Die Ergebnisse der oben genannten Studien verdeutlichen, dass die Folgen einer Tumorstroma-Ablation als Therapieoption des Pankreaskarzinoms schwer vorherzusehen sind. Der Einfluss des TME auf die Tumorprogression verändert sich kontextabhängig und zeitabhängig (Ozdemir et al., 2014). Es existieren verschiedene Indices, die den Aktivierungsgrad des TME beschreiben. Zu diesen zählt der sog. activated stroma index (*Anilin-positive* Kollagen Tumorfläche im Verhältnis zu α SMA-positiver Tumorfläche), Immunzellinfiltration oder neurale Invasion (Erkan et al., 2008). Der Perizyten-Index könnte ebenso als ein weiterer Marker für den Aktivierungszustand des tumor microenvironment dienen und auf diese Weise zu einer zielgerichteten und personalisierten Tumorthherapie beitragen. Die Notwendigkeit weiterer Ansätze in der anti-angiogenen Krebstherapie ist erforderlich, insbesondere vor dem Hintergrund eines dynamischen tumor microenvironments (Bisacchi et al., 2003; T. Li et al., 2018).

Das grundsätzliche Prinzip der anti-angiogenen Krebstherapie geht auf Judah Folkman zurück, der 1971 postulierte, dass jeder Tumor im Prinzip von Angiogenese anhängig ist (Folkman, 1971; Holleb et al., 1972). Tumorneoangiogenese ist ein akzeptierter Meilenstein in der Karzinogenese (Hanahan et al., 2011). Auf dieser Theorie beruht der lange etablierte Ansatz, dass sich durch die Blockade von Angiogenesefaktoren (anti-VEGEF-Therapie, z.B. Bevacizumab) Tumorwachstum limitieren lässt (Bergers et al., 2005; Pietras et al., 2005). In der Tat konnte dies in einigen Tumorentitäten bestätigt werden (Bergers et al. 2005, Pietras et al., 2005). Dennoch sind nicht wenige Malignome unerwarteter Weise resistent gegenüber einer reinen anti-VEGEF Therapie. In diesem Zusammenhang haben Perizyten zunehmend an Interesse in der Grundlagenforschung gewonnen. Die Überlegung bestand darin, dass Perizyten eine endothelzell-spezifische Abhängigkeit vom Angiogenese Faktor VEGF abmildern, wodurch der Effekt der anti-angiogenen Therapie abgeschwächt wird (Bergers et al., 2005). Gleichzeitig wurde angenommen, dass Perizyten eine physische Barriere gegenüber anti-angiogenen Medikamenten darstellen. Durch eine duale Inhibition von Endothelzellen und Perizyten versprach man sich folglich eine effektivere Hemmung der Tumorangiogenese (Bergers et al., 2003; Ozdemir, 2006). Tatsächlich konnte in einer *proof-of-concept* Studie Tumorwachstum signifikant durch duale anti-VEGEF und anti-PDGFR Therapie (Sunitinib) gesenkt werden (Bergers et al., 2005; Pietras et al., 2005). Ein Kritikpunkt an diesen Studien bestand darin, dass

die Rate an Fernmetastasen nicht berücksichtigt wurde (Cooke et al., 2012). Cooke et al. zeigten, dass durch genetischen knock-out bzw. pharmakologische PDGF-R Inhibition in Mäusen zwar Tumorwachstum gesenkt werden könnte, allerdings stieg die Rate an Fernmetastasen an (Cooke et al., 2012). Die Perizytendepletion war ferner mit erhöhter Tumorphoxie und epithelialer-zu-mesenchymaler-Transition (EMT), sowie Met-Rezeptor Aktivierung verbunden (Cooke et al., 2012). Met-Rezeptor Inhibition reduzierte wiederum Hypoxie und EMT/Met-getriebene Metastasierung. Erneut wurde hier die kontextuelle bzw. ambivalente Rolle von Perizyten nicht nur im Rahmen der Tumorangio-genese, sondern auch in der Regulation der Endothelstabilität, der Gefäßdurchlässigkeit, Tumorprogression und hämatogener Metastasierung deutlich und Perizyten als gate-keeper beschrieben (Cooke et al., 2012; Xian et al., 2006). Einen erheblichen Beitrag zum Verständnis der Rolle von Perizyten für die hämatogene Metastasierung leistete eine Studie, die den Effekt von Perizytendepletion in frühen, nicht-hypoxischen Tumoren *und* in fortgeschrittenen, hypoxischen Tumoren untersucht hat (Keskin et al., 2015). Im Rahmen dieser Studie wurde die Auswirkung auf die Fernmetastasierungsrate berücksichtigt. Anti-angiogene Therapie via Perizyteninhibition (PDGFR β -Perizyten) führte in frühen, nicht-hypoxischen Tumorstadien zu reduzierter Metastasierung, wohingegen Perizyteninhibition in hypoxischen, fortgeschrittenen Tumoren die Rate an hämatogenen Fernmetastasen (Lungenmetastasen) erhöhte (Keskin et al., 2015). Die offenbar tumorstadiumabhängigen Effekte einer Perizyten-Depletion verdeutlichen hier, wie dynamisch die Interaktion von Perizyten und Endothelzellen während der Tumorneoangiogenese sind (Keskin et al., 2015). Eine frühe Perizyten-Ablation führte ferner zu erheblicher Hemmung der Tumorneoangiogenese und reduzierte hierüber Tumorwachstum mit dem Resultat verringerter intratumoraler Hypoxie (Keskin et al., 2015). Die Autoren vermuten, dass sich in diesem Stadium die Tumorwachstumsrate bzw. der metabolische Bedarf des Tumors mit der Versorgungskapazität des Tumorgefäßbetts deckt, sodass man von einer „Normalisierung“ des Gefäßbettes spricht. In diesem Stadium erscheint für die Autoren eine anti-angiogene Therapie erfolgversprechend (Cooke et al., 2012; Keskin et al., 2015). Im Gegensatz dazu führte eine Perizytendepletion in fortgeschrittenen Tumoren lediglich zu moderater Wachstumsreduktion und erheblich gesteigerter Fernmetastasierungsrate, die über Ang2-Expression reguliert wurde (Keskin et al., 2015). Die späte Perizytendepletion war mit einer insgesamt reduzierten Gefäßdichte und mit niedrigem Perizytenindex,

sowie massiver Hypoxie verbunden. In diesem Stadium erwies sich eine anti-angiogene Therapie wenig erfolgversprechend (Keskin et al., 2015). Gegensätzlich zu der Theorie von Judah Folkman verdeutlichen die Daten von Keskin et al., dass eine anti-angiogene Krebstherapie am ehesten wirksam ist, wenn sie in einem Zustand der Gefäßbett-Normalisierung bzw. bei stabilem Gefäßbett angewendet wird. Das hat zur Folge, dass Tumorphoxie und Hypoxie-getriebene Tumorangiogenese im Falle einer anti-angiogenen Therapie minimiert werden. Beides sind entscheidende Mechanismen zur Reduktion hämatogener Metastasierung. Die Autoren der oben genannten Studie haben daher eine Kombination aus Perizytendepletion (anti-PDGF Antikörper) plus Antikörper gegen destabilisierende Angiogenesefaktoren, z.B. Ang2 als einen vielversprechenden neuartigen Ansatz vorgeschlagen. Unsere Daten zeigen eine Aktivierung insbesondere von mikrovaskulären Perizyten an den Tumorgefäßen des Pankreaskarzinoms. Dieser Befund zeigt sich im Mausmodell besonders ausgeprägt zum Zeitpunkt von Tumovorläuferläsionen (PanIN). In diesem Stadium ist nach der Studie von Keskin et al., von einem ausgeglichenen Gefäßbett auszugehen, welches den metabolischen Bedarf des „Tumors“ deckt. In diesem Stadium könnte eine Perizytendepletion, durch anti-PDGFR bzw. anti-Ang2 Therapie, das Tumorstadiums möglicher Weise reduzieren. In fortgeschrittenen Tumorstadien, in denen bereits eine hypoxische Stoffwechsellage eingetreten ist (via Met. bzw. Ang2 Aktivierung) und die Tumorneoangiogenese VEGF-getrieben ist, muss man mit „weniger“ Perizyten und dysfunktionaler Perizyten-Endothelzelleinheit rechnen. Hier wäre eine vollständige Inhibition der verbliebenen Perizyten im Rahmen einer kombinierten anti-PDGF/anti-VEGEF Therapie vermutlich nicht zielführend und würde analog der Studie von Cook et al. zu einer vermehrten Fernmetastasierungsrate führen (Cooke et al., 2012). Der Perizyten-Index kann abschließend eine zusätzliche Informationsquelle über die Beschaffenheit bzw. den Grad der Hypoxie im Pankreaskarzinom darstellen.

6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zeichnet sich durch einen ausgeprägten Befall von intrapankreatischen Nerven durch Karzinomzellen aus. Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Pankreaskarzinom assoziierter Neurogenese und Angiogenese besteht. Diese Arbeit untersucht hierbei die Rolle von humanen Perizyten, die als peri-endotheliale Zellen, Gefäßdurchlässigkeit und Metastasierung regulieren. Hierzu wurde der Anteil der Perizyten-bedeckten Gefäßfläche („Perizyten coverage Index“ - PCI) und der Anteil der Perizyten-bedeckten Gefäße („Perizyten covered Vessels“ – PCV) in humanem Pankreaskarzinomgewebe (n=39) und normalem Pankreasgewebe (n=15) halbautomatisch mittels Immunfluoreszenzfärbung quantifiziert. Es zeigte sich, dass insbesondere CD146⁺-Perizyten (microcapillar-assoziiert) im PDAC ausgeprägter vorkommen als im gesunden Pankreasgewebe. Der PCV und der PCI für CD146⁺ Perizyten war im PDAC erhöht im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe (PCV_{PDAC} = 38,8 ± 3,4%, vs. PCV_{NP} = 23,4 ± 3,7%, p= 0,0049; sowie PCI_{PDAC} = 19,6 ± 2,2% vs. PCI_{NP} = 11,3 ± 2,3%, p= 0,018). Ebenso konnten mehr alpha-SMA⁺ Perizyten an Tumorgefäßen im Vergleich zu normalen Gefäßen angewiesen werden. Bei Korrelation des PCVs und des PCIs mit der neuralen Invasion wurde kein Zusammenhang nachgewiesen. Die Nervendichte und Gefäßdichte im PDAC korrelieren ebenfalls nicht mit dem Vorkommen von CD146⁺ bzw. alphaSMA⁺ Perizyten. Im KrasG12D-basierten Pankreaskarzinommausmodell (KPC Modell) wurden NG2⁺ Perizyten zu verschiedenen Tumorstadien untersucht. Insbesondere im 10 Wochen Stadium mit PanIN-Läsionen, aber auch im fortgeschrittenen 20 Wochen Stadium mit invasivem Karzinom kamen mehr NG2⁺ Perizyten im Vergleich zum gesunden Gewebe vor (p= 0, 0105). Um die Rolle von Perizyten für die Neuro- und Angiogenese *in vitro* zu untersuchen, wurde ein 3D-Kokultursystem mit Perizyten, Pankreaskarzinomzellen und aktivierten „dorsal root ganglia“ (DRG) Neuronen entwickelt. In diesem Ko-Kultursystem wiesen DRG-Neurone, die zuvor mit dem Überstand von Pankreaskarzinomzellen aktiviert wurden, eine erhöhte Neuritenausprossung auf (p= 0,001). Perizyten hingegen zeigten keine erhöhte Proliferationsrate (p= 0,83), allerdings eine veränderte Zellmorphologie mit verbreiterten und längeren Zellfortsätzen. Die *in vitro* ausgemessene Fläche von pankreaskarzinomzell-aktivierten Perizyten war vergrößert im Vergleich zu Kontrollen

($p= 0,0002$). Auf RNA-Ebene hat sich gezeigt, dass karzinomzell-aktivierte Perizyten ein verändertes Genexpressionsprofil aufweisen, wobei die signifikant regulierten Gen-Sets insbesondere inflammatorische, metabolische und neurale Signalwege betroffen haben. Das vermehrte Vorkommen von Perizyten an Tumorgefäßen, sowie die veränderte Zellmorphologie und das Genexpressionsprofil, könnten daraufhin deuten, dass eine Aktivierung von Perizyten in der Tumormikroumgebung des Pankreaskarzinom stattfindet. Hieraus ergeben sich weitere interessante Fragenstellungen, die beispielsweise den Effekt einer Perizytendepletion im PDAC untersuchen und neue Möglichkeiten für Therapieoption in der Behandlung des Pankreaskarzinoms eröffnen könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Aiello, L. P., Northrup, J. M., Keyt, B. A., Takagi, H., & Iwamoto, M. A. (1995). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol*, *113*(12), 1538-1544. doi:10.1001/archopht.1995.01100120068012
- Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, *22*(10), 1276-1312. doi:10.1101/gad.1653708
- Apte, M. V., Haber, P. S., Darby, S. J., Rodgers, S. C., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., et al. (1999). Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut*, *44*(4), 534-541. doi:10.1136/gut.44.4.534
- Apte, M. V., Wilson, J. S., Lugea, A., & Pandol, S. J. (2013). A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment. *Gastroenterology*, *144*(6), 1210-1219. doi:10.1053/j.gastro.2012.11.037
- Armulik, A., Genove, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, *21*(2), 193-215. doi:10.1016/j.devcel.2011.07.001
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, *468*(7323), 557-561. doi:10.1038/nature09522
- Bachem, M. G., Schunemann, M., Ramadani, M., Siech, M., Beger, H., Buck, A., et al. (2005). Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology*, *128*(4), 907-921. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.036
- Bachem, M. G., Zhou, S., Buck, K., Schneiderhan, W., & Siech, M. (2008). Pancreatic stellate cells--role in pancreas cancer. *Langenbecks Arch Surg*, *393*(6), 891-900. doi:10.1007/s00423-008-0279-5
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., et al. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, *531*(7592), 47-52. doi:10.1038/nature16965
- Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., et al. (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol*, *39*(12), 1730-1741. doi:10.1097/pas.0000000000000533
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., et al. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, *68*(3), 409-427. doi:10.1016/j.neuron.2010.09.043
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 401-410. doi:10.1038/nrc1093
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, *7*(4), 452-464. doi:10.1215/S1152851705000232

- Betsholtz, C., Lindblom, P., & Gerhardt, H. (2005). Role of pericytes in vascular morphogenesis. *EXS(94)*, 115-125. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15617474>
- Birbrair, A. (2018). Pericyte Biology: Development, Homeostasis, and Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1109, 1-3. doi:10.1007/978-3-030-02601-1_1
- Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z. M., Messi, M. L., Olson, J. D., Mintz, A., et al. (2014). Type-2 pericytes participate in normal and tumoral angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(1), C25-38. doi:10.1152/ajpcell.00084.2014
- Bisacchi, D., Benelli, R., Vanzetto, C., Ferrari, N., Tosetti, F., & Albini, A. (2003). Anti-angiogenesis and angioprevention: mechanisms, problems and perspectives. *Cancer Detect Prev*, 27(3), 229-238. doi:10.1016/s0361-090x(03)00030-8
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10. doi:10.1159/000088478
- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., et al. (2009). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177-186 e171. doi:10.1053/j.gastro.2008.09.029
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Muller, M. W., et al. (2008). Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 374(3), 442-447. doi:10.1016/j.bbrc.2008.07.035
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., et al. (2009). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 104(10), 2555-2565. doi:10.1038/ajg.2009.380
- Ceyhan, G. O., Liebl, F., Maak, M., Schuster, T., Becker, K., Langer, R., et al. (2010). The severity of neural invasion is a crucial prognostic factor in rectal cancer independent of neoadjuvant radiochemotherapy. *Ann Surg*, 252(5), 797-804. doi:10.1097/SLA.0b013e3181fca8d
- Chang, D. K., Grimmond, S. M., & Biankin, A. V. (2014). Pancreatic cancer genomics. *Curr Opin Genet Dev*, 24, 74-81. doi:10.1016/j.gde.2013.12.001
- Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., & Biankin, A. V. (2019). Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(4), 207-220. doi:10.1038/s41575-019-0109-y
- Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., et al. (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med*, 17(4), 500-503. doi:10.1038/nm.2344
- Connor, A. A., & Gallinger, S. (2022). Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. *Nat Rev Cancer*, 22(3), 131-142. doi:10.1038/s41568-021-00418-1
- Cooke, V. G., LeBleu, V. S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, J. T., Teng, Y., et al. (2012). Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition

- and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell*, 21(1), 66-81. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.024
- Covas, D. T., Panepucci, R. A., Fontes, A. M., Silva, W. A., Jr., Orellana, M. D., Freitas, M. C., et al. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*, 36(5), 642-654. doi:10.1016/j.exphem.2007.12.015
- Cubilla, A., & Fitzgerald, P. J. (1978). Pancreas cancer. I. Duct adenocarcinoma. A clinical-pathologic study of 380 patients. *Pathol Annu*, 13 Pt 1, 241-289. doi:10.3322/canjclin.35.1.2
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Liebl, F., D'Haese, J. G., Maak, M., & Friess, H. (2010). Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future. *Cancers (Basel)*, 2(3), 1513-1527. doi:10.3390/cancers2031513
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Rauch, U., Altintas, B., Klotz, M., Muller, M. W., et al. (2010). The microenvironment in chronic pancreatitis and pancreatic cancer induces neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil*, 22(4), 480-490, e112-483. doi:10.1111/j.1365-2982.2009.01428.x
- Demir, I. E., Kujundzic, K., Pfitzinger, P. L., Saricaoglu, O. C., Teller, S., Kehl, T., et al. (2017). Early pancreatic cancer lesions suppress pain through CXCL12-mediated chemoattraction of Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(1), E85-E94. doi:10.1073/pnas.1606909114
- Demir, I. E., Schorn, S., Schremmer-Danninger, E., Wang, K., Kehl, T., Giese, N. A., et al. (2013). Perineural mast cells are specifically enriched in pancreatic neuritis and neuropathic pain in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *PLoS One*, 8(3), e60529. doi:10.1371/journal.pone.0060529
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J. F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., et al. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*, 24(7), 909-969. doi:10.14670/hh-24.909
- Drenckhahn, D., Jons, T., & Schmitz, F. (1993). Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides. *Methods Cell Biol*, 37, 7-56. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8255251>
- Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegué, E., et al. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*, 13(3), 206-220. doi:10.1016/j.ccr.2008.01.034
- Dusch, N., Weiss, C., Ströbel, P., Kienle, P., Post, S., & Niedergethmann, M. (2014). Factors predicting long-term survival following pancreatic resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas: 40 years of experience. *J Gastrointest Surg*, 18(4), 674-681. doi:10.1007/s11605-013-2408-x
- Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K. H., & Augustin, H. G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*, 60(5), 1388-1393.

- Ebert, M., Yokoyama, M., Friess, H., Kobrin, M. S., Büchler, M. W., & Korc, M. (1995). Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 62(5), 529-535. doi:10.1002/ijc.2910620507
- Erkan, M., Adler, G., Apte, M. V., Bachem, M. G., Buchholz, M., Detlefsen, S., et al. (2012). StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut*, 61(2), 172-178. doi:10.1136/gutjnl-2011-301220
- Erkan, M., Hausmann, S., Michalski, C. W., Fingerle, A. A., Dobritz, M., Kleeff, J., et al. (2012). The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(8), 454-467. doi:10.1038/nrgastro.2012.115
- Erkan, M., Michalski, C. W., Rieder, S., Reiser-Erkan, C., Abiatari, I., Kolb, A., et al. (2008). The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6(10), 1155-1161. doi:10.1016/j.cgh.2008.05.006
- Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C. W., Kong, B., Esposito, I., Friess, H., et al. (2012). The impact of the activated stroma on pancreatic ductal adenocarcinoma biology and therapy resistance. *Curr Mol Med*, 12(3), 288-303. doi:10.2174/156652412799218921
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21), 1182-1186. doi:10.1056/nejm197111182852108
- Friess, H., Yamanaka, Y., Büchler, M., Ebert, M., Beger, H. G., Gold, L. I., et al. (1993). Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology*, 105(6), 1846-1856. doi:10.1016/0016-5085(93)91084-u
- Garcea, G., Dennison, A. R., Pattenden, C. J., Neal, C. P., Sutton, C. D., & Berry, D. P. (2008). Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP*, 9(2), 99-132.
- Gerhardt, H., & Semb, H. (2008). Pericytes: gatekeepers in tumour cell metastasis? *J Mol Med (Berl)*, 86(2), 135-144. doi:10.1007/s00109-007-0258-2
- Göhrig, A., Detjen, K. M., Hilfenhaus, G., Körner, J. L., Welzel, M., Arsenic, R., et al. (2014). Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 74(5), 1529-1540. doi:10.1158/0008-5472.Can-13-1012
- Greenberg, J. I., Shields, D. J., Barillas, S. G., Acevedo, L. M., Murphy, E., Huang, J., et al. (2008). A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456(7223), 809-813. doi:10.1038/nature07424
- Guerra, C., & Barbacid, M. (2013). Genetically engineered mouse models of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Oncol*, 7(2), 232-247. doi:10.1016/j.molonc.2013.02.002
- Haas, S. L., Fitzner, B., Jaster, R., Wiercinska, E., Gaitantzi, H., Jesnowski, R., et al. (2009). Transforming growth factor-beta induces nerve growth factor expression in pancreatic stellate cells by activation of the ALK-5 pathway. *Growth Factors*, 27(5), 289-299. doi:10.1080/08977190903132273
- Halliday, M. R., Rege, S. V., Ma, Q., Zhao, Z., Miller, C. A., Winkler, E. A., et al. (2016). Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein

- E4 carriers with Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(1), 216-227. doi:10.1038/jcbfm.2015.44
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14), 3047-3055.
- Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N., & Depinho, R. A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20(10), 1218-1249. doi:10.1101/gad.1415606
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437-450.
- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., et al. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469-483. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.023
- Holleb, A. I., & Folkman, J. (1972). Tumor angiogenesis. *CA Cancer J Clin*, 22(4), 226-229. doi:10.3322/canjclin.22.4.226
- Holm, A., Heumann, T., & Augustin, H. G. (2018). Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity. *Trends Cell Biol*, 28(4), 302-316. doi:10.1016/j.tcb.2017.12.002
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., et al. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*, 25(5), 579-586. doi:10.1097/00000478-200105000-00003
- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 6(8), 2969-2972.
- Hruban, R. H., Iacobuzio-Donahue, C., Wilentz, R. E., Goggins, M., & Kern, S. E. (2001). Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J*, 7(4), 251-258.
- Hudson, T. J., Anderson, W., Artez, A., Barker, A. D., Bell, C., Bernabe, R. R., et al. (2010). International network of cancer genome projects. *Nature*, 464(7291), 993-998. doi:10.1038/nature08987
- Joyce, N. C., Haire, M. F., & Palade, G. E. (1985). Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol*, 100(5), 1387-1395. doi:10.1083/jcb.100.5.1387
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*, 32(1), 128-134. doi:10.1038/ng959
- Keller, A., Westenberger, A., Sobrido, M. J., García-Murias, M., Domingo, A., Sears, R. L., et al. (2013). Mutations in the gene encoding PDGF-B cause brain calcifications in humans and mice. *Nat Genet*, 45(9), 1077-1082. doi:10.1038/ng.2723

- Keskin, D., Kim, J., Cooke, V. G., Wu, C. C., Sugimoto, H., Gu, C., et al. (2015). Targeting vascular pericytes in hypoxic tumors increases lung metastasis via angiopoietin-2. *Cell Rep*, 10(7), 1066-1081. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.035
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., et al. (2016). Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16022. doi:10.1038/nrdp.2016.22
- Klöppel, G., Solcia, E., Longnecker, D. S., Capella, C., Sobin, Leslie H. (1996). *Histological typing of tumours of the exocrine pancreas / G. Klöppel ... [et al.] in collaboration with pathologists in 7 countries* (Vol. 2): Berlin : Springer-Verlag.
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., & Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev*, 8(16), 1875-1887. doi:10.1101/gad.8.16.1875
- Li, Q., Yu, Y., Bischoff, J., Mulliken, J. B., & Olsen, B. R. (2003). Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J Pathol*, 201(2), 296-302. doi:10.1002/path.1443
- Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol Lett*, 16(1), 687-702. doi:10.3892/ol.2018.8733
- Li, X., Wang, Z., Ma, Q., Xu, Q., Liu, H., Duan, W., et al. (2014). Sonic hedgehog paracrine signaling activates stromal cells to promote perineural invasion in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 20(16), 4326-4338. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3426
- Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H., & Albo, D. (2009). Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer*, 115(15), 3379-3391. doi:10.1002/cncr.24396
- Liebl, F., Demir, I. E., Mayer, K., Schuster, T., D'Haese, J. G., Becker, K., et al. (2014). The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Ann Surg*, 260(5), 900-907; discussion 907-908. doi:10.1097/SLA.0000000000000968
- Liebl, F., Demir, I. E., Rosenberg, R., Boldis, A., Yildiz, E., Kujundzic, K., et al. (2013). The severity of neural invasion is associated with shortened survival in colon cancer. *Clin Cancer Res*, 19(1), 50-61. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2392
- Liu, B., & Lu, K. Y. (2002). Neural invasion in pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 1(3), 469-476. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607730>
- Mahadevan, D., & Von Hoff, D. D. (2007). Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*, 6(4), 1186-1197. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0686
- Marchetti, C., & Piacentini, C. (1990). [Light microscopy and electron microscopy study of the lymphatic capillaries of human dental pulp]. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*, 33(1), 19-23.
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., & Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58(9), 1094-1103. doi:10.1002/glia.20990
- McCarty, M. F., Somcio, R. J., Stoeltzing, O., Wey, J., Fan, F., Liu, W., et al. (2007). Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by

- increasing tumor pericyte content. *J Clin Invest*, 117(8), 2114-2122. doi:10.1172/JCI31334
- Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Mansat, M., Mansat, P., et al. (2005). A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol*, 206(3), 260-268. doi:10.1002/path.1788
- Moffitt, R. A., Marayati, R., Flate, E. L., Volmar, K. E., Loeza, S. G., Hoadley, K. A., et al. (2015). Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet*, 47(10), 1168-1178. doi:10.1038/ng.3398
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R. K., & McDonald, D. M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol*, 160(3), 985-1000. doi:10.1016/S0002-9440(10)64920-6
- Mueller, S., Engleitner, T., Maresch, R., Zukowska, M., Lange, S., Kaltenbacher, T., et al. (2018). Evolutionary routes and KRAS dosage define pancreatic cancer phenotypes. *Nature*, 554(7690), 62-68. doi:10.1038/nature25459
- Nicolas, G., Pottier, C., Maltête, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Legallic, S., et al. (2013). Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology*, 80(2), 181-187. doi:10.1212/WNL.0b013e31827ccf34
- Nielsen, M. F., Mortensen, M. B., & Detlefsen, S. (2016). Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J Gastroenterol*, 22(9), 2678-2700. doi:10.3748/wjg.v22.i9.2678
- O'Keeffe, M. B., Devlin, A. H., Burns, A. J., Gardiner, T. A., Logan, I. D., Hirst, D. G., et al. (2008). Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: association with clinical outcomes. *Oncol Res*, 17(3), 93-101. doi:10.3727/096504008785055530
- Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933), 1457-1461. doi:10.1126/science.1171362
- Ostman, A., & Pietras, K. (2013). Introduction to tumor-stroma interactions. *Exp Cell Res*, 319(11), 1595. doi:10.1016/j.yexcr.2013.05.026
- Ozdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C. C., Simpson, T. R., et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25(6), 719-734. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.005
- Ozerdem, U. (2006). Targeting of pericytes diminishes neovascularization and lymphangiogenesis in prostate cancer. *Prostate*, 66(3), 294-304. doi:10.1002/pros.20346
- Pietras, K., & Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J Clin Oncol*, 23(5), 939-952. doi:10.1200/jco.2005.07.093

- Provenzano, P. P., Cuevas, C., Chang, A. E., Goel, V. K., Von Hoff, D. D., & Hingorani, S. R. (2012). Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3), 418-429. doi:10.1016/j.ccr.2012.01.007
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 19(11), 1423-1437. doi:10.1038/nm.3394
- Quante, M., Tu, S. P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S. S., Takashi, S., et al. (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell*, 19(2), 257-272. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.020
- Rashid, N. U., Peng, X. L., Jin, C., Moffitt, R. A., Volmar, K. E., Belt, B. A., et al. (2020). Purity Independent Subtyping of Tumors (PuriST), A Clinically Robust, Single-sample Classifier for Tumor Subtyping in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res*, 26(1), 82-92. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-19-1467
- Raza, A., Franklin, M. J., & Dudek, A. Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*, 85(8), 593-598. doi:10.1002/ajh.21745
- Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., et al. (2014). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 25(6), 735-747. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2), 324-336. doi:10.1016/j.cell.2007.08.025
- Sengillo, J. D., Winkler, E. A., Walker, C. T., Sullivan, J. S., Johnson, M., & Zlokovic, B. V. (2013). Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 23(3), 303-310. doi:10.1111/bpa.12004
- Shepro, D., & Morel, N. M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J*, 7(11), 1031-1038. doi:10.1096/fasebj.7.11.8370472
- Shimizu, F., Sano, Y., Abe, M. A., Maeda, T., Ohtsuki, S., Terasaki, T., et al. (2011). Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol*, 226(1), 255-266. doi:10.1002/jcp.22337
- Shimizu, F., Sano, Y., Saito, K., Abe, M. A., Maeda, T., Haruki, H., et al. (2012). Pericyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor increase the expression of claudin-5 in the blood-brain barrier and the blood-nerve barrier. *Neurochem Res*, 37(2), 401-409. doi:10.1007/s11064-011-0626-8
- Sims, D. E. (1986). The pericyte--a review. *Tissue Cell*, 18(2), 153-174. doi:10.1016/0040-8166(86)90026-1
- Sims, D. E. (2000). Diversity within pericytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 27(10), 842-846. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022980>
- Song, N., Huang, Y., Shi, H., Yuan, S., Ding, Y., Song, X., et al. (2009). Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1alpha/CXCR4 axis. *Cancer Res*, 69(15), 6057-6064. doi:10.1158/0008-5472.Can-08-2007

- Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z., & Bergers, G. (2005). PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol*, 7(9), 870-879. doi:10.1038/ncb1288
- Stefansson, I. M., Salvesen, H. B., & Akslen, L. A. (2006). Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res*, 66(6), 3303-3309. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-1163
- Swanson, B. J., McDermott, K. M., Singh, P. K., Eggers, J. P., Crocker, P. R., & Hollingsworth, M. A. (2007). MUC1 is a counter-receptor for myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion. *Cancer Res*, 67(21), 10222-10229. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2483
- Sweeney, M. D., Ayyadurai, S., & Zlokovic, B. V. (2016). Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci*, 19(6), 771-783. doi:10.1038/nn.4288
- Takahashi, H., Takata, F., Matsumoto, J., Machida, T., Yamauchi, A., Dohgu, S., et al. (2015). Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 457(4), 532-537. doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.016
- Tanaka, M. (2014). Thirty years of experience with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: from discovery to international consensus. *Digestion*, 90(4), 265-272. doi:10.1159/000370111
- Weibel, E. R. (1974). On pericytes, particularly their existence on lung capillaries. *Microvasc Res*, 8(2), 218-235. doi:10.1016/0026-2862(74)90096-x
- Welén, K., Jennbacken, K., Tesan, T., & Damber, J. E. (2009). Pericyte coverage decreases invasion of tumour cells into blood vessels in prostate cancer xenografts. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 12(1), 41-46. doi:10.1038/pcan.2008.33
- Wittekind, C. (2016). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*: John Wiley & Sons.
- Xian, X., Hakansson, J., Stahlberg, A., Lindblom, P., Betsholtz, C., Gerhardt, H., et al. (2006). Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest*, 116(3), 642-651. doi:10.1172/JCI25705
- Yan, H., Newgreen, D. F., & Young, H. M. (2003). Developmental changes in neurite outgrowth responses of dorsal root and sympathetic ganglia to GDNF, neurturin, and artemin. *Dev Dyn*, 227(3), 395-401. doi:10.1002/dvdy.10294
- Yerushalmi, R., Woods, R., Ravdin, P. M., Hayes, M. M., & Gelmon, K. A. (2010). Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*, 11(2), 174-183. doi:10.1016/s1470-2045(09)70262-1
- Yonenaga, Y., Mori, A., Onodera, H., Yasuda, S., Oe, H., Fujimoto, A., et al. (2005). Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology*, 69(2), 159-166. doi:10.1159/000087840
- Zhan, H. X., Zhou, B., Cheng, Y. G., Xu, J. W., Wang, L., Zhang, G. Y., et al. (2017). Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology. *Cancer Lett*, 392, 83-93. doi:10.1016/j.canlet.2017.01.041

- Zhang, J. F., Hua, R., Sun, Y. W., Liu, W., Huo, Y. M., Liu, D. J., et al. (2013). Influence of perineural invasion on survival and recurrence in patients with resected pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(9), 5133-5139. doi:10.7314/apjcp.2013.14.9.5133
- Zhou, Y., Zhou, Q., & Chen, R. (2012). Pancreatic stellate cells promotes the perineural invasion in pancreatic cancer. *Med Hypotheses*, 78(6), 811-813. doi:10.1016/j.mehy.2012.03.017
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., et al. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 17(8), 2419-2428. doi:10.1200/JCO.1999.17.8.2419

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phänotypen von Perizyten	11
Abbildung 2: Versuchsaufbau des Proliferations-Assays mit dazugehörigem Pipettierschema.....	31
Abbildung 3: Schrittweise Entnahme von DRG.....	33
Abbildung 4: Ablauf des 3D-Kokultur-Assay.....	34
Abbildung 5: Pipettierschema für den Ablauf des 3D-Kokultur-Assay.....	35
Abbildung 6: CD146 ⁺ Perizyten im humanen Pankreaskarzinom	42
Abbildung 7: alphaSMA ⁺ Perizyten im humanen Pankreaskarzinom.....	44
Abbildung 8: Perizyten an humanen Tumorgefäßen des Pankreaskarzinoms.....	45
Abbildung 9: Perizyten und neurale Invasion.....	46
Abbildung 10: CD146 ⁺ Perizyten-Index im humanen Pankreaskarzinom.....	49
Abbildung 11: alphaSMA ⁺ Perizyten-Index im humanen Pankreaskarzinom.....	49
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Perizyten und neuraler Invasion im humanen Pankreaskarzinom.....	52
Abbildung 13: Zusammenhang zwischen Perizyten und Nervendichte im humanen Pankreaskarzinom.....	53
Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Perizyten und Gefäßdichte im humanen Pankreaskarzinom.....	54
Abbildung 15: Perizyten im KPC Mausmodell	57
Abbildung 16: Einfluss von Pankreaskarzinomzelllinien (PCC) auf die Proliferationsrate humaner Perizyten.....	60

Abbildung 17: Einfluss von Perizyten und PCC-Linien auf die Neuritendichte von DRG-Neuronen.....	62
Abbildung 18: Einfluss aktivierter Neurone auf die Proliferationsrate humaner Perizyten.....	63
Abbildung 19: Einfluss von PCC-Linien auf die Zellfläche von humanen Perizyten.....	64
Abbildung 20: Gene set enrichment analysis (GESAs) und KEGG Signalweg Analyse von karzinomzell-stimulierten Perizyten	66

9 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp Ceyhan für die Möglichkeit bedanken in der AG Ceyhan promovieren zu dürfen. Vielen Dank für die durchgehend positive Unterstützung und Motivation.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Helmut Friess für die Unterstützung und die Verleihung des Doktorandenpreises für chirurgische Forschung der Stiftung Chirurgie der TU München im Jahr 2018.

Mein Dank geht auch an PD Dr. Dr. Ekin Demir, der mir die Faszination für Grundlagenforschung näher und das wissenschaftliche Handwerk beigebracht hat. Als Betreuer dieser Dissertation war er zu jeder Tageszeit erreichbar und stand immer für Rückfragen zur Verfügung. Mit viel Geduld, unzähligen, konstruktiven Tipps und Gesprächen hat er diese Arbeit und viele weitere unserer Projekte positiv beeinflusst. Ich bedanke mich für das Vertrauen und die Unterstützung, die er mir entgegengebracht hat. Seine wissenschaftlichen Einschätzungen und seine Expertise schätze ich in höchstem Maße und habe ich stets als Inspiration wahrgenommen. Sie werden weiterhin von höchstem Stellenwert für mich sein, auch über meine Dissertation hinaus.

Insbesondere bedanke ich mich bei den gesamten Mitgliedern der AG Ceyhan. Das gute Miteinander und die Hilfsbereitschaft haben immer zu einer guten und produktiven Stimmung beigetragen. Allen voran Ulrike Bourquain war eine große Unterstützung im alltäglichen Zurechtfinden im Labor.

Zuletzt bedanke ich mich von tiefsten Herzen bei meiner Familie. Mein Dank gilt besonders meinem Vater für das kritische Lesen und die immer tatkräftige Unterstützung bei der Überarbeitung, sowie meiner Mutter für die liebevolle psychische Unterstützung. Mit dem beständigen Nachfragen haben sie wesentlich zur erfolgreichen Vollendung dieser Arbeit beigetragen. Die geduldigen Anmerkungen waren in vielen Momenten richtungsweisend. Ich danke auch meinem Freund für die Rücksichtnahme und Geduld.