

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Metastasierung des duktales Pankreasadenokarzinoms:
Wechselwirkung der hepatischen Mikroumgebung und TRAIL-Rezeptoren
sowie ihr Einfluss auf malignitäts-assoziierte Prozesse von
Pankreasadenokarzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lauritz Miarka
aus Diepholz

Kiel 2020

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Susanne Sebens
Institut für Experimentelle Tumorforschung

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Denis Schewe
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.02.21

gez.: Prof. Dr. Susanne Sebens
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Pathologie und Karzinogenese	2
1.1.3 Diagnose und Therapie des PDAC	5
1.2 Metastasierung	6
1.2.1 Die Invasion-Metastasierungskaskade	6
1.2.2 Metastasierung des PDAC	9
1.2.3 Die Lebermikroumgebung	9
1.3 TNF-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)	11
1.3.1 Das TRAIL-Rezeptorsystem	12
1.3.2 TRAIL-Rezeptor induzierte Signalkaskaden	13
1.4 Ziel und Fragestellung der Arbeit	15
2 Materialien	18
2.1 Geräte	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.3 Chemikalien	21
2.4 Puffer	23
2.5 Kit Systeme	23
2.6 Software	24
2.7 Zellbiologische Materialien	25
2.7.1 Zelllinien	25
2.7.2 Medium	26
2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Primer	27
2.9 Biochemische Materialien	28
2.9.1 Antikörper	28
2.9.2 Wachstumsfaktoren, Zytokine und Blockade-Antikörper	29
3 Methoden	30
3.1 Aufarbeitung und Analyse von Probenmaterial aus verschiedenen Mausmodellen	30
3.1.1 Leber-Gewebe aus einem klinisch adaptierten Resektionsmodell	30
3.1.2 Leber-Gewebe aus einem Resektionsmodell (Schein-Operation)	31
3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung auf Panzytokeratin und Ki67 in Paraffin-Schnitten	31
3.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mit ImageJ	32
3.1.5 Gewinnung von Proteinüberständen aus schockgefrorenem Leber-Gewebe	33
3.1.6 Isolierung von RNA aus schockgefrorenem Leber-Gewebe	34
3.2 Zellbiologische Methoden	34
3.2.1 Zellkultur	34
3.2.2 Indirekte Kokultur von humanen Tumorzellen und murinen hepatischen Stromazellen	35
3.2.3 Verlängerte indirekte Kokultur	36
3.2.4 Einsatz von Blockierungs-Antikörpern während der indirekten Kokultur	37
3.3 Biochemische Methoden	37
3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	37
3.4 Molekularbiologische Methoden	38
3.4.1 RNA-Isolierung	38
3.4.2 Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration	39

3.4.3	cDNA Synthese	39
3.4.4	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	40
3.5	Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung	41
3.5.1	Immunfluoreszenzfärbung von Ki67	41
3.5.2	Immunzytochemische Färbung von Ki67	43
3.6	Durchflusszytometrie	43
3.6.1	Zelltod-Bestimmung mit Propidium-Iodid (PI)	44
3.6.2	LEGENDplex™-Analyse	45
3.7	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Unterdrückung von TRAIL-R2 vermindert die post-operative Lebermetastasierung in einem klinisch-adaptierten Mausmodell des PDAC	47
4.2	Nanometastasen aus Tieren, die PDAC Zellen mit einem supprimierten TRAIL-R2 erhielten, sind weniger proliferativ aktiv	50
4.3	Operation induziert lokale Entzündungsreaktion in der Leber <i>in vivo</i> .	51
4.4	Kokultur mit HSC und HMF beeinflusst das Wachstumsverhalten von PDAC Zellen mit einem moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus	55
4.5	Unterdrückung von TRAIL-R2 führt zur Hochregulation von TRAIL-R1 nach HSC Kokultur	57
4.6	Wechsel der Kokultur von HSC auf HMF kann die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation in PancTu-I shTR2 Zellen nur bedingt aufheben	58
4.7	Bestimmung von Zytokinen, welche den Einfluss der HSC auf PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus vermitteln	60
4.8	Die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen ist IL-8 abhängig	61
4.9	TNF- α erhöht nicht die Proliferation der PDAC Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung	63
4.10	Die Steigerung der PDAC Zellproliferation nach HMF Kokultur wird unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus durch VEGF vermittelt	64
5	Diskussion	67
5.1	TRAIL-R2 ist eine wichtige Determinante für das Auswachsen von Metastasen in der Leber nach Resektion des primären PDAC	67
5.2	Die Resektion des Primärtumors induziert eine lokale Entzündungsreaktion der Leber und geht mit einer Aktivierung von hepatischen Sternzellen einher	71
5.3	Der Entzündungsstatus der hepatischen Mikroumgebung kontrolliert das Wachstumsverhalten von PDAC Zellen in Abhängigkeit von TRAIL-R2	74
6	Ausblick	84
7	Zusammenfassung	86
8	Literaturverzeichnis	88
9	Abbildungsverzeichnis	113
	Veröffentlichungen	VI
	Danksagung	VII

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
ADM	Azinoduktale Metaplasie
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APC	Allophycocyanin
BID	<i>BH3-Interacting-Domain death agonist</i>
Blotto	TBS-T mit Magermilchpulver
BSA	Bovines Serumalbumin
C(t)	<i>Cycle Threshold</i>
CCL2	<i>C-C Chemokine Ligand 2</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Centimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col1A1	Kollagen Typ I
CRP	C-reaktives Protein
CXCR4	<i>C-X-C Motif Chemokine Receptor 4</i>
d	Tag
DD	Todesdomäne
DISC	<i>Death-Inducing Signalling Complex</i>
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
DTC	Disseminierte Tumorzelle
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with Death Domain</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FOLFIRINOX	Oxaliplatin, Irinotecan, 5-FU + Leukovorin
Fw	<i>Forward</i>
g	Gewichtskraft
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HCl	Salzsäure
HMF	Hepatische Myofibroblasten
HSC	Hepatische Sternzellen
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
ICC	Immunzytochemie
IPMN	Intraduktale Papillär-Muzinöse Neoplasie
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
KC	Kupffer Zelle
KRAS	<i>Kirsten-Rat Sarcoma</i>
L-Gln	L-Glutamin
mA	Milliampere
MCN	Muzinös-Zystische Neoplasie
MDSC	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MFI	Mediane Fluoreszenz-Intensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NR2F1	<i>RAR-related orphan receptor beta</i>
OPG	Osteoprotegerin
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDAC	duktales Pankreasadenokarzinom
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicilin-Streptomycin

PI	Propidium-Iodid
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase- kettenreaktion
rF	Relative Luftfeuchtigkeit
Rv	<i>Reverse</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
ssDNA	Einzelstrang Desoxyribonukleinsäure
TBS-T	Tris-gepufferte Salzsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor beta 1</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
U	Enzymeinheit (<i>Unit</i>)
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
α -SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist trotz immenser Forschungsanstrengungen in den letzten Dekaden immer noch einer der Hauptverursacher krebserkrankter Todesfälle. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 7-9% stellt es trotz seiner niedrigen Inzidenz von 10470 Frauen und 10940 Männern in Deutschland pro Jahr die vierthäufigste Krebstodesursache dar [1,2]. Aufgrund des mangelnden Fortschritts in der Behandlung und Früherkennung des PDAC im Vergleich mit anderen Krebserkrankungen sowie einer Vergrößerung des Anteils älterer Menschen in der Bevölkerung, wird mit einem Anstieg der Fall- und Sterbezahlen gerechnet, so dass bis 2030 das PDAC als die zweithäufigste Krebstodesursache weltweit erachtet wird [1,3].

Die Gründe für diese infauste Prognose sind vielfältig: Die aggressive Tumorbilogenie sowie die nur unspezifischen Symptome und die daraus resultierende späte Diagnose sind unter anderem ursächlich dafür, dass 85% der Patienten bei Erst Diagnose bereits ein lokal fortgeschrittenes oder metastasiertes Stadium aufweisen [4,5]. Für diese Patienten ist eine kurative Behandlung im Sinne einer chirurgischen Resektion nicht mehr möglich, so dass eine palliative Therapie die einzige Behandlungsmöglichkeit darstellt [6]. Aber die Patienten, die sich einer potentiell kurativen R0-Resektion und einer adjuvanten Chemotherapie unterziehen, entwickeln häufig in den darauffolgenden drei bis neun Monaten Lokalrezidive oder Fernmetastasen [7]. Dadurch ist die durchschnittliche Überlebenszeit auch in dieser Patientenpopulation mit 17-18 Monaten nur sehr gering [8,9].

Während Frauen und Männer ungefähr gleich häufig erkranken, ist das PDAC mit einem mittleren Erkrankungsalter von 74,1 Jahren bei Frauen und 70,4 Jahren bei Männern als Erkrankung des höheren Alters anzusehen [1]. Daher ist Alter der wichtigste, nicht lebensstil-assoziierte Risikofaktor, an einem PDAC zu erkranken. Weiterhin zeigen 5-16% der Patienten Erberkrankungen, deren kausale Keimbahnmutation mit einem erhöhten Risiko an einem PDAC zu erkranken einhergeht [10]. Dazu gehören unter anderem Mutationen in den Genen *PRSS1* (familiäre

Pankreatitis), *STK11* (Peutz-Jeghers-Syndrom), *BRCA1* oder *BRCA2* (Erblicher Brust- und Eierstockkrebs) [11–13]. Zu den gesicherten lebensstil-assoziierten Risikofaktoren zählen das Tabakrauchen, der übermäßige Verzehr von alkoholhaltigen Getränken sowie Adipositas [14–16]. Da alle drei der eben genannten Faktoren auch an der Entstehung der chronischen Pankreatitis beteiligt sind, steigt das Erkrankungsrisiko auch durch eine chronische Pankreatitis auf das 13-fache an [17]. Weiterhin wird eine positive Korrelation zwischen einer fleischlastigen Ernährungsweise sowie wenig Bewegung vermutet [18,19]. Zuletzt geht auch ein Diabetes Mellitus Typ II mit einem erhöhtem Erkrankungsrisiko einher [20].

1.1.2 Pathologie und Karzinogenese

Der Pankreas besteht aus zwei grundsätzlich unterschiedlichen Formen des Drüsengewebes, einem endokrinen und einem exokrinen Teil. Letzterer macht etwa 80% der zellulären Organmasse aus und setzt sich aus vielen Azini zusammen. Diese bestehen aus zentroazinären Zellen und zahlreichen pyramidenförmigen Drüsenzellen, welche mindestens 22 verschiedene Verdauungsenzyme produzieren. Der endokrine Teil wird gebildet von den Langerhans Inseln, welche aus vier unterschiedlichen endokrinen Zellarten bestehen. Diese produzieren stoffwechselrelevante Hormone wie Glukagon, Insulin oder Somatostatin [21,22]. Aus diesen verschiedenen Zellarten des Pankreas können eine Vielzahl an Neoplasien entstehen, wobei das PDAC sich aus dem exokrinen Teil entwickelt und für 95% aller pankreatischen Neoplasien verantwortlich ist [23].

Das PDAC entwickelt sich anhand einer gut beschriebenen mehrstufigen Progression, die durch histopathologische Veränderungen und begleitende Akkumulation an Mutationen charakterisiert ist. Diese Veränderungen lassen sich anhand ihrer histologischen Eigenschaften in drei verschiedene nicht-invasive Vorläuferläsionen einteilen: die Intraduktalen Papillär-Muzinösen Neoplasien (IPMN), die Muzinös-Zystischen Neoplasien (MCN) und die Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasien (PanIN) [24]. Darüber hinaus wird eine vierte Form der Vorläuferläsion diskutiert: Es wird angenommen, dass azinöse Zellen im Zuge von Regenerationsprozessen zu einem duktalem Phänotyp transdifferenzieren können [25]. Diese Azinoduktalen Metaplasien (ADM) können entweder transient sein oder aber durch eine zusätzliche

Mutation des Onkogens *Kirsten-Rat Sarcoma (KRAS)* entweder in eine PanIN übergehen oder aber einen eigenständigen Entstehungsmechanismus des PDAC darstellen [26,27].

PanIN stellen die wichtigsten Vorläuferläsionen dar. Durch ihren Erstbeschreiber Hruban wurden diese anhand ihres Dysplasie-Grades in drei Stadien eingeteilt und beziehen sich üblicherweise auf Gänge unter 5 mm (**Abbildung 1**) [28]. Während das physiologische Gangepithel sich als einreihiges, flaches bis kubisches Epithel ohne vermehrte Muzinproduktion und mit basalständigen Kernen präsentiert, zeichnen sich Gangepithelien der Kategorie PanIN-1A durch flache Epithelläsionen aus Zylinderepithel mit starker Muzinproduktion und basal lokalisierten Nuklei aus. Diese Morphologie wird in der Kategorie PanIN-1B durch eine basale oder papilläre Pseudostratifizierung ergänzt. Das Vorhandensein von Kerndysplasien in Form von Polaritätsverlust und Hyperchromasie nimmt in Läsionen vom Typ PanIN-II zu, weiterhin sind sie vermehrt papillär. PanIN-III Läsionen sind charakterisiert durch eine papilläre Architektur und luminale Nekrosen sowie das Abkapseln von kleinen Epithelzellnestern in das Lumen. Diese Art von Läsion wird ebenfalls als *Carcinoma in Situ* bezeichnet [24,28,29].

Diese histopathologische Progression ist begleitet von für das PDAC charakteristischen Mutationen (**Abbildung 1**) [30]. Schon frühe PanIN-I Läsionen mit nur geringen zellulären Atypien weisen in 99% der Fälle eine aktivierende Punktmutation im Onkogen *KRAS* auf [31]. Das dysfunktionale Genprodukt dieser Mutation ist beteiligt an verschiedenen wachstumsstimulierenden Signalwegen und es wird ihm zugesprochen, an allen Schritten der pankreatischen Karzinogenese beteiligt zu sein. Auch wenn neue Erkenntnisse gezeigt haben, dass die *KRAS*^{G12V} Mutation entbehrlich für die Tumorprogression ist, wird der Erwerb dieser Mutation als Initialschritt der Tumorentstehung verstanden [32–34]. Weitere frühe genetische Alterationen sind eine Überexpression des *HER2/neu*-Gens sowie das Verkürzen der Telomere [30,35]. Spätere PanIN Stadien zeichnen sich durch die biallelische Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *TP53*, *DPC4/SMAD4* und *BRCA2* aus [30].

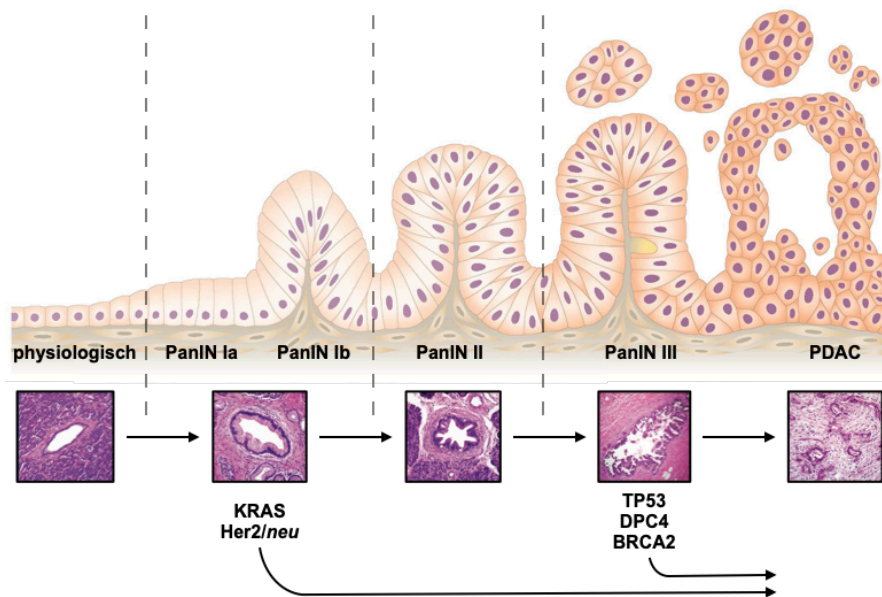


Abbildung 1: Progressionsmodell des PDAC. Oben: Gezeigt wird die schematische Entwicklung der Morphologie des physiologischen Gangepithels zu den drei Vorläuferläsionen (PanIN I-III) sowie zuletzt zum PDAC. Mitte: Histopathologische Progression der Vorläuferläsionen (Hämatoxylin-Eosin Färbung). Unten: Begleitende charakteristische Mutationen des PDAC. Modifiziert nach [36,37].

Ein weiteres Kennzeichen der Tumorprogression des PDAC ist eine ausgeprägte Zunahme des desmoplastischen Stromas, welches bis zu 80% der Tumormasse ausmachen kann [38]. Es setzt sich zusammen aus einem zellulären und extrazellulären Kompartiment; Ersteres umfasst pankreatische Sternzellen, Endothelzellen sowie eine Reihe von infiltrierenden Immunzellen, zu denen Makrophagen, CD4⁺ regulatorische T-Zellen und myeloide Suppressorzellen zählen [39–41]. Pankreatische Sternzellen, welche im Tumorkontext aktiviert werden und dann als Karzinom-assoziierte Fibroblasten bezeichnet werden, produzieren eine Vielzahl an Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM) wie Kollagen Typ I, III, V sowie Fibronektin und Laminin [2,42]. Diese bilden gemeinsam mit Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen das extrazelluläre Stroma-Kompartiment. Während das Stroma in der Vergangenheit vor allem als eine tumorfördernde Umgebung beschrieben wurde, welche Chemoresistenz, Immunsuppression und Tumorprogression begünstigt, zeigen neuere Studien auch eine protektive Rolle des Tumorstromas auf [43–45].

1.1.3 Diagnose und Therapie des PDAC

Das PDAC präsentiert sich klinisch meist mit uncharakteristischen Symptomen und wird deshalb häufig erst diagnostiziert, wenn es bereits lokal fortgeschritten ist oder in andere Organe gestreut hat. Die Patienten weisen vor allem unspezifische Oberbauchschmerzen, Gewichtsverlust, schmerzlosen Ikterus, Fieber, Übelkeit, eine Pankreatitis unklarer Genese oder einen neu aufgetretenen Diabetes Mellitus auf [46]. Bei Verdacht auf ein PDAC wird zur Malignitätssicherung ein diagnostisches Stufenschema verwendet. Dieses beinhaltet die transabdominelle Sonografie, die Endosonografie, die Multidetektor-Computertomographie oder die Magnetresonanztomographie in Kombination mit einer Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie [47]. Da 85% der Patienten beim Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits als inoperabel gelten, gilt es mit Hilfe der Bildgebung neben der eigentlichen Diagnosesicherung vor allem darum Patienten, die für eine kurative chirurgische Resektion in Frage kommen, zu identifizieren [4]. Hierfür ist die Beurteilung von Malignitätskriterien wie organüberschreitendem Wachstum, Gefäßeinbrüchen und Lymphknoten- sowie Fernmetastasen von ausschlaggebender Wichtigkeit [46]. Anhand dieser Parameter wird der Tumor durch die Kriterien des *American Joint Committee on Cancer Staging System* in Stadien von I bis IV eingeteilt und darauf beruhend über die Resektabilität entschieden [48]. Während in Stadium I und II aufgrund ihrer lokalen Begrenztheit unbedenklich resezierbar sind, ist Stadium III Borderline resektabel. Fernmetastasierte Tumore werden durch Stadium IV als inoperabel eingestuft.

Nach sorgfältiger Beurteilung aller klinischen Befunde werden etwa 15% der Patienten einer potentiell kurativen Resektion des Tumors unterzogen [46]. Auch wenn ein tumorfreier Resektionsrand (R0-Resektion) gegenüber einem histopathologisch nicht tumorfreiem Resektionsrand (R1-Resektion) einen positiven prognostischen Faktor darstellt, wird eine R0-Resektion nur in 41-70% der Fälle erreicht [49,50]. Dementsprechend ist die Verbesserung der Prognose nach Operation limitiert, mit einer mittleren Überlebenszeit von 25 Monaten sowie einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 20% [51]. Obgleich das PDAC eine ausgeprägte Chemo-resistenz aufweist, wird eine adjuvante Therapie innerhalb von sechs Wochen nach Operation mit Gemcitabin, einem Nukleosid-Analogon, oder 5-Fluorouracil/Folinsäure (5-FU), einem Pyrimidin-Analogon, empfohlen [52].

Für Patienten in einer palliativen Situation mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Tumor hatte sich jahrelang ebenfalls die Chemotherapie mit

Gemcitabin als Standardansatz etabliert [53–55]. Neuere Studien zeigen jedoch eine Überlegenheit einer Polychemotherapie mit Oxaliplatin, Irinotecan, 5-FU und Leukovorin (FOLFIRINOX) gegenüber der Gemcitabin Monotherapie in Bezug auf das progressionsfreie Überleben. Da dieses Therapie-Regime aber eine hohe Toxizität aufweist, wird es nach aktueller S3-Leitlinie nur für Patienten mit einem günstigen Risikoprofil und gutem Allgemeinzustand empfohlen [6,56]. Für Patienten mit einem prognostisch ungünstigen Risikoprofil, für die eine Therapie mit FOLFIRINOX keine Therapieoption darstellt, hat sich 2013 eine weitere Kombinationstherapie als vorteilhaft erwiesen: Die Kombination aus Gemcitabin mit nab-Paclitaxel konnte die mediane Überlebenszeit um 8,5 Monate gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin verlängern [57]. Während diese Kombination in den Vereinigten Staaten von Amerika durch die *Federal Drug and Food Administration* für das metastasierte Pankreaskarzinom bereits zugelassen wurde, erfolgt die Therapie in Deutschland damit bis zur Zulassung als *Off-Label* Gabe [6].

Zusammengefasst sind die konventionellen Möglichkeiten der kurativen und palliativen Therapie nach wie vor unbefriedigend. Das PDAC weist weiterhin eine desaströse Prognose mit nur begrenztem Überlebensvorteil durch jegliche Therapieform auf. Daher hat sich in den letzten Jahren die Forschung auch dem Tumorstroma sowie dem Metastasierungsprozess für die Identifikation von therapeutischen Angriffspunkten zugewandt [38,58,59].

1.2 Metastasierung

1.2.1 Die Invasion-Metastasierungskaskade

Während sich bei lokal begrenzten Primärtumoren mittlerweile in den meisten Fällen ein gutes, nicht lebenslimitierendes Behandlungsergebnis erzielen lässt, gilt die Bildung von Tochtergeschwülsten als Todesursache von 90% der Krebspatienten [60]. Obgleich dieser Prozess bei jeder Tumorentität individuelle Eigenschaften zeigt, wird davon ausgegangen, dass Karzinome eine Abfolge von zugrundeliegenden zellbiologischen Prozessen in einer definierten Reihenfolge durchlaufen.

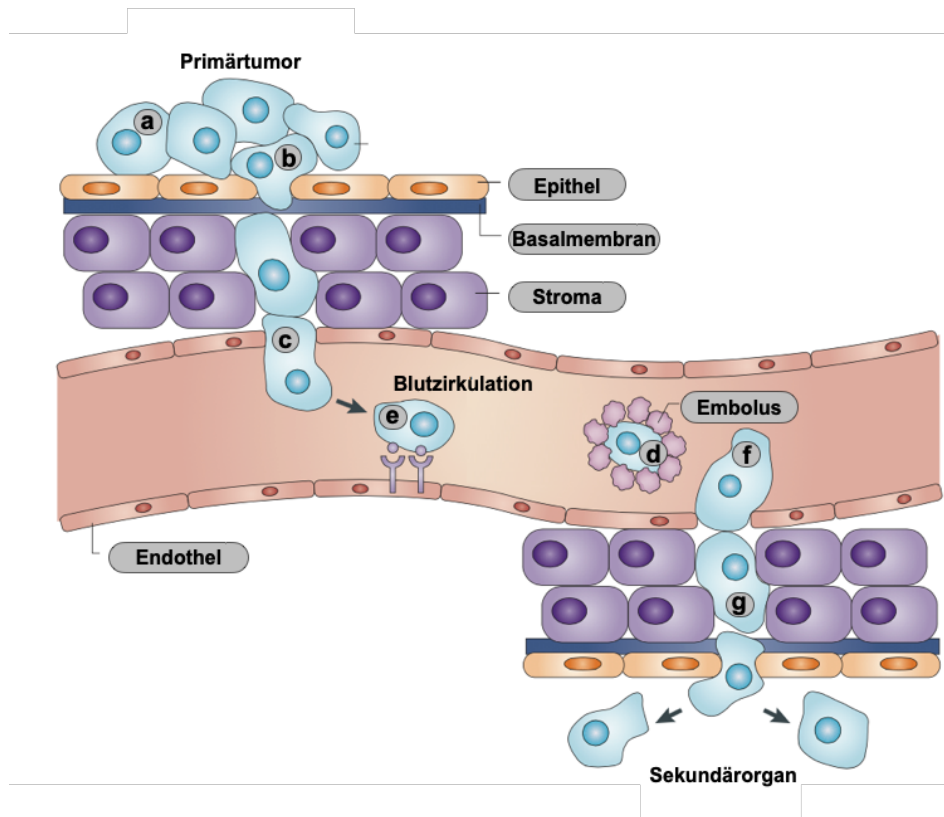


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Invasions-Metastasierungskaskade von Karzinomen. **a** Um sich aus dem Primärtumor zu lösen, nehmen Tumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp an. **b** Dieser befähigt sie, durch die Basalmembran in das umliegende Stroma einzudringen und dieses zu durchwachsen. **c** Intravasation in die Zirkulation. **d** In der Zirkulation sind Tumorzellen Scherkräften und Immunzellen ausgesetzt, denen sie durch Bildung eines Embolus entkommen. **e** Tumorzellen können mit Hilfe von Liganden-Rezeptor-Interaktionen an das Endothel binden, um in bestimmte Sekundärorgane einzudringen (*Homing*). **f** Extravasation im Kapillarbett des Zweitorgans wird zum Beispiel durch Induktion von Hyperpermeabilität des Endothels begünstigt. **g** Um das Sekundärorgan zu kolonialisieren und dort zu proliferieren, interagieren die Tumorzellen mit der fremden Mikroumgebung. Modifiziert nach [61].

Um zunächst aus dem gut begrenzten Tumorzellverband in das umliegende Gewebe vorzustößen, müssen die Zellen ihre Basalmembran durchbrechen. Dieser Bestandteil der ECM dient im physiologischen Kontext der Trennung des epithelialen und stromalen Kompartiments. Hierzu müssen sich die Zellen aus ihrem epithelialen Zellverband lösen und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser Prozess wird Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) genannt und beinhaltet das Auflösen der interzellulären Kontakte, den Verlust von Zellpolarität und die Sekretion von Matrixmetalloproteasen, welche für die nachfolgende Degradation der Basalmembran und der ECM notwendig sind (**Abbildung 2b**) [60,62]. Die EMT wird intrazellulär durch Transkriptionsfaktoren wie Slug, Snail, Twist, ZEB1 und ZEB2 orchestriert. Aber auch Zellen aus dem Tumorstroma wie Makrophagen oder T-Zellen begünstigen den Erwerb eines invasiven Phänotyps durch die Sekretion von Zytokinen [39,40]. Der nächste Schritt nach dem Überwinden der Basalmembran und des Durchwachsens

des lokalen Tumorstromas ist die Intravasation in Blutgefäße (**Abbildung 2c**). Der Eintritt in die Blutzirkulation wird auch durch die Tumorangiogenese bedingt. Neoplastische Zellen stimulieren hierbei durch die Sekretion von pro-angiogenetischen Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) das Einsprossen von Kapillaren, welche sich von physiologischen Blutgefäßen durch ihre durchlässige Wandstruktur und fenestrierte Endothelzellschichten unterscheiden. In der Zirkulation angekommen sind die Tumorzellen Scherkräften und Immunzellen ausgesetzt, denen sie durch die Bildung eines Embolus mit Hilfe der Blutkoagulation entkommen (**Abbildung 2d**). Der nächste Schritt ist die Extravasation im Kapillarbett des Zweitorgans. Dieser Prozess kann auf verschiedene Weisen stattfinden: Tumorzellen können beispielsweise das Blutgefäß durch intravasales Wachstum zum Platzen bringen oder sie sezernieren Proteine wie VEGF, welches eine Hyperpermeabilität des Endothels induziert (**Abbildung 2f**). Da sich die Mikroumgebung des Zweitorgans wesentlich von der des Primärtumors unterscheidet, müssen sich die disseminierten Tumorzellen (DTC) zunächst anpassen. Um klinisch manifeste Metastasen ausbilden zu können, müssen daher diverse Adaptionsprozesse stattfinden (**Abbildung 2g**). Hierfür werden verschiedene Szenarien postuliert: Die erste Theorie ordnet diesen Prozess zeitlich bereits vor der eigentlichen Metastasierung ein: Der Primärtumor sezerniert systemisch Zytokine oder Exosomen, welche dann das Gewebe des Zweitorgans zu einer tumor-begünstigenden "Prä-Metastatischen Nische" umbauen. Andere Studien konnten wiederum zeigen, dass DTC im Zweitorgan zuerst für längere Zeit in ein Ruhestadium übergehen, in dem sie weder proliferieren noch absterben (Dormanz). Erst eine Veränderung der Mikroumgebung oder intrinsische Adaptionsprozesse der Karzinomzellen führen zu deren Reaktivierung. Zuletzt sind auch zwei weitere Szenarien denkbar, in denen die Tumorzellen entweder nach Ankunft im Zweitorgan durch lokale Immunzellen eliminiert werden oder aber sofort optimal angepasst sind und ungehemmt proliferieren [60,63].

Insgesamt stellt die gesamte Invasions-Metastasierungskaskade einen höchst ineffizienten Prozess dar. Es wird angenommen, dass weniger als 0,01% der Tumorzellen, die den Primärtumor verlassen haben, eine klinisch detektierbare Metastase ausbilden [64].

1.2.2 Metastasierung des PDAC

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, ist die frühe und bei vielen Patienten auftretende Metastasierung des PDAC die Hauptursache für die vernichtende Prognose. Für den Erwerb der Fähigkeit zu metastasieren wurde für lange Zeit die Akkumulation der Schlüsselmutationen *KRAS*, *p16/INK4A*, *TP53* und *SMAD4* als Voraussetzung gehalten [65,66]. Dies konnte auch in humanen Tumorschnitten gezeigt werden, in denen eine Kombination dieser vier genetischen Alterationen mit mehr Metastasen assoziiert war als nur das Tragen ein oder zwei der Mutationen [67]. Da diese genetischen Veränderungen in der Regel erst im Verlauf der pankreatischen Karzinogenese auftreten, wird die Metastasierung als spätes Ereignis in der Tumorprogression des PDAC betrachtet. Diese Annahme wird durch genetische Analysen und mathematische Modellierung unterstützt, welche zeigten, dass der Schritt von einer physiologischen Zelle bis zu einer Metastase durchschnittlich 20 Jahre braucht und Metastasierung in den letzten drei Jahren vor dem Versterben des Patienten auftritt [68]. Während das Modell der späten Dissemination in Einklang mit diesen Ergebnissen steht, kann es für die klinische Beobachtung, dass 25% der zuvor metastasen-freien Patienten nach R0-Resektion ausschließlich Rezidive in der Leber entwickeln, keine Erklärung liefern [69]. Neuere Studien konnten daher in einem endogenen PDAC-Mausmodell zeigen, dass bereits prä-maligne Pankreasgangepithelzellen eine EMT durchlaufen, aus dem Pankreas und in die Leber einwandern können [70]. Diese Befunde konnten durch den Nachweis von zirkulierenden Pankreasgangepithelzellen im Blut von Patienten mit zystischen Pankreasläsionen bestätigt werden und deuten auf ein Modell der frühen Metastasierung hin, in dem Pankreasgangepithelzellen bereits parallel zur Karzinogenese des Primärtumors das Pankreas verlassen und in die Leber einwandern [71]. Dort angekommen fehlt ihnen jedoch noch die Fähigkeit, manifeste Metastasen auszubilden, weswegen angenommen wird, dass entweder weitere Mutationen oder aber Veränderungen der Lebermikroumgebung notwendig sind, um dies zu ermöglichen [70].

1.2.3 Die Lebermikroumgebung

Die Leber ist das Hauptmetastasierungsorgan des PDAC. 80% der Metastasen finden sich hier; deren Auftreten ist im Vergleich zu anderen Lokalisationen von Metastasen wie der Lunge oder dem Peritoneum mit der schlechtesten Prognose assoziiert [9,72].

Im Gegensatz zu der Tumorprogression des Primarius wird die Entstehung von Lebermetastasen noch unzureichend verstanden. Diese bietet aber gerade vor dem Hintergrund einer möglichen frühen Dissemination von Tumorzellen gute Möglichkeiten für eine therapeutische Intervention.

Die Leber ist lokalisiert im rechten Oberbauch unterhalb des Zwerchfells und dient der Verstoffwechselung von Nahrungsbestandteilen, der Entgiftung sowie der Produktion von essentiellen Proteinen. Um diesen umfangreichen und lebenswichtigen Aufgaben nachzukommen ist die Leber sehr gut vaskularisiert. Ihre einzigartige Blutversorgung besteht zu einem Viertel aus der Arteria Hepatica und zu drei Vierteln aus der Vena Portae [73].

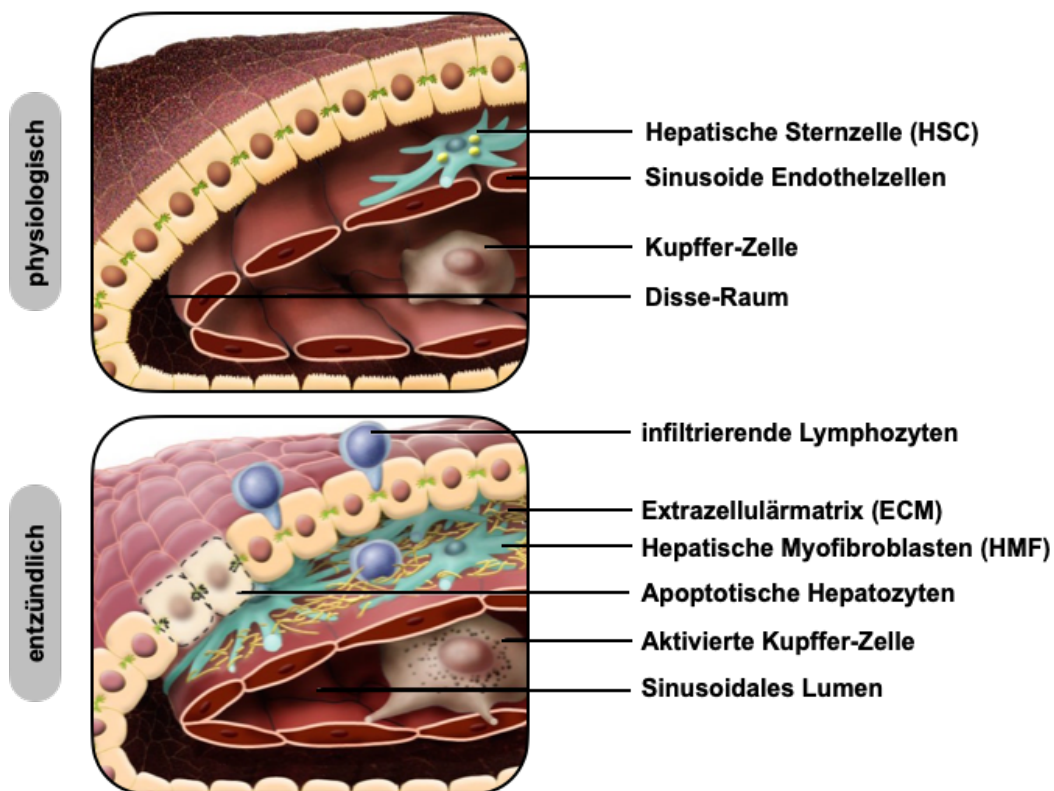


Abbildung 3: Zelluläre Bestandteile der Mikroumgebung einer physiologischen oder entzündlichen Leber.
Oben: In einer physiologischen Leber befinden sich hepatische Sternzellen im Disse-Raum und speichern Vitamin A ein. **Unten:** Durch entzündliche Reize zum Beispiel in Form einer viralen Infektion oder chronischem Alkoholabusus kommt es zu einer Aktivierung der Sternzellen zu hepatischen Myofibroblasten. Die Speicherung von Vitamin A wird zugunsten der Produktion von ECM Proteinen sowie verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren eingestellt. Diese Veränderungen tragen zu einem entzündlichen Lebermilieu bei. Modifiziert nach [74].

Auf zellulärer Ebene besteht die Leber vor allem aus den Parenchym-bildenden Hepatozyten, den Kupferzellen (KC), Endothelzellen, einer Reihe von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie hepatischen Sternzellen (HSC) [75]. Letztere machen etwa 5-8% der Leberzellen aus und befinden sich im Disse-

Raum (**Abbildung 3**). Während sie in ihrer ruhenden Form vor allem der Speicherung von Vitamin A dienen, werden sie durch eine Verletzung der Leber zum Beispiel in Form einer viralen Infektion oder eines chronischen Alkoholabusus aktiviert [76]. Dieser Prozess setzt verschiedenste zelluläre Veränderungen in Gang: Die Vitamin A Speicherung wird zugunsten der Synthese von Matrixmetalloproteasen und ECM Proteinen aufgegeben, die HSC beginnen zu proliferieren und Wachstumsfaktoren wie *Transforming Growth Factor β 1* (TGF- β 1), *Platelet-Derived Growth Factor* oder *Hepatocyte Growth Factor* zu sezernieren [77]. HSC entwickeln sich zu hepatischen Myofibroblasten (HMF) und exprimieren *α -Smooth Muscle Actin* (α -SMA) [76]. Da in Folge diese Vorgänge zu einem entzündlichen Milieu und zu einer reaktiven fibrotischen Wundheilung der Leber beitragen, sind HMF die Haupteffektoren inflammatorischer Prozesse der Leber (**Abbildung 3**) [75].

Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass dieselben fibrotischen Abläufe auch dazu dienen können, die Leber als Zweitorgan als prä-metastatische Nische auf DTC vorzubereiten [78–80]. Dazu können bereits prä-maligne Läsionen des Pankreasgangs sowie auch ein PDAC Mediatoren in die systemische Zirkulation entlassen, welche in der Leber entweder direkt oder über Makrophagen HSC aktivieren. Die dadurch entstandenen HMF verändern durch Sekretion von ECM Proteinen wie Periostin oder Fibronectin sowie Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten die Mikroumgebung so, dass ankommende Tumorzellen direkt in dieser vorbereiteten Umgebung auswachsen können [78–80]. Neben ihrer Beteiligung an der Entstehung scheinen HMF auch für die weitere Aufrechterhaltung von PDAC Lebermetastasen relevant zu sein, wie ihr vielzähliges Vorhandensein in histologischen Präparaten zeigt [81,82].

1.3 TNF-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)

Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) oder Apo2L gehört wie *Tumor Necrosis Factor* (TNF) und CD95 Ligand zu den Zytokinen der TNF-Superfamilie und wird als Typ II Transmembranprotein exprimiert oder aber durch eine Cysteinprotease in seine lösliche Form abgespalten [83,84]. Während die ursprüngliche Entdeckung mit der vielversprechenden Beobachtung verknüpft war, dass TRAIL selektiv in Tumorzellen Apoptose induziert und dabei gesunde Zellen ausspart, zeigten weitere Studien jedoch eine mögliche Toxizität TRAILs auf [85–87].

1.3.1 Das TRAIL-Rezeptorsystem

Insgesamt wurden vier membrangebundene sowie ein löslicher Rezeptor für TRAIL identifiziert (**Abbildung 4**). TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5 besitzen eine vollständige intrazelluläre Todesdomäne (DD), mit welcher sie in der Lage sind, Apoptose zu induzieren [88,89]. Während TRAIL-R3/DcR1 mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers zwar in der Plasmamembran befestigt ist, aber keine intrazelluläre Domäne besitzt, hat TRAIL-R4/DcR2 zwar einen zytoplasmatischen Teil, dieser ist allerdings eine trunktierte DD [90,91]. Letztere werden somit als *Decoy*-Rezeptoren bezeichnet, da die kompetitive Bindung von TRAIL an diese Rezeptoren zu einer verminderten Verfügbarkeit von TRAIL für die Bindung der pro-apoptotischen Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 führt; hierdurch sowie durch die Bildung von dysfunktionalen Komplexen wird die Apoptose-Induktion gehemmt [92]. Zuletzt wurde der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) beschrieben. Dieser funktioniert physiologisch als Rezeptor für *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand* und ist in den Knochenstoffwechsel involviert [93]. Seine Relevanz als *Decoy*-Rezeptor ist unklar, da er bei physiologischer Temperatur nur eine geringe Affinität zu TRAIL aufweist [94].

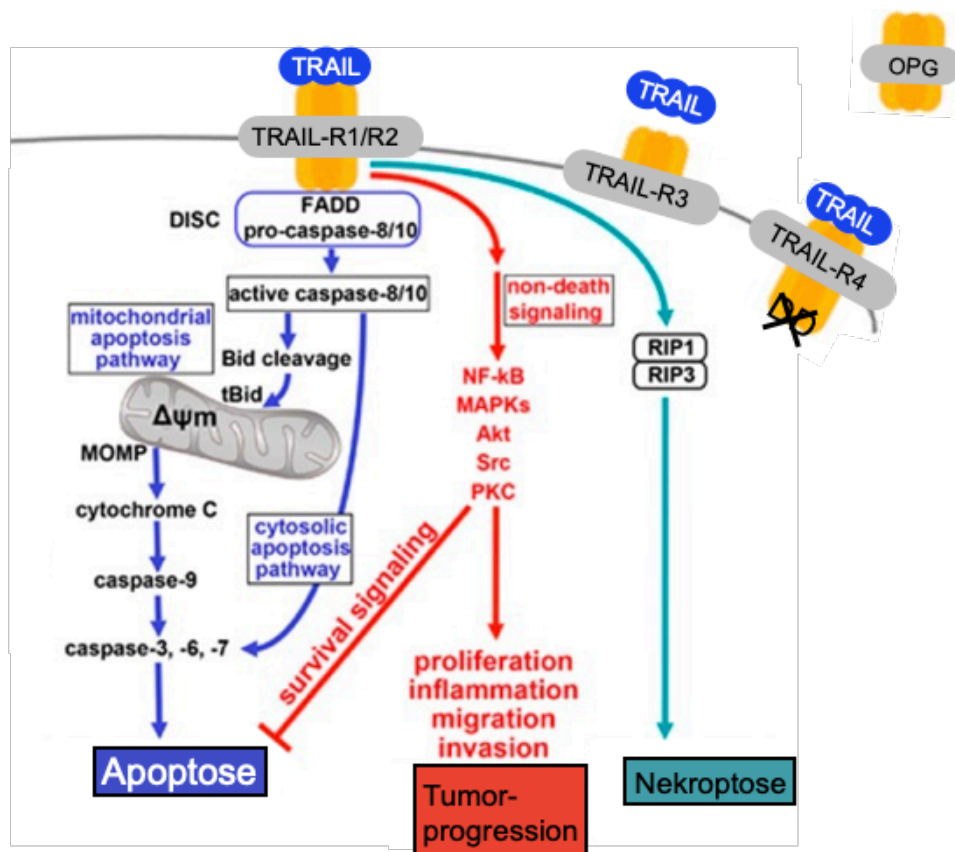


Abbildung 4: Das TRAIL-Rezeptorsystem und seine Funktionen. Nach Bindung von TRAIL können die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 den Zelltod über Apoptose oder Nekroptose induzieren. Alternativ ist auch eine Aktivierung von multiplen nicht-kanonischen Signalwegen möglich, die unter anderem Proliferation, Migration und Entzündung fördern. TRAIL-R3 und TRAIL-R4 besitzen keine funktionelle intrazelluläre Domäne und funktionieren als Decoy-Rezeptoren. Osteoprotegerin (OPG) ist ein löslicher Rezeptor, dessen physiologische Funktion im Kontext des TRAIL-Rezeptorsystems fraglich ist. MOMP (Perforation der äußeren Mitochondrienmembran). Modifiziert nach [95].

1.3.2 TRAIL-Rezeptor induzierte Signalkaskaden

Die klassische Funktion der Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 ist die Induktion der Apoptose (**Abbildung 4**) [96]. Die Bindung des trimerisierten TRAIL an einen der beiden Todesrezeptoren führt zur deren Trimerisierung und zur folgenden *Clusterung* der DD. Diese Konfiguration ermöglicht die Bindung des Adapterproteins *FAS-associated Death Domain Protein* (FADD), welches über seine Todeseffektordomäne die Procaspasen -8 und/oder -10 rekrutiert [97,98]. Die Bildung dieses membranständigen *Death-inducing Signalling Complex* (DISC) fördert die Autoaktivierung der Procaspasen 8 und 10, die daraufhin in das Zytosol freigesetzt werden und die Effektorcaspasen -3, -6 und -7 in ihre aktive Form spalten. Als Folge dieser Aktivierungs-Kaskade kommt es zum apoptotischen Zelltod [83]. In sogenannten Typ-I-Zellen reicht die Menge der aktivierten Initiatorcaspase -8 aus, um ausschließlich auf diesem sogenannten extrinsischen Wege Apoptose auszulösen. Davon unterschieden werden Zellen des Typs II, in denen aufgrund einer zu geringen Menge an aktivierter

Caspase 8 zusätzlich eine mitochondriale Verstärkungsschleife benötigt wird, um suffizient die Effektorcaspasen zu aktivieren [99]. Hierfür erfolgt die proteolytische Aktivierung von *BH3-interacting-domain death agonist* (BID) durch Caspase-8 zu trunktiertem BID (tBID). tBID interagiert nun mit Bax und Bak mit der Konsequenz, dass die äußere Mitochondrienmembran perforiert und pro-apoptische Proteine wie Cytochrom C oder Smac/Diablo in das Zytosol freigesetzt werden [100,101]. Zusammen mit Adenosintriphosphat und *Apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) bildet Cytochrom C das Apoptosom, welches über Spaltung der Caspase-9 ebenfalls die Effektorcaspasen-3 mit resultierender Induktion der Apoptose aktivieren kann [102,103].

Neben dieser pro-apoptischen Funktion konnte in neueren Studien jedoch auch gezeigt werden, dass TRAIL über TRAIL-R1 und TRAIL-R2 auch tumorfördernde Signalwege induzieren kann (**Abbildung 4**) [104]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass TRAIL nach Bindung an einen der Todesrezeptoren neben der Entstehung des DISC auch die Bildung eines sekundären Signalkomplexes durch Caspase-8, FADD, *Receptor Interacting Protein 1*, *TNF receptor-associated factor 1* und *TNF receptor type 1-associated death domain protein* fördert [105]. Dieser Komplex ermöglicht die Aktivierung von *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF-κB), einem pro-inflammatorischen und anti-apoptischen Transkriptionsfaktor [106–108]. Weiterhin induziert TRAIL über den sekundären Signalkomplex auch Kinasen wie *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), *Proteinkinase C* (PKC), SRC, p38 und AKT. Dies hat eine vermehrte Proliferation, Apoptoseresistenz, Migration und Invasion der Tumorzellen *in vitro* zur Folge [107,109–112]. Die tumorprogressions-fördernde Komponente der TRAIL-TRAIL-Rezeptor Achse konnte auch in verschiedenen *in vivo* Modellen gezeigt werden, in denen TRAIL zu einem stärkeren Tumorwachstum, vermehrter Metastasierung und einem verminderten Überleben führt [113–115].

Während alle bisher beschriebenen Effekte durch Plasmamembran-gebundene TRAIL-Rezeptoren vermittelt werden, konnte in neueren Studien auch eine Funktion des TRAIL-R2 im Nukleus von Tumorzellen nachgewiesen werden [95]. Hier interagiert TRAIL-R2 mit den Proteinen des Mikroprozessorkomplexes, inhibiert darüber die Reifung der microRNA let-7 und steigert so die Proliferation und die Malignität der Krebszellen [116].

Zusammengefasst bieten die vielfältigen Signalwege, welche durch TRAIL-Rezeptoren induziert werden können, einen Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass die vermehrte oder verminderte Expression der Rezeptoren sowie deren zelluläre Verteilung in unterschiedlichen Tumorentitäten mit sowohl besseren, als auch schlechteren prognostischen Faktoren assoziiert sein kann [117–122].

1.4 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 7-9% weist das PDAC eine äußerst ungünstige Diagnose auf und stellt trotz seiner niedrigen Inzidenz einer der häufigsten Ursachen krebserkrankter Todesfälle dar [1,2]. Eine besondere klinische Herausforderung des PDAC ist die Metastasierung: Zu einem weist bereits ein Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen auf, so dass diesen Patienten nur noch eine palliative Therapie ermöglicht werden kann, zum anderen entwickeln auch Patienten, deren Primärtumor erfolgreich reseziert wurde und die eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, innerhalb weniger Monate nach Operation oder sogar noch unter der adjuvanten Therapie Fernmetastasen [4–7,123]. Während das Wachstum des Primärtumors meist durch Chemotherapie kontrollierbar ist, bieten aktuelle Therapiemodalitäten kaum bis gar keine Effizienz in der Behandlung von Metastasen, so dass diese den vorrangigen Grund für den lebenslimitierenden Verlauf der Erkrankung darstellen [124–127].

Das Auftreten von Fernmetastasen, vor allem in der Leber, dem Hauptmetastasierungsorgan des PDAC, nach einer erfolgreichen R0-Resektion geht vermutlich von disseminierten Tumorzellen und Mikrometastasen in der Leber aus, die bereits zum Zeitpunkt der Diagnose vorhanden sind, aber sich aufgrund ihrer Größe unterhalb der klinischen Detektionsgrenze befinden [7,123,128–132]. In Übereinstimmung mit dieser Theorie konnte nachgewiesen werden, dass die Dissemination von prä-malignen Pankreasepithelzellen und deren Einwandern in die Leber bereits ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese sein kann, wobei diese Zellen über längere Zeit in der Leber persistieren können ohne zu klinisch detektierbaren Metastasen fortzuschreiten [70]. Neue Studien konnten zeigen, dass das Auswachsen dieser disseminierten Zellen erheblich von der Interaktion der Tumorzellen mit der hepatischen Mikroumgebung abhängig ist. In diesem Zusammenhang wurden bereits Hepatozyten [133], Makrophagen [79,134], dendritische Zellen [135], Neutrophile Granulozyten [136] und hepatische Sternzellen [78–80,137,138] identifiziert, die auf

verschiedene Weise zur Ausbildung manifester Lebermetastasen beitragen. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten vor allem die Beteiligung letzterer Zellpopulation genauer aufklären. HSC sind die Haupteffektorzellen inflammatorischer Prozesse in der Leber und können nach Stimulation durch verschiedene entzündliche Vorgänge zu ihrer aktivierten Form den HMF transdifferenzieren [74,75]. Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass HSC PDAC Zellen in einen ruhenden, nicht proliferativen Zustand versetzen, während HMF diesen Zustand aufheben, die Proliferation von PDAC Zellen fördern und darüber das Auswachsen von Metastasen ermöglichen [139]. Als Entzündungsprozess, welcher die Transdifferenzierung von HSC zu HMF und damit das Auswachsen von Lebermetastasen *in vivo* angestoßen hat, konnten hier alterungs-assoziierte Prozesse nachgewiesen werden. Auch andere Studien konnten zeigen, dass Entzündungsvorgänge die Ausbildung von Fernmetastasen begünstigen oder sogar verursachen können [140–143]. Eine dieser Veröffentlichungen lieferte eindeutige experimentelle Beweise, dass die systemische Entzündungsantwort auf einen operativen Eingriff bereits als Stimulus für das Auswachsen von Brustkrebs-Metastasen ausreichen kann [140]. Im PDAC hingegen ist es jedoch noch unzureichend verstanden, inwiefern die Resektion des Primärtumors einen Entzündungsprozess auslöst, welcher das Auswachsen von Lebermetastasen fördert und ob dieser Prozess von systemischer oder auch von lokaler Natur ist.

Neben der hepatischen Mikroumgebung und inflammatorischen Vorgängen scheint auch TRAIL-R2 eine wichtige Determinante für die Metastasierung des PDAC zu sein. Neben seiner klassischen Apoptose-induzierenden Funktion konnten bereits seine Beteiligung an jedem Schritt der malignen Progression verschiedener Tumoren nachgewiesen werden [104,105,109,112–116]. Während diese Vorgänge vor allem als zellintrinsisch vermittelt verstanden werden, wurde zuletzt gezeigt, dass TRAIL rezeptorvermittelt auch parakrin die Tumormikroumgebung verändert und darüber das Tumorstadium fördert [144]. Weiterhin konnte TRAIL-R2 sowohl im PDAC als auch im Brustkrebs eine metastasierungs-fördernde Funktion zugeschrieben werden [114,115,145]. Unklar ist dennoch, welche Rolle TRAIL-R2 in der postoperativen Lebermetastasierung des PDAC einnimmt und inwiefern seine metastasierungs-fördernde Funktion durch die Mikroumgebung und Inflammation beeinflusst wird.

Da sowohl die Lebermikroumgebung als auch TRAIL-R2 Determinanten der Lebermetastasierung des PDAC sind, ihre Interaktion aber weitestgehend unzureichend

verstanden wird, ist dies Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Es sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern die Resektion des Primärtumors einen Entzündungsprozess darstellt, der die Lebermetastasierung in Abhängigkeit der beiden oben genannten Punkte beeinflusst. Hierfür wurde zunächst ein klinisch-adaptiertes Resektionsmodell *in vivo* genutzt, um die Lebermetastasierung von PDAC Zellen mit oder ohne genetisch unterdrücktem TRAIL-R2 zu untersuchen. Im selben Modell wurden weiterhin inflammatorische Zytokine und Marker der HSC-Aktivierung in Lebern von operierten und nicht operierten Mäusen untersucht, um den Einfluss der Operation auf den Entzündungsstatus der Leber zu analysieren. Um *in vitro* die prä- und post-operative Situation in der Leber weiter zu charakterisieren, wurde die physiologische Leberumgebung (prä-operativ) durch HSC und die entzündliche Lebermikroumgebung (post-operativ) durch HMF simuliert, die mit TRAIL-R2 unterdrückten PDAC Zellen oder entsprechenden Kontrollzellen kokultiviert wurden. Um die humorale Interaktion der verschiedenen Zellpopulationen in Kokultur nachvollziehen zu können, sind inflammatorische Zytokine in den Überständen bestimmt worden. Die funktionale Bedeutung bestimmter Zytokine wurde nachgewiesen, in dem diese mittels neutralisierender Antikörper blockiert und anschließend erneut die funktionellen Eigenschaften der PDAC Zellen überprüft wurden.

Insgesamt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Lebermetastasierung von PDAC Patienten führen.

2 Materialien

2.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Inkubationsgeräte	
BBD 6220 CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Schwerte, DE
GyroTwister Schwänker	Labnet, Woodbridge, USA
HERA Cell 240 Brutschrank	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Multigourmet Dampfbad	Braun, Kronberg, DE
QBA1 Tisch-Inkubator	Grant, Cambridge, UK
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, DE
WTC ED-53 Inkubationsschrank	Binder, Tuttlingen, DE
Messgeräte	
FACS Calibur™ Durchflusszytometer	Beckton Dickinson, Heidelberg, DE
FACS Verse™ Durchflusszytometer	Beckton Dickinson, Heidelberg, DE
Fusion SL Detektionssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Infinite ^R 200PRO Microplate Reader	Tecan, Crailsheim, DE
Light Cycler 480 II	Roche, Basel, CH
Nanoquant Plate	Tecan, Crailsheim, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, DE
Mikroskope	
AE 2000	Motic, Wetzlar, DE
Axiovert 25	Zeiss, Jena, DE
BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, DE
Evos _{XL} Core	AMG, Bothell, USA
Lionheart™ FX	BioTek, Bad Friedrichshall, DE

Mischgeräte, Schneidegeräte, Andere

Heizplatte PST 100	Omnilab Laborzentrum, Bremen, DE
Schwingmühle MM 301	Retsch GmbH, Haan, DE
HM 430 Mikrotom	Microm, Walldorf, DE
IKA Vortex Genius 3	IKA, Staufen, DE
Mini-Membran Vakuumpumpe VP86	VWR International, Darmstadt, DE
MR Hei-Mix S	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Paraffin Streckbad	MEDAX, Neumünster, DE

Kühlgeräte

HERAFreeze Basic Tiefkühler (-80°C)	Thermo Scientific, Scherte, DE
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
TES 99 Kühlplatte	Medite, Burgdorf, DE
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE

Pipetten

Finnpipette 20-200 µL	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette 100-1000 µL	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Pipetboy-acu	Integra-Biosciences, Fernwald, DE
Ripette	Ritter, Schwabmünchen, DE
Finnpipette 0,2-2 µL	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette 2-20 µL	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette 1-10 µL	Thermo Scientific, Schwerte, DE

Sterilbänke

HERA Safe KS	Thermo Scientific, Schwerte, DE
--------------	---------------------------------

Waagen

Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB 120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

Zentrifugen

Haraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Haraeus Multifuge X1	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Haraeus Pico 17	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, DE
Sprout Mini Zentrifuge	Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6- / 12- Well Flachbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
6- / 12- Well Transwelleinsätze (Porengröße 0,4 µm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Deckgläser 22 x 50 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, DE
Eppendorfgefäße 1,5 mL / 2 mL	Eppendorf, Hamburg, DE
Nitril-Untersuchungshandschuhe	Ansell GmbH, München, DE
Parafilm "M"	Bemis, Neenah, USA
Pipettenspitzen 20 µL / 200 µL / 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Ritips 25 µL / 50 µL / 100 µL	Ritter, Schwabmünchen, DE
Röhrchen 15 mL / 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten 5 mL / 10 mL / 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Serumpipette 153 mm, lang	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Whatman-3MM Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Zellkulturflaschen 75cm ³	Sarstedt, Nümbrecht, DE
18 mm Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig, DE
96-Well Rundbodenplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
96-Well-PCR Platten (weiß)	Roche, Basel, CH

Adhäsions Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
PDVF Membran 0,45 µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Rundröhrchen 40 x 60 mm	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Zellkratzer 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, München, DE
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva, Heidelberg, DE
Bromphenolblau	Th. Geyer, Renningen, DE
cOmplete™ mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, CH
Dulbeccos MEM Medium	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Dulbeccos Phospat-gepufferte Saline (PBS)	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Envision + System HRP <i>anti mouse</i>	Dako Diagnostika, Hamburg, DE
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Essigsäure	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Th. Geyer, Renningen, DE
FluorSave	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Fluoro-Gel	Science Services GmbH, München, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Gibco™ RPMI Medium 1640	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Glutamax	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Gram's Krystalviolett Lösung	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hoechst 33528	Sigma-Aldrich, München, DE
IGEPAL® CA-630	Sigma-Aldrich, München, DE

Chemikalien	Hersteller
L-Glutamin (L-Gln)	PAA, Pasching, A
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, CH
Mayer's Haemalaun	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Mounting Medium	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Nagellack <i>Essence</i>	Cosnova, Frankfurt, DE
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Penicilin-Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Salzsäure (HCl) 1 M	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Natrium-Pyruvat	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Opti-MEM	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Paraformaldehyd	Affymetrix, Cleveland, USA
Puromycin 10 mg/mL	InvivoGen, San Diego, USA
Sudan Black B	Sigma-Aldrich, München, DE
Tris-Base	Carl Roth, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin-EDTA	Biowest, Nuaille, FR
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DE
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

2.4 Puffer

Puffer	Rezeptur
PBS-Puffer (10x)	160 g Natriumchlorid 4 g Kaliumchlorid 34,8 g Dinatriumhydrogenphosphat 4,8 g Kaliumdihydrogenphosphat Aqua dest.: ad 2000 mL pH 7,4

2.5 Kit Systeme

Kit Systeme	Hersteller
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Lab Vision™ MultiVision Polymer Detektionssystem	Thermo Fisher, Darmstadt, DE
LEGENDplex™ human Inflammation Panel Immunoassay	Bio Legend, Koblenz, DE
LEGENDplex™ murine Inflammation Panel Immunoassay	Bio Legend, Koblenz, DE
Mouse VEGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden, DE
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Schwerte, DE

2.6 Software

Software	Hersteller
BIOREVO	Keyence, Neu-Isenburg, DE
Light Cycler 480 Software	Roche, Basel, CH
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim, DE
Microsoft Excel 2016	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Gen5 Microplate Reader und Imager Software	BioTek, Bad Friedrichshall, DE
ImageJ 1.47v	Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
GraphPad Prism 7.0a	GraphPad Software, San Diego, USA
Mendeley Desktop 1.17.13	Mendeley Ltd., London, UK
SigmaPlot 12.5	Systat Software Inc., Chicago, USA

2.7 Zellbiologische Materialien

2.7.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Humane Pankreasadenokarzinom Zelllinien		
PancTul shCtrl	Aus Primärtumor isoliert von M. v. Bülow, Mutationen in <i>KRAS2</i> , <i>TP53</i> , <i>P16</i> ; stabil transduziert mit Kontroll-shRNA	[146]
PancTul shTR2	Aus Primärtumor isoliert von M. v. Bülow, Mutationen in <i>KRAS2</i> , <i>TP53</i> , <i>P16</i> ; stabil transduziert mit shRNA 16711 (TRAIL-R2)	[146]
Murine hepatische Stromazellen		
M1-4HSC	murine hepatische Sternzellen, isoliert aus p19 ^{ARF} null Mäusen, spontan aktiviert und immortalisiert <i>in vitro</i>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Mikulits, Medizinische Universität Wien, Wien, AT [76]
M-HT	Durch Gabe von 1 ng/mL TGF- β 1 aus M1-4HSC transdifferenzierte Myofibroblasten	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Mikulits, Medizinische Universität Wien, Wien, AT [76]

2.7.2 Medium

Medium	Zelllinie
DMEM high glucose, 10% FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Gln, 1% Pen/Strep	M1-4HSC
DMEM high glucose, 10% FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Gln, 1% Pen/Strep, 1 ng/mL TGF- β 1	M-HT
RPMI 1640, 10% FCS, 1% GlutaMax, 1% Natrium-Pyruvat, 2 μ g/mL Puromycin	PancTul shCtrl PancTul shTR2

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Primer

Gen	5'-3' Sequenz
Hersteller: realtimeprimers.com	
Murines α -Smooth Muscle Actin	fw-ATGCAGAAGGAGATCACAGC rv-CAGCTTCGTCGTATTCCTGT
Murines Collagen 1A1	fw-ATGATGCTAACGTGGTTCGT rv-TGGTTAGGGTCGATCCAGTA
Murines Desmin	fw-CAGGAGATGGAATACCG rv-GGCCATCTCATCCTTTAGGT
Humaner TRAIL-R1	fw-AGAGAGAAGTCCCTGCACCA rv-GTCACTCCAGGGCGTACAAT
Humaner TRAIL-R2	fw-CAATGGGGGAAGAAGAAGAA rv-GTCCCAGCCTGTCCATAGAT
Hersteller: Eurofins Genomics	
Murines/humanes GAPDH	fw-TCCATGACAACTTTGGTATCGTGG rv-GACGCCTGCTTCACCACCTTCT

2.9 Biochemische Materialien

2.9.1 Antikörper

Spezifität (Klon)	Wirt Isotyp	Stock- Konzentration	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper				
Humanes Cytokeratin-Large- Spectrum (KL1)	Maus, IgG1	126,5 µg/mL	1:100 (IF)	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Humanes Ki67 (B56)	Maus, IgG1	500 µg/mL	1:250 (ICC)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Sekundärantikörper				
anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488	Ziege, polyklonal	2000 µg/mL	1:500 (IF)	Thermo Scientific, Schwere, DE
anti-Mouse IgG Alexa Fluor 555	Esel, Polyklonal	2000 µg/mL	1:500 (IF)	Thermo Scientific, Schwere, DE

2.9.2 Wachstumsfaktoren, Zytokine und Blockade-Antikörper

Faktor	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
Humanes TGF- β 1	1 ng/mL	Bio Legend, Koblenz, DE
MAB208, murines IgG ₁ (anti humanes IL-8)	2,5 μ g/mL	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Murines IgG ₁ (Isotyp Kontrolle für MAB208)	2,5 μ g/mL	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Rituximab (Kontroll-Antikörper)	10 μ g/mL	Zur Verfügung gestellt von Prof. Matthias Peipp, Kiel, DE
Aflibercept (anti humanes/murines VEGF A/B + PDF)	10 μ g/mL	Zur Verfügung gestellt von Prof. Alexa Klettner, Kiel, DE
Etanercept (anti humanes/murines TNF- α)	10 μ g/mL	Pfizer Deutschland, Berlin, DE

3 Methoden

3.1 Aufarbeitung und Analyse von Probenmaterial aus verschiedenen Mausmodellen

3.1.1 Leber-Gewebe aus einem klinisch adaptierten Resektionsmodell

27 in Paraffin eingebettete Lebern von Mäusen aus einem klinisch adaptierten Resektionsmodell wurden in Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. Anna Trauzold (Institut für Experimentelle Tumorforschung, UKSH Kiel und Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie, UKSH Kiel) zur Verfügung gestellt. Bei diesem etablierten Tiermodell [147,148] wurden jeweils 1×10^6 PancTu-I shCtrl als Kontrolle oder PancTu-I shTR2 orthotop in die Pankreata von beige *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID beige) Mäusen (n=9 / Gruppe) inokuliert. Zehn Tage nach Inokulation sind bei allen Tieren beider Gruppen subtotale Pankreatektomien durchgeführt worden. Hierbei wurden die Primärtumore entfernt. Nach weiteren 26 Tagen wurden die Mäuse geopfert und die Lebern zuerst makroskopisch untersucht und dann in Paraffin eingebettet asserviert. Das Modell ist in (**Abbildung 5**) schematisch dargestellt. Anschließend sind mit einem Mikrotom aus den in Paraffin eingebetteten Präparaten serielle Schnitte mit einer Dicke von 3 μm angefertigt worden. Die Verwendung der Lebern sowie der Tierversuch selber wurde durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein (Aktenzeichen V312-7224.121-7(123-10/11)) genehmigt.

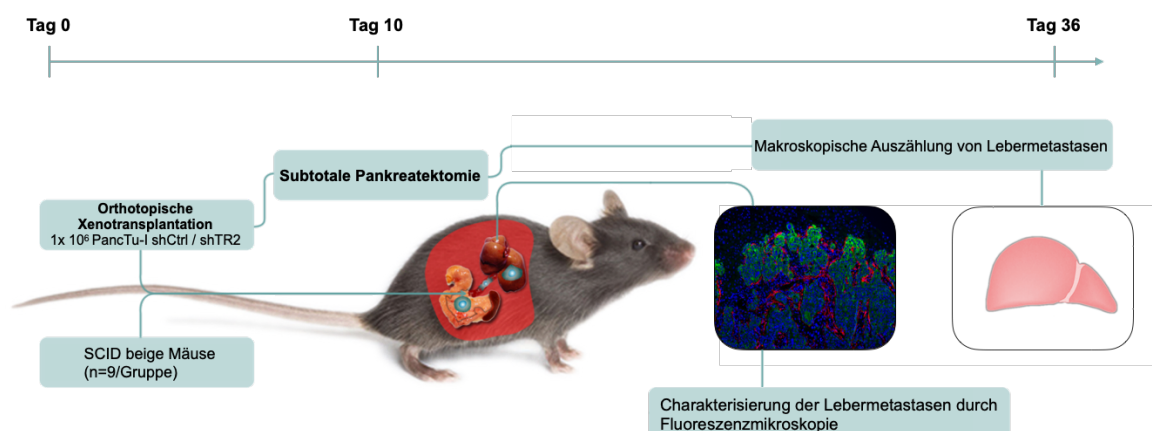


Abbildung 5: Schematische Darstellung des klinisch adaptierten Resektionsmodell. Um die klinische Situation einer R0-Resektion zu simulieren, wurden 1×10^6 PancTu-I shCtrl beziehungsweise PancTu-I shTR2 orthotop in SCID beige Mäuse inokuliert. Nach 10 Tagen ist der Primärtumor mittels einer subtotalen Pankreatektomie entfernt worden. 26 Tage später wurden die Mäuse geopfert und die Lebern erst makroskopisch untersucht und dann für weitere Untersuchungen asserviert. Modifiziert nach [149].

3.1.2 Leber-Gewebe aus einem Resektionsmodell (Schein-Operation)

In Kooperation mit Dr. med. Charlotte Hauser (Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax, Transplantations- und Kinderchirurgie, UKSH Kiel, Kiel) sind weitere 17 Lebern von Mäusen aus einem Schein-OP-Versuch zur Verfügung gestellt worden. Wie im oben beschriebenen Resektionsmodell (siehe 3.1.1) wurden SCID beige Mäuse verwendet. Diese sind ohne Inokulation von Tumorzellen entweder einer explorativen Laparotomie (n=4) oder einer subtotalen Pankreasektomie (n=9) unterzogen worden. Eine weitere Gruppe Mäuse blieb als Kontrolle chirurgisch unbehandelt (n=4). 48 Stunden nach Operation wurden alle Mäuse geopfert, die Lebern in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° Celsius für weitere Untersuchungen asserviert. Die Verwendung der Lebern sowie der Tierversuch selber sind durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein (Aktenzeichen V312-7224.121-7(123-10/11)) genehmigt worden.

3.1.3 Immunfluoreszenzfärbung auf Panzytokeratin und Ki67 in Paraffin-Schnitten

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode, um spezifische Proteine oder Antigene im Gewebe sichtbar zu machen und die Lokalisation und Intensität des Proteins zu charakterisieren. Dabei werden gegen das Zielprotein gerichtete Antikörper genutzt. In einem zweiten Schritt werden die Primärantikörper von einem Sekundärantikörper gebunden, der an ein Fluorochrom gekoppelt ist. Dieses kann in einem Fluoreszenzmikroskop mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. In dem angeregten Fluorochrom kommt es nun zu einem *Stokes Shift*, so dass das emittierte Licht langwelliger ist als das absorbierte. Das emittierte Licht wird dann mittels eines Emissionsfilters des Mikroskops aufgenommen und in ein Signal umgesetzt.

Die Paraffin-Schnitte wurden zunächst zweimal für jeweils zehn Minuten in Xylol entparaffinisiert und im Anschluss mit einer absteigenden Alkoholreihe in ein wässriges Milieu überführt. In dieser wurden sie zuerst zweimal für jeweils zehn Minuten in 100% Ethanol, für fünf Minuten in 96% Ethanol und im Folgenden für jeweils zwei Minuten in 70% Ethanol, 50% Ethanol und in Aqua dest. inkubiert. Nachdem die Schnitte für zehn Minuten in PBS gewaschen worden sind, wurden sie in vorgewärmten Citratpuffer bei pH 6.0 in einem Dampfkocher inkubiert, um die Antigene zu demaskieren. Anschließend sind sie dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen

worden und unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert, in dem die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 4% BSA in PBS-Triton inkubiert wurden. Der Primärantikörper wurde danach in seiner jeweiligen Verdünnung in 1% BSA in PBS-Triton eingesetzt (siehe 2.9.1) und die Schnitte damit über Nacht bei 4° Celsius in einer Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag sind die Schnitte dreimal für fünf Minuten in PBS-Triton gewaschen worden und im Weiteren 20 Minuten mit 0,3% Sudan Black B in 70% Ethanol in einer Feuchtkammer inkubiert, um die Autofluoreszenz des Gewebes zu reduzieren. Nachdem die Schnitte dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen worden sind, wurde der Sekundärantikörper 1:500 in 1% BSA in PBS-Triton eingesetzt. Zusätzlich wurde Hoechst 1:500 zugesetzt, welches an die DNA bindet und damit die Zellkerne sichtbar macht. Die Schnitte sind damit für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert worden. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS und einmaligen Waschen in Aqua dest. wurden die Schnitte mit FluorSave-Medium unter einem Deckgläschen versiegelt. Zu allen Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern sind parallel Färbungen mit einem passenden Isotyp-Kontroll-Antikörper durchgeführt worden. Diese zeigten keine oder nur schwache Signale.

3.1.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mit ImageJ

Die mittels Immunfluoreszenzfärbung behandelten Schnitte wurden im nächsten Schritt mit einem BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, DE) visualisiert und unter standardisierten Belichtungsbedingungen und bei 40-facher Vergrößerung fotografiert. Im nächsten Schritt sind die aufgenommenen Fluoreszenzsignale mit ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) quantifiziert worden. Bei ImageJ handelt es sich um ein etabliertes, für wissenschaftliche Bildanalysen entwickeltes Programm. Zuerst wurden die Bilder der untersuchten Gewebe in das Programm geladen und mit Hilfe des Befehls *Split Channels* in einzelne Fluoreszenzfarb-Kanal Bilder aufgeteilt (RGB - Rot, Grün, Blau). Im Kanal, welcher die Panzytokeratin-Färbung zeigte, wurde nun die Panzytokeratin positiven Zellen mit dem *Freehand Selection Tool* mit einem Rand, welcher einer Zellgröße entsprach, ausgewählt und damit eine *Region of Interest* erstellt. Im nächsten Kanal, der das Signal der auszuwertenden Färbung enthielt, ist nun mit dem Befehl *Threshold* ein binäres Bild erstellt worden. Dieses stellte anhand eines selber gewählten Trennwertes das positive Signal als Schwarz und das Hintergrundsignal als

weiß dar. Der Trennwert wurde anhand einer Positivkontrolle ausgewählt und während aller Auswertungen derselben Färbung beibehalten. Um nun spezifisch das Signal in den Panzytokeratin positiven Zellen zu quantifizieren, wurde in diesem binären Bild die vorher ausgewählte *Region of Interest* wiederhergestellt. Die Quantifizierung des Signals erfolgte nun durch den Befehl *Measure*, der mit dem Wert *Area Fraction* die prozentual positive Fläche des Signals errechnet.

Die angewendete Methode basiert auf einer bereits für Lebermetastasen etablierten Methode von Aiello *et al.* [82].

3.1.5 Gewinnung von Proteinüberständen aus schockgefrorenem Leber-Gewebe

Um im Folgenden die Konzentration verschiedener Zytokine in den Lebern der Mäuse mit Hilfe des LEGENDplex™-Systems (siehe 3.6.2) zu bestimmen, sind aus den schockgefrorenen Lebern (siehe 3.1.2) Proteinextrakte hergestellt worden.

Im ersten Schritt wurden von den Lebern auf einer Petri-Schale mit einem Skalpell ein Teil abgetrennt und dieser in ein Eppendorfgefäß übertragen. Um die Kontamination der Proben zu verhindern, wurden für jede Leber neue Petri-Schalen und Skalpelle verwendet. Als nächstes sind die Lebern mit Hilfe der Schwingmühle MM 301 (Retsch, Haan, DE) für 30 Sekunden homogenisiert worden. Durch diesen Prozess werden die Zellmembranen aufgebrochen, um so intrazelluläre Proteine für folgende Analysen zugänglich zu machen. Um eine nahtlose Kühlung der Lebern zu gewährleisten, fanden alle bisherigen Schritte durch flüssigen Stickstoff gekühlt statt. Das bei der Homogenisierung entstandene Kryogenpulver wurde unmittelbar in einem Puffer bestehend aus PBS, 1% IGEPAL® CA-630 und einem Proteasen-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und auf Eis gekühlt. IGEPAL® CA-630 ist ein nicht-ionisches Detergenz und unterstützt die Lösung von membrangebundenen Proteinen, während der Proteasen-Inhibitor-Cocktail die gelösten Proteine vor einer Degradierung durch endogene Proteasen schützt. Zuletzt wurden die Proben bei 10000 x g zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße übertragen. Diese wurden bei -80° Celsius aufbewahrt.

3.1.6 Isolierung von RNA aus schockgefrorenem Leber-Gewebe

Um im Folgenden mit Hilfe der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion die Expression verschiedener Gene in den Lebern der Mäuse zu quantifizieren (siehe 3.4.4), wurde aus den schockgefrorenen Lebern RNA isoliert.

Hierzu ist wie in 3.1.5 beschrieben ein Teil der Leber abgetrennt und homogenisiert worden. Das dabei entstandene Kryogenpulver wurde dann unmittelbar in 300 µL RNA-Lysepuffer aufgenommen und unter Benutzung des peqGOLD Total RNA Kits (PeqLab, Erlangen, DE) nach Angaben des Herstellers weiterverwendet (siehe 3.4.1).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37° Celsius in einem Brutschrank mit 5% CO₂ und 85% relative Luftfeuchte (rF) kultiviert. Abhängig von Konfluenz und Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen zwei- bis dreimal wöchentlich passagiert. Dabei wurde unter einer sterilen Werkbank mit autoklavierten Materialien gearbeitet.

Zuerst ist das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und diese einmal mit 37° Celsius warmen PBS gewaschen worden. Da es sich um adhärente Zellen handelt, wurden die Zellen mit 5 mL Trypsin/EDTA versetzt, einer Serin-Protease, um die Zellen vom Untergrund zu lösen und in Suspension zu bringen. Nach zehn Minuten Inkubation bei 37° Celsius in einem Brutschrank wurde die Zellsuspension in ein 50 mL Röhrchen überführt und die Trypsin-Reaktion mit 5 mL des jeweiligen Zellmediums abgestoppt, um Zellschäden zu vermeiden. Danach ist die Suspension fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert worden. Der Überstand wurde aspiriert und das Pellet im jeweiligen Zellmedium resuspendiert. Durch Variation der Menge des Zellkulturmediums konnte die Suspension im Anschluss daran im gewünschten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt werden.

Bei der Aussaat von Versuchen wurden alle verwendeten Zellarten gezählt, um sie in definierten Zellzahlen einzusetzen. Für die Zellzählung wurden 10 µL der Zellsuspension entnommen und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. In dieser wurde die Zellzahl in vier Großquadraten ausgezählt und die resultierende Zahl durch vier

dividiert. Das Ergebnis dieser Rechnung ist die mit 10^4 multiplizierte Zellzahl pro Milliliter der vorhandenen Suspension. Anhand der Zellzahl wurde Zellsuspension für den jeweiligen Versuch angepasst und in die entsprechenden Kulturplatten pipettiert.

3.2.2 Indirekte Kokultur von humanen Tumorzellen und murinen hepatischen Stromazellen

Um die Interaktion verschiedener Stromazellen der Lebermikroumgebung (physiologisch = HSC, entzündlich = HMF) auf die verschiedenen PDAC Zelllinien zu untersuchen, wurde ein indirektes Kokultursystem genutzt, welches ermöglicht, Zell-Zell Kommunikation auszuschließen und nur Interaktion über lösliche Faktoren zuzulassen.

Dafür wurden die Tumorzellen in den Wells von entweder 12-Well- oder 6-Well-Kulturplatten ausgesät. In 12-Well-Kulturplatten wurden pro Well jeweils 1×10^4 Tumorzellen in 1 mL ihres Kulturmediums ausgesät, in 6-Well-Kulturplatten wurde pro Well die doppelte Zellzahl in der doppelten Menge Medium eingesetzt. Die verschiedenen hepatischen Stroma-Zelllinien wurden in Transwelleinsätze mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ in separaten Kulturplatten der gleichen Größe ausgesät. Für 12-Well-Kulturplatten wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ Zellen in 1 mL ihres Kulturmediums eingesetzt, in 6-Well-Kulturplatten wurden 5×10^4 Zellen in 1,5 mL Medium ausgesät.

Nach einem Tag Monokultur beider Zellarten fand in allen Wells ein Mediumwechsel auf das einheitliche Kokulturmedium statt und die Transwells wurden für die Kokultur in die Wells mit den Tumorzellen eingesetzt (**Abbildung 6**). Die Dauer der Kokultur betrug sechs Tage.

Die Zellkultur aller Versuche erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 85% rF.

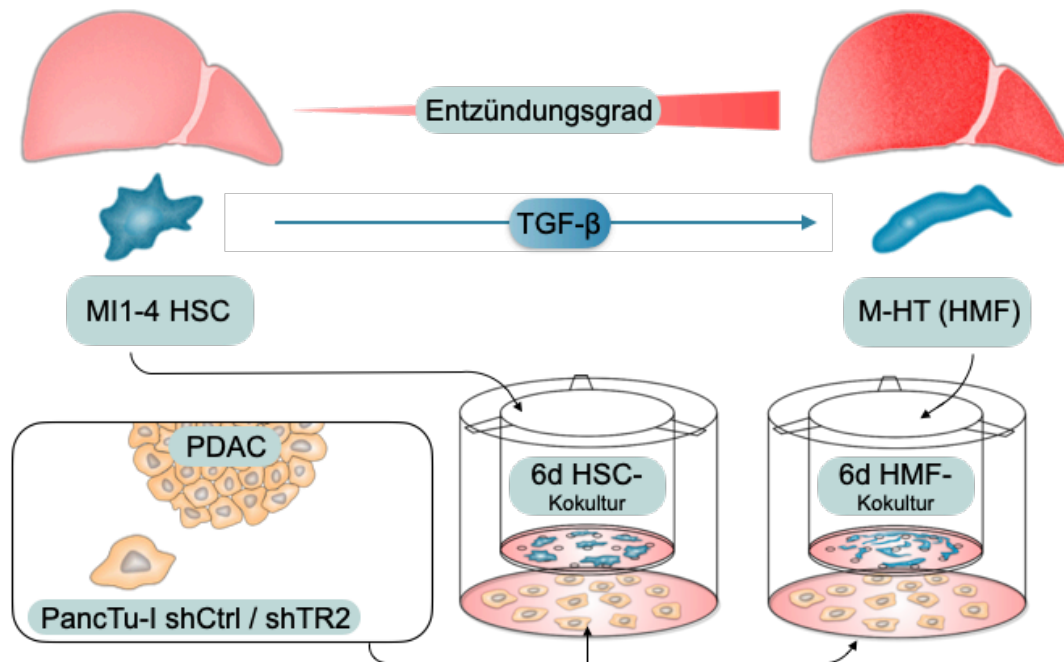


Abbildung 6: Schematische Darstellung des verwendeten indirekten Kokultursystems. PancTu-I shCtrl oder PancTu-I shTR2 wurden in den unteren Wells, HSC und HMF in den oberen Transwells zuerst für einen Tag monokultiviert. Dann wurden Stroma- und PDAC Zellpopulationen in eine gemeinsame Platte überführt und dort für sechs Tage (d) kokultiviert. 0,4 µm Poren in den Transwells ermöglichen den beidseitigen Austausch von löslichen Faktoren. Modifiziert nach [149].

3.2.3 Verlängerte indirekte Kokultur

Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine Veränderung der Lebermikroumgebung von einem physiologischen zu einem entzündlichen Milieu auf die pankreatischen Tumorzellen hat, ist das indirekte Kokultursystem aus 3.2.2 modifiziert worden (**Abbildung 7**).

Hierfür wurden 1×10^4 Tumorzellen in 2 mL ihres Kulturmediums in 6-Well-Platten ausgesät. In separaten Kulturplatten wurden 5×10^4 HSC in 6-Well-Transwells in 1,5 mL ihres Kulturmediums ausgesät. Nach einem Tag Monokultur fand in allen Wells und Transwells ein Mediumwechsel auf das einheitliche Kokulturmedium statt und die Transwells mit den Stromazellen wurden zum Start der Kokultur in die Wells mit Tumorzellen überführt.

Nach sechs Tagen Kokultur wurden die Tumorzellen sowie die hepatischen Stroma-Zellen steril aufgearbeitet. Während aus letzteren Ganzzelllysate hergestellt (siehe 3.3.1) oder RNA isoliert wurde (siehe 3.4.1), wurden die Tumorzellen gezählt und erneut mit 1×10^4 Zellen pro Ansatz in 6-Well-Platten ausgesät. Am selben Tag wurden 5×10^4 frische hepatische Stroma-Zelllinien in 6-Well-Transwells ausgesät. Am nächsten Tag wurde in allen Wells und Transwells der wieder beziehungsweise neu

ausgesäten Tumor- und hepatischen Stroma-Zellen ein Mediumwechsel auf das einheitliche Kokulturmedium vollzogen und beide Zellarten in indirekte Kokultur überführt. Die Dauer der zweiten Kokultur betrug erneut sechs Tage.

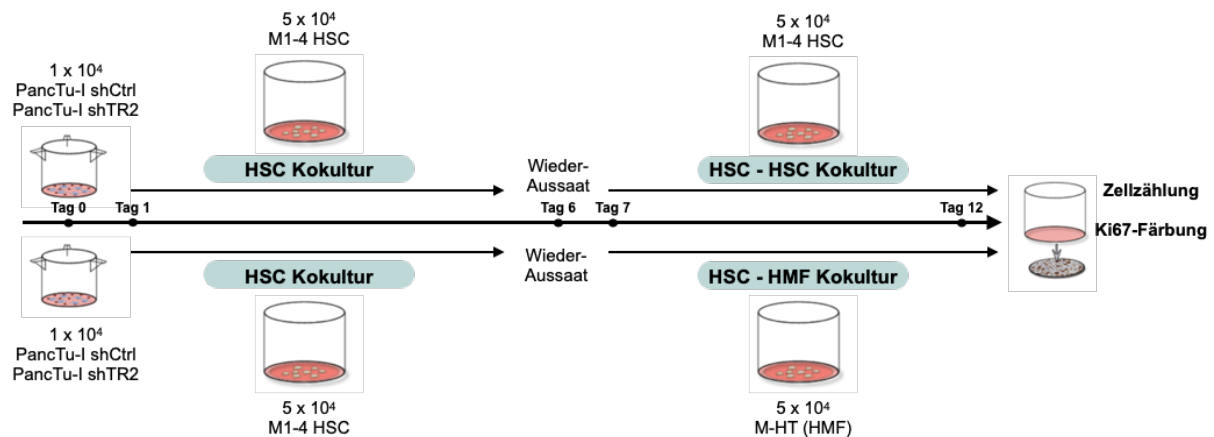


Abbildung 7: Verlängerte indirekte Kokultur mit Wechsel der hepatischen Stroma-Bedingungen. 1×10^4 PancTu-I shCtrl oder PancTu-I shTR2 wurden in den unteren Wells, 5×10^4 HSC in den oberen Transwells zuerst für einen Tag monokultiviert. Dann wurden Stroma- und PDAC Zellpopulationen in eine gemeinsame Platte überführt und dort für sechs Tage kokultiviert. Anschließend wurden die PDAC Zellen abgelöst, gezählt und erneut 1×10^4 Zellen dieser Zellen ausgesät. Weiterhin wurden 5×10^4 frische HSC oder HMF in Transwells ausgesät. Nach einem Tag Monokultur beider Populationen wurden diese in eine gemeinsame Platte überführt. Nach erneuten sechs Tagen Kokultur wurden die PDAC Zellen gezählt und auf Ki67 gefärbt. Modifiziert nach [149].

3.2.4 Einsatz von Blockierungs-Antikörpern während der indirekten Kokultur

Diese Methode wurde verwendet, um den Einfluss von bestimmten löslichen Faktoren auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen in der Kokultur zu untersuchen. Die verwendeten Antikörper und ihre jeweiligen Kontroll-Antikörper wurden hierzu zuerst je nach Angaben des Herstellers in destilliertem Wasser oder PBS verdünnt (siehe 2.9.2) und dann in ihrer finalen Konzentration an Tag 1 der Kokultur in die Wells pipettiert. Um die Antikörper gleichmäßig zu verteilen, wurden die Kulturplatten vorsichtig kreisend bewegt. Dieser Vorgang wurde 72 Stunden später erneut durchgeführt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem DC™ Proteinassay Kit (Bio-Rad, München, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers bestimmt, welches auf dem Lowry Prinzip beruht und alle dafür notwendigen Reagenzien enthält [150]. Das

Lowry-Prinzip besteht im Wesentlichen aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen: In der ersten formen die Peptidbindungen der Proteine in wässrig-alkalischer Lösung mit Cu^{2+} Ionen einen quadratisch-planaren Komplex (Biuret-Reaktion) und werden dadurch zu Cu^{1+} reduziert. In der zweiten Reaktion bilden diese Cu^{1+} Ionen mit dem gelben Folin-Ciocalteu Reagenz einen blauen Komplex. Die Menge des gebildeten Molybdänblau ist proportional zu der Proteinmenge der Probe und kann bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen werden.

Zuerst wurde der mitgelieferte BSA Standard (1,55 mg/mL) 1:2, 1:4 und 1:8 in Lämmli-Puffer (2x) verdünnt, so dass sich eine Standardreihe zwischen 0,19 mg/mL und 1,55 mg/mL ergab. Zusätzlich wurde eine Probe mit ausschließlich Lämmli-Puffer (2x) als Nullwert genutzt. Von dieser, allen Standards sowie allen Proben wurden jeweils 5 μL in Duplikaten in eine transparente 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 25 μL von Reagenz A', bestehend aus 20 μL Reagenz S verdünnt in 1 mL Reagenz A, zu jedem Well hinzugefügt. Zuletzt wurden 200 μL Reagenz B in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten im Dunkeln wurden die Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm mit einem Tecan Infinite 200PRO (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Anhand der Standardkurve mit definierten Proteinkonzentrationen wurde die Proteinkonzentration der Probe errechnet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolation und Aufreinigung von RNA erfolgte unter Nutzung des peqGOLD Total RNA Kits (PeqLab Erlangen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

Zur Isolierung von RNA aus PDAC Zellen wurden diese nach sechs Tagen Kokultur einmal mit PBS gewaschen und danach entweder direkt in Kulturplatten oder nach Zellzählung in einem Eppendorfgefäß in 300 μL RNA-Lysepuffer aufgenommen und lysiert. Danach wurde die RNA entweder für längere Lagerung bei -80° Celsius eingefroren oder direkt aufgereinigt. Um RNA aus kryo-konservierten murinem Lebergewebe zu gewinnen, wurden die unter 3.1.6 beschriebenen Schritte durchgeführt. Unabhängig vom Ursprung der in RNA-Lysepuffer aufgenommenen Suspension wurde diese zur Aufreinigung auf eine Säule mit einer Silikamembran pipettiert, die nach Zentrifugation bei $11000 \times g$ DNA in der Membran bindet, so dass sich nur die RNA im Durchfluss befindet. Durch Zugabe von 300 μL 70% Ethanol bilden die RNA-

Moleküle Wasserstoffbrückenbindungen zu den OH-Gruppen der Silikat-Atome und wurden so in einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 11000 x g an eine weitere Silikamembran gebunden. In zwei weiteren Schritten wurde die Membran durch Zentrifugation bei 11000 x g mit verschiedenen Waschpuffern von zellulären Debris und eventuellen Kontaminationen gereinigt. Im Anschluss daran wurde die Membran bei 11000 x g trocken zentrifugiert und die RNA mit 40 µL RNase freiem Wasser eluiert.

3.4.2 Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde mit einer *Nanoquant Plate* (Tecan, Crailsheim, Deutschland) in einem Tecan Infinite 200PRO (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Da RNA und DNA ultraviolettes Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren, kann mittels des Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration der Nukleinsäuren bestimmt werden. Da Proteine eine häufige Verunreinigung der Proben darstellen, wurde der Anteil an Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Durch die Ratio der gemessenen Werte von 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit der Probe ermittelt. Eine Ratio von über 2,0 wurde als ausreichend rein für die sich anschließende cDNA Synthese betrachtet.

3.4.3 cDNA Synthese

Als Ausgangsmaterial der cDNA Synthese diente die wie unter **3.3.1** beschriebene isolierte und aufgereinigte RNA. Da es sich dabei um einzelsträngige RNA (ssRNA) handelt, wird zur Synthese der doppelsträngigen komplementären DNA (cDNA) eine Reverse Transkriptase benötigt. Dazu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Schwere, Deutschland) genutzt. Außer der unten beschriebenen Inkubationen fanden alle Schritte auf Eis statt.

Zuerst wurde 0,1 µg bis 0,5 µg RNA mit 1 µL Oligo (dT)₁₈ Primer und bis zu 11,5 µL nukleasefreiem Wasser vermischt und für 5 Minuten bei 65° Celsius inkubiert, wodurch die Oligo (dT)₁₈ Primer selektiv an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der ssRNA binden. Da nur *Messenger RNA* (mRNA) am 3'-Ende polyadenyliert ist, wird so sicher gegangen, dass nur mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt wurden, wurden folgende Reagenzien zu jeder Probe hinzugefügt:

- 4 μ L 5x Reaktionsbuffer
- 0,5 μ L RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)
- 2 μ L 10 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate Mix
- 1 μ L RevertAID M-MLV Reverse Transkriptase

Der Reaktionsmix wurde dann nach kurzem Mischen und Zentrifugieren bei 42° Celsius für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch eine weitere Inkubation von 5 Minuten bei 72° Celsius gestoppt. Die fertige cDNA wurde 1:4 mit RNase freiem Wasser verdünnt und bei -20° Celsius bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) bietet wie die herkömmliche Polymerasekettenreaktion (PCR) die Möglichkeit, spezifische DNA-Abschnitte exponentiell zu amplifizieren und gleichzeitig die Expression dieses DNA-Abschnitts zu quantifizieren. Die PCR besteht aus drei verschiedenen Schritten, welche bei unterschiedlichen Temperaturen stattfinden und über 30-50 Zyklen wiederholt werden. Signale, die erst nach 50 Zyklen detektiert wurden, sind als irrelevant verworfen worden. Im ersten Schritt wird die cDNA bei 95° Celsius denaturiert, so dass im zweiten Schritt die Primer, spezifische Oligonukleotid-Sequenzen, die an einen bestimmten DNA-Abschnitt binden, an ihren komplementären Abschnitt der cDNA hybridisieren können. Dafür wird die Temperatur auf 55-61° Celsius gesenkt. Im dritten Schritt erfolgt die Elongation der Stränge am 3'-Ende der Primer durch eine Polymerase, welche bei 72° Celsius erfolgt. Um die Expression der Ziel-Genabschnitte zu quantifizieren, wird Sybr Green I zugesetzt, ein Fluoreszenz-Farbstoff, der doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. Dieser Komplex emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 520 nm. Das detektierte Fluoreszenzsignal ist demnach proportional zur synthetisierten Menge an dsDNA.

Für die qRT-PCR wurden 2,5 μ L der vorher umgeschriebenen cDNA zweifach in eine weiße 96-Well-PCR-Platte vorgelegt und anschließend folgende Reagenzien, abhängig vom Hersteller der verwendeten Primer (siehe **2.8**), zu jedem Well hinzugefügt:

Biometra	RealTimePrimers	Eurofins
5 µL Cybr Green I	5 µL Cybr Green I	5 µL Cybr Green I
0,0375 µL Fw Primer	1 µL Primer	1 µL Fw Primer
0,0375 µL Rv Primer	1,5 µL Wasser	1 µL Rv Primer
2,425 µL Wasser		0,5 µL Wasser

Anschließend wurde die Platte mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und zwei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde mittels eines Light Cycler 480 II (Roche, Basel, Schweiz) durchgeführt. Zusätzlich wurde im Anschluss jeder qRT-PCR eine Schmelzkurven-analyse zur Qualitätskontrolle unternommen.

Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen Software und Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Redmond, USA). Um die Expression verschiedener Gene zu vergleichen, wurde der *Cycle Threshold* C(t) bestimmt. Der C(t) Wert gibt an, ab welcher Zykluszahl das Fluoreszenz-Signal das Background-Signal überschreitet und korreliert damit negativ mit der in der Probe enthaltenen dsDNA. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ Methode verwendet. Dazu wurde der Mittelwert der C(t) Doppelwerte einer Probe berechnet und im Anschluss daran der C(t)-Wert des Zielgens auf den C(t)-Wert eines *Housekeeping Gens*, welches idealerweise nicht reguliert ist, bezogen. Der sich daraus ergebene Wert wird wiederum auf den $\Delta C(t)$ einer versuchs-internen Kontrolle bezogen. In dieser Arbeit wurde GAPDH als *Housekeeping Gen* und PancTul shCtrl + HSC als versuchs-interner Kontrollwert genutzt.

3.5 Immunzytochemie und Immunfluoreszenzfärbung

Alle für die Färbungen verwendeten PDAC Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät. Nach sechs Tagen Mono- bzw. Kokultur wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen.

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung von Ki67

Die Methodik der Immunfluoreszenzfärbung wie beschrieben in 3.1.3 lässt sich nicht nur bei Paraffin Geweben anwenden, sondern auch bei auf Deckgläschen angewachsenen Zellen. Während beide Methoden dem gleichen Prinzip folgen, sind die Arbeitsschritte unterschiedlich.

Die Deckgläschen wurden zuerst für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 4,5% Paraformaldehyd fixiert und im Anschluss dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. In einem weiteren Fixierungsschritt wurden die Deckgläschen mit kaltem Methanol bei -20° Celsius inkubiert und im Anschluss erneut dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Deckgläschen als nächstes eine Stunde bei Raumtemperatur mit 4% BSA in PBS inkubiert. Nach diesem Schritt wurde der Ki67-Primärantikörper (siehe **2.9.1**) in 1% BSA in PBS 1:250 verdünnt und die Deckgläschen damit über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4° Celsius inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem Sekundärantikörper anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488 (siehe **2.9.1**) inkubiert wurden. Dieser wurde 1:500 in 1% BSA in PBS eingesetzt. Zusätzlich wurde Hoechst für die Färbung der Kerne 1:500 zugesetzt. Die Inkubation fand für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer statt. Danach wurden die Deckgläschen zweimal für fünf Minuten mit PBS und ein weiteres Mal mit Aqua dest. gewaschen. Das Eindeckeln der Deckgläschen wurde mit Fluoro-Gel (Science Services GmbH, München, DE) durchgeführt. Zu allen Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern wurden parallel Färbungen mit einem passenden Isotyp-Kontroll-Antikörper durchgeführt. Diese zeigten keine oder nur schwache Signale.

Die Visualisierung der Färbung sowie die Auswertung erfolgte am Lionheart FX und der zugehörigen Gen5 Microplate Reader und Imager Software (BioTek, Bad Friedrichshall, DE). Hierfür wurden je Deckgläschen fünf randomisiert verteilte Bilder bei einer 20x Vergrößerung aufgenommen. Innerhalb eines Experiments wurden immer dieselben Belichtungs- und Kontrasteinstellungen verwendet, um gleiche Analysebedingungen zu gewährleisten. Zur Auswertung wurden mit Hilfe der zugehörigen Software anhand der Zellkern-Färbung die Anzahl der Zellen pro Bild bestimmt. Im Anschluss wurden anhand des Kontroll-Ansatzes des Experimentes eine Untergrenze des Ki67-Fluoreszenzsignals gesetzt, die definiert, ab welcher Fluoreszenzsignalintensität das Programm eine Zelle als Ki67 positiv erkennt. Dieser *Threshold* wurde innerhalb eines Experiments für die Auswertung aller weiteren Bilder verwendet. Durch die zelluläre Analyse-Funktion des Programms wurden die Parameter Anzahl der Ki67 positiven Zellen, Mediane-Fluoreszenz-Intensität (MFI) der Ki67+ Zellen sowie MFI aller auf einem Bild vorhandenen Zellen (nach Anwendung des *Threshold*,

so dass für Zellen mit einer Signalintensität unterhalb des *Thresholds* die MFI 0 angenommen wird) erhoben.

3.5.2 Immunzytochemische Färbung von Ki67

Immunzytochemie bedient sich im Wesentlichen demselben Prinzip wie die Immunfluoreszenzfärbung, mit dem Unterschied, dass der Sekundärantikörper nicht Fluorochrom-, sondern enzymgekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert nach Zugabe eines Substrats eine Farbreaktion, die proportional zur Präsenz des Antigens ist.

Die auf dem Deckgläschen angewachsenen Zellen wurden zunächst zehn Minuten bei Raumtemperatur mit Aceton und einem Zusatz von 1,5% H₂O₂ fixiert sowie permeabilisiert und anschließend dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Das H₂O₂ dient dabei der Sättigung endogener Peroxidasen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Deckgläschen 20 Minuten mit 4% BSA in PBS inkubiert. Der Ki67-Primärantikörper (siehe **2.9.1**) wurde in einer Verdünnung von 1:250 in 1% BSA in PBS eingesetzt und die Deckgläschen damit über Nacht bei 4° Celsius in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten erfolgte die Inkubation mit EnVision + System HRP anti-mouse (Dako Diagnostika, Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Es wurde erneut dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend die Farbreaktion durch Inkubation mit einem Tropfen LV Red Substrat aus selbigem Kit für fünf Minuten entwickelt. Nach drei weiteren Waschgängen mit PBS für 5 Minuten wurden die Deckgläschen für die Kernfärbung 35 Sekunden mit Mayers Hämalaun inkubiert und danach unter fließendem Leitungswasser für zehn Minuten gebläut. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit Mounting Medium auf einem Objektträger befestigt und unter Lichtausschluss gelagert. Zur Quantifizierung der Färbung wurden von jedem Deckgläschen fünf zufällig verteilte Bilder bei einer Vergrößerung von 280x aufgenommen. In Microsoft Powerpoint 2007/2010 (Microsoft Cooperation, Redmond, USA) wurde dann eine diagonale Linie durch jedes Bild gezeichnet und die positiven sowie negativen Zellen entlang dieser Linie gezählt.

3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, in der eine Einzelzellsuspension durch einen Laser geleitet wird, so dass das von den Zellen abgegebene Signal Auskunft über Größe, Granularität sowie Expression von bestimmten Proteinen gibt.

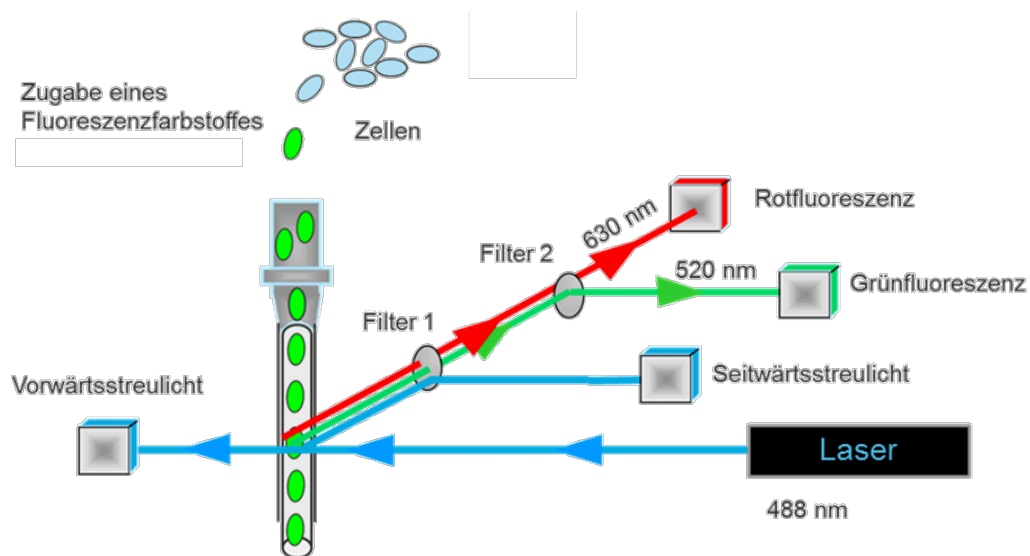


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers. Eine Einzelzellsuspension wird mit der Trägerflüssigkeit durch ein Drucksystem in die Messkuvette gedrückt und dort zu einem laminären Flüssigkeitsstrom fokussiert. Auf diesen trifft das Licht eines Lasers und das von den zellulären Bestandteilen gestreute beziehungsweise im Fall einer Fluoreszenzmarkierung emittierte Licht wird in verschiedenen Spiegeln des optischen Systems detektiert [151].

Um die Messung zu starten, wird das Probenröhrchen unter die Messkuvette gespannt und das Flüssigkeitsversorgungssystem unter Druck gesetzt. Dies gewährleistet, dass Trägerflüssigkeit in das Probenröhrchen gelangt und so ein Überdruck entsteht, der die Zellsuspension in die Messkuvette drückt. Hier wird sie durch die Trägerflüssigkeit zu einem laminaren Flüssigkeitsstrom fokussiert, auf den das Licht eines Lasers trifft (**Abbildung 8**). Aufgrund der zellulären Bestandteile des Flüssigkeitsstroms wird das Licht gestreut, oder, im Falle von einer Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, emittiert. Dieses Licht wird in verschiedenen Spiegeln und Linsen des optischen Systems gebündelt und detektiert. Während das vorwärts gestreute Licht ein Maß für die Größe der Zelle ist, gibt das im Winkel von 90° gestreute Licht Auskunft über die granuläre Beschaffenheit.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für verschiedene Anwendungen benutzt (siehe **3.6.1** und **3.6.2**).

3.6.1 Zelltod-Bestimmung mit Propidium-Iodid (PI)

Mit Hilfe einer PI-Färbung lassen sich in einer Zellpopulation tote von vitalen Zellen unterscheiden, da PI ein nicht-membrangängiger DNA-Interkalator ist, wodurch der Farbstoff nur in tote Zellen, die eine permeabilisierte Membran aufweisen, gelangt.

Die für die Färbung verwendeten PDAC Zellen wurden in 6-Well-Platten sechs Tage mono- bzw. kokultiviert. Zuerst wurde das Medium abgenommen und in ein 2 mL Eppendorf-Röhrchen übertragen. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37° Celsius inkubiert und dieses anschließend mit dem vorher abgenommenen Medium abgestoppt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 x g für fünf Minuten. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 100 µL PBS mit 0,5 µg/mL PI resuspendiert. Die Messung erfolgte mit einem FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, USA) unter der Verwendung der zugehörigen Software FACSCalibur Cell Quest. Die Rohdaten wurden mit Hilfe der Software Weasel v3.0 ausgewertet.

3.6.2 LEGENDplex™-Analyse

Das LEGENDplex™ System von BioLegend (BioLegend GmbH, Koblenz, Deutschland) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches der Detektion von mehreren löslichen Analyten wie Zytokinen in einer Probe dient. Dabei wird das Prinzip des *Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) mit dem der Durchflusszytometrie kombiniert (**Abbildung 9**). Dazu werden zuerst Polyesterol-Beads in zwei verschiedenen Größen mit verschiedenen Mengen des Fluoreszenzfarbstoffes Allophycocyanin (APC) markiert. Diese werden mit für die gewünschten Analyten spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet und dienen so als sogenannter *Capture-Bead*, die durch ihre Größe und ihren verschiedenen Gehalt an APC klar voneinander zu unterscheiden sind. Wird nun eine Probe mit den *Capture-Beads* inkubiert, so binden die *Beads* ihren spezifischen Analyten. Im nächsten Schritt werden weitere biotinylierte Antikörper hinzugefügt, die ihr spezifisches Antigen auf den an die *Capture-Beads* gebundenen Analyten binden. Zuletzt wird das Biotin an den Detektions-Antikörpern durch Streptavidin gekoppeltes Phycoerythrin (PE) gebunden, ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, dessen Signal proportional zum gebundenen Antigen ist. So lassen sich in der Durchflusszytometrie die unterschiedlichen *Beads* mittels des APC Signals identifizieren und anhand des PE Signals und einer mitgeführten Standardreihe quantifizieren.

In dieser Arbeit wurde das LEGENDplex™ *Human Inflammation Panel* und das *Murine Inflammation Panel* von Bio-Legend nach Angaben des Herstellers benutzt und mit Hilfe eines FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, USA) analysiert.

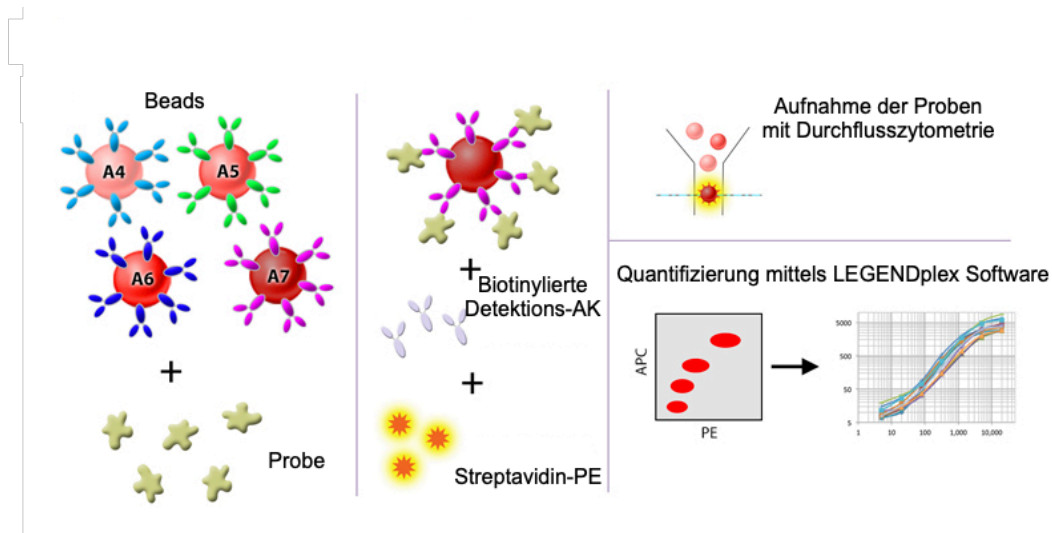


Abbildung 9: Schematische Erklärung des LEGENDplex™-Systems. Die mit verschiedenen APC-Gehalt und monoklonalen Antikörpern beschichteten Polyesterol *Capture-Beads* binden im ersten Schritt ihren spezifischen Analyten. Anschließend binden weitere mit Biotin beschichtete *Detection-Beads* den Komplex aus Zielanalyt und *Capture-Bead*. Zuletzt wird das Biotin der *Detection-Beads* durch PE gekoppeltes Streptavidin gebunden. Mittels Durchflusszytometrie werden die gebundenen Analyten durch den APC Gehalt der *Capture-Beads* differenziert und anhand des PE Gehalts der gebundenen *Detection-Beads* und einer Standardreihe quantifiziert. Modifiziert nach [152].

3.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., Chicago, USA) genutzt. Die Normalverteilung von Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Auf normalverteilte Daten wurde entweder der t-Test oder die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA mit Messwiederholungen angewendet. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student-Newman-Keuls-Test überprüft. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet und mit einem Stern markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Unterdrückung von TRAIL-R2 vermindert die post-operative Lebermetastasierung in einem klinisch-adaptierten Mausmodell des PDAC

Lebermetastasierung stellt eine der größten klinischen Herausforderungen in der Therapie des PDAC dar. 80% der Patienten präsentieren sich bereits bei Erstdiagnose in einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium und selbst Patienten, die eine R0-Resektion erhalten, entwickeln innerhalb der nächsten zwei Jahre nach Operation Metastasen, häufig in der Leber [153]. Während zahlreiche Vorarbeiten die Beteiligung von TRAIL-R2 an allen Schritten der malignen Progression des PDAC zeigen konnten [114–116], ist die Rolle von TRAIL-R2 im Zusammenhang der post-operativen Metastasierung noch unzureichend verstanden.

Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein klinisch-adaptiertes PDAC-Resektionsmodell verwendet, in dem schon früher gezeigt werden konnte, dass die Entfernung des Primärtumors das Auswachsen von Lebermetastasen fördert [147]. In diesem *in vivo* Modell wurden humane PDAC Zellen, die entweder mit einer TRAIL-R2 shRNA (shTR2) oder einer Kontrol shRNA (shCtrl) stabil transduziert wurden, orthotop in das Pankreas von SCID beige Mäusen inokuliert. Die Unterdrückung von TRAIL-R2 durch die shRNA wurde mittels qRT-PCR überprüft (1 in shCtrl vs. 0,4997 in shTR2; $p = 0,0171$) (**Abbildung 10 A**). Nach zehn Tagen wurden die Primärtumore mittels einer subtotalen Pankreatektomie entfernt. 26 Tage später wurden die Tiere getötet, die Lebern entfernt und zunächst makroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Tiere, welche mit shTR2 Zellen inokuliert worden waren, weniger makroskopisch sichtbare Lebermetastasen aufwiesen als die Tiere mit shCtrl Zellinokulation (0,7778 shCtrl vs. 0,125 shTR2) (**Abbildung 10 B**).

Um auch makroskopisch nicht erfassbare Metastasen detektieren zu können, wurden die in Paraffin eingebetteten Lebern geschnitten und mittels Immunfluoreszenzfärbung auf humanes Panzytokeratin, einen universellen Epithelzellmarker, gefärbt. Die vorgefundenen Läsionen wurden ihrer Zellzahl nach in disseminierte Tumorzellen (DTC; 1-10 Zellen, kein Zellverband), Nanometastasen (Nano; 10-100 Zellen) und Mikrometastasen (Mikro; 100-350 Zellen) eingeteilt (**Abbildung 10 D**) und die Läsionen in drei verschiedenen Schnittebenen pro Tier gezählt. Aus der Auswertung

war zu entnehmen, dass in den Lebern der Tiere, die mit shTR2 Zellen inokuliert worden waren, mehr DTC und Nanometastasen zu finden waren als in den von Tieren, die shCtrl Zellen erhielten (DTC: 5,111 shCtrl vs. 10,75 shTR2; Nano: 1,889 shCtrl vs. 4,26 shTR2) (**Abbildung 10 C**). Läsionen in der Größenordnung der Mikrometastasen waren insgesamt nur wenige zu finden und wiesen in ihrer Anzahl auch keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf.

Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass Tiere, in die PDAC Zellen mit unterdrückter TRAIL-R2 Expression inokulierten wurden, zwar weniger makroskopische, aber dafür mehr kleine, nur mikroskopisch sichtbare Metastasen aufweisen als Tiere, die PDAC Zellen mit hoher TRAIL-R2 Expression erhielten.

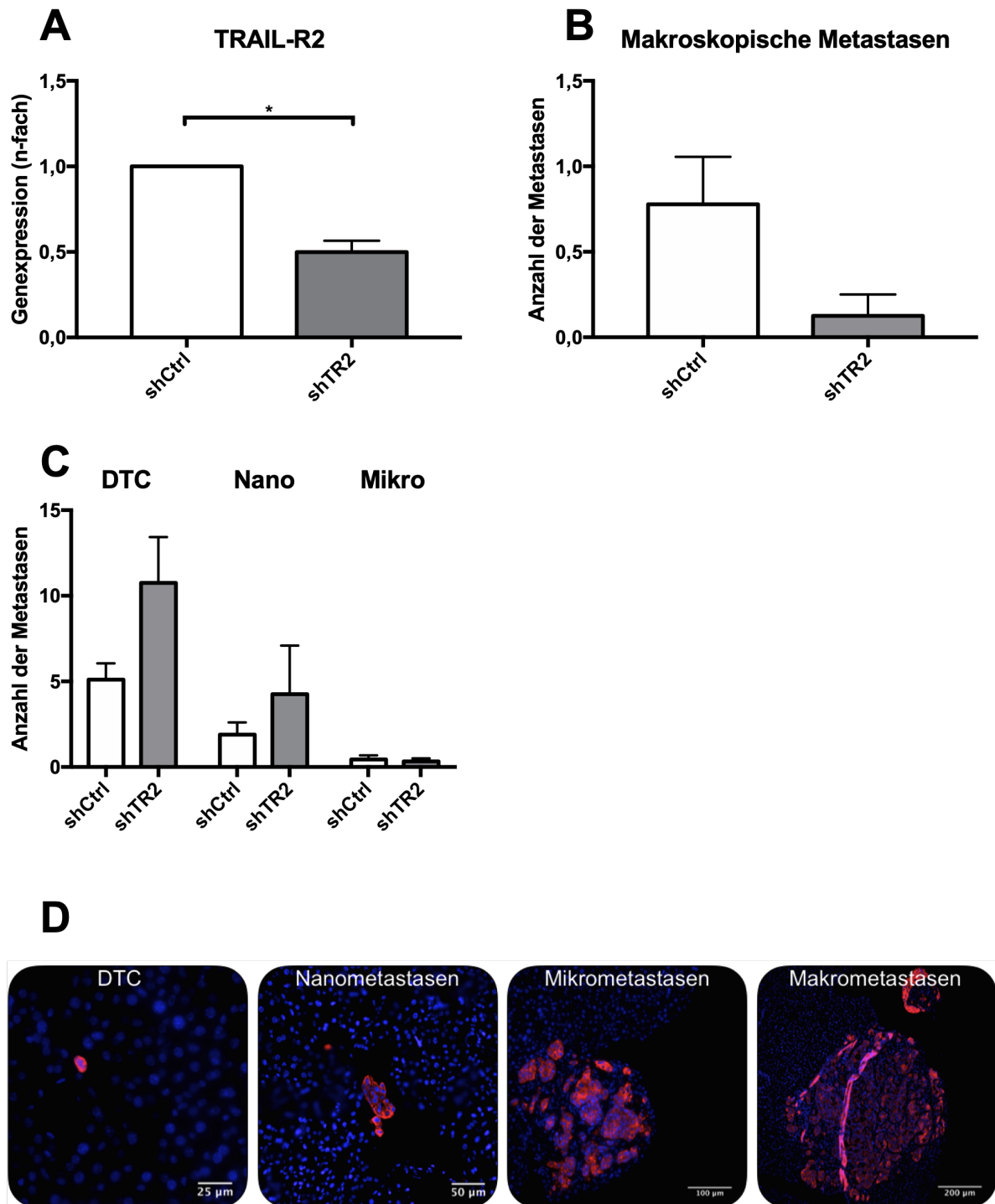


Abbildung 10: Unterdrückung der TRAIL-R2 Expression vermindert die post-operative Lebermetastasierung in einem klinisch-adaptierten Mausmodell des PDAC. 1×10^6 PancTu-I Zellen, transduziert entweder mit einer shRNA für TRAIL-R2 ($n=10$) oder einer Kontroll-shRNA ($n=9$), wurden orthotop in das Pankreas von SCID-beige Mäusen inokuliert. Nach zehn Tagen wurde der Primärtumor mittels einer subtotalen Pankreatektomie reseziert. 26 Tage später wurden die Tiere geopfert und die Lebermetastasen gezählt. **(A)** Die Unterdrückung der TRAIL-R2 Expression wurde mittels qRT-PCR überprüft. Die Expression von *TRAIL-R2* in beiden Gruppen wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte der n-fachen Genexpression \pm SEM. In **(B)** werden Mittelwerte der Anzahl an makroskopischen Lebermetastasen pro Tier \pm SEM gezeigt. **(C + D)** Mittels Fluoreszenzmikroskopie für Panzytokerin (rot) wurden jeweils drei Leberschnitte pro Tier auf kleine Tumorzellläsionen überprüft. Diese wurden ihrer Größe nach Kategorien zugeordnet (DTC 1-10 Zellen; Nanometastasen 10-100 Zellen; Mikrometastasen 100-350 Zellen; Makrometastasen <350 Zellen) und gezählt. Hier dargestellte Daten repräsentieren die Mittelwerte der Anzahl an Läsionen pro Kategorie \pm SEM. **(D)** zeigt beispielhafte Aufnahmen der unterschiedlich großen Metastasen. * = $p < 0,050$

4.2 Nanometastasen aus Tieren, die PDAC Zellen mit einem supprimierten TRAIL-R2 erhielten, sind weniger proliferativ aktiv

Da aus den Ergebnissen in 4.1 hervorging, dass in einem klinisch-adaptierten PDAC Resektionsmodell Tiere, die mit shTR2 PancTu-I Zellen inokuliert wurden, weniger Makrometastasen, aber mehr DTC und Nanometastasen aufwiesen, sollte im Folgenden untersucht werden, worauf dieser Unterschied zurückzuführen ist. Die Differenz war vor allem in den kleinen Läsionen zu finden. Da nicht genug Mikrometastasen zu finden waren, um biologisch verwertbare Aussagen zu treffen, wurden diese von den folgenden Analysen ausgeschlossen.

Ein wichtiger Parameter für das Auswachsen von Tumorzellen im Primär- sowie im Sekundärkontext ist eine deregulierte, anhaltende Proliferation [154], die sich anhand des Mitose-assoziierten Proteins Ki67 untersuchen lässt [155].

Dafür wurde jeweils in drei Leberschnitten pro Tier mittels Immunfluoreszenz auf humanes Ki67 in Kombination mit humanem Panzytokeratin gefärbt (**Abbildung 11 C**). Zur Auswertung wurde zuerst die Panzytokeratinfärbung genutzt, um die Metastasen als solche zu identifizieren und ihre Fläche zu bestimmen. Anschließend wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ der Ki67 positive Anteil der Fläche bestimmt. Die Analyse der Werte zeigte, dass DTC beider Gruppen keine unterschiedliche proliferative Aktivität aufwiesen (1,466% in shCtrl vs. 1,182% in shTR2) (**Abbildung 11 A**), wohingegen Nanometastasen aus Tieren, in die shTR2 Zellen inokuliert worden waren, signifikant weniger Proliferation zeigten, als solche aus Tieren, die shCtrl Zellen erhielten (1,933% in shCtrl vs. 0,619% in shTR2; $p = 0,0358$) (**Abbildung 11 B**). Weiterhin lässt sich der Auswertung entnehmen, dass Nanometastasen aus Tieren, die mit shCtrl Zellen inokuliert worden waren, mehr proliferative Aktivität zeigten als DTC in Lebern aus beiden Gruppen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass Nanometastasen aus Tieren mit PDAC Zellen mit unterdrücktem TRAIL-R2 weniger proliferieren als solche aus Tieren mit PDAC Zellen mit hoher TRAIL-R2 Expression.

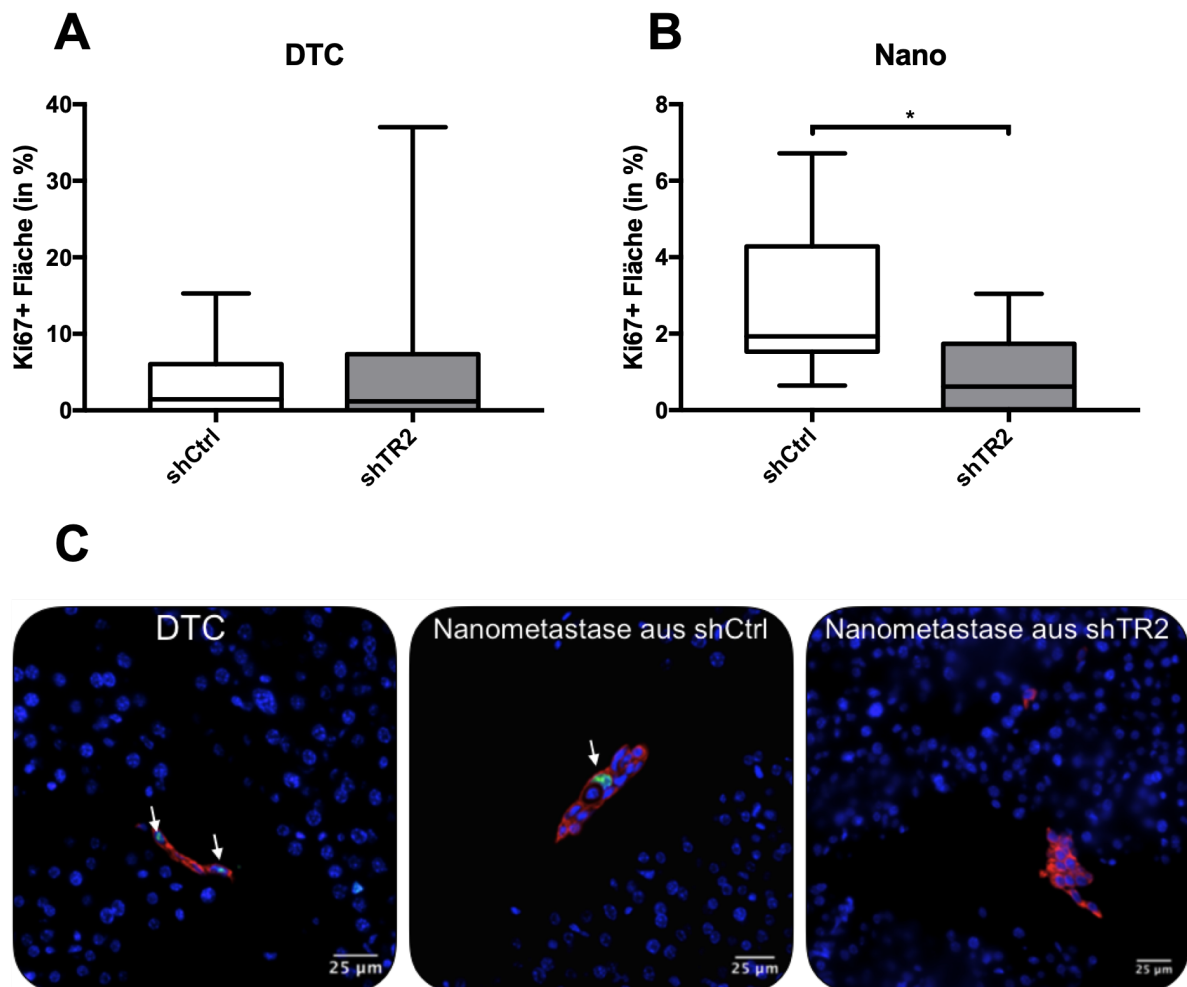


Abbildung 11: Nanometastasen aus Tieren, die mit shTRAIL-R2 PancTu-I Zellen inokuliert wurden, sind vermindert proliferativ aktiv. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden jeweils drei Leberschnitte pro Tier aus dem klinisch-adaptierten PDAC Mausmodell auf den Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Die Signale der jeweiligen Färbung wurden mit ImageJ quantifiziert und auf die Fläche der gleichzeitigen Panzytokeratinfärbung bezogen. Gezeigt sind Ki67 positive Flächenanteile in Prozent für **(A)** DTC und **(B)** Nanometastasen. **(C)** Repräsentative Bilder der Doppelfärbung Panzytokeratin (rot) und Ki67 (grün) für beide Gruppen. Dargestellt Daten sind Mediane mit Quartilen ($Q_{0,75}$ als obere Abweichung und $Q_{0,25}$ als untere Abweichung; 3 Schnitte/Tier aus shCtrl n=9 und shTR2 n=10 Tieren). * = $p < 0,050$

4.3 Operation induziert lokale Entzündungsreaktion in der Leber *in vivo*.

Vorarbeiten im selben klinisch-adaptierten Resektionsmodell wie in 4.1 konnten zeigen, dass die systemische Inhibition von Entzündungsmediatoren wie IL-6 oder TNF- α nach Resektion des Primärtumors das Auswachsen von Lebermetastasen effektiv verringert [147, 148]. Diese Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Lebermetastasierung des PDAC und einer Entzündungsreaktion hin. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Operation, wie sie in 4.1 durchgeführt wurde, nicht nur eine systemische, sondern auch eine lokale Entzündungsreaktion in der Leber verursachen kann. Hierfür wurden SCID beige Mäuse

entweder einer explorativen Laparotomie oder einer subtotalen Pankreatektomie unterzogen oder blieben als Kontrolle unoperiert. 48 Stunden nach Operation wurden alle Mäuse geopfert und deren Lebern kryokonserviert. Aus diesen kryokonservierten Lebern wurden im Anschluss Homogenisate erstellt. In den Überständen der Leberhomogenisate wurden mittels LEGENDplex™ Multiplex-Analyse 12 verschiedene entzündungsassoziierte Zytokine detektiert (**Abbildung 12**). Hier zeigte sich, dass 11 von 12 Analyten (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-23, IL-1 α , GM-CSF, IL-10, IFN- β , IL-17A, IL-27, VEGF) in den Lebern von Mäusen, die einer explorativen Laparotomie oder einer subtotalen Pankreatektomie unterzogen worden waren, vermehrt detektiert wurden als in der Kontrollgruppe. Interessanterweise wurde der größte Unterschied in den Konzentrationen von TNF- α beobachtet, in denen eine signifikant höhere Konzentration in Lebern von Mäusen nach subtotalen Pankreatektomie im Vergleich mit Lebern aus Kontrollmäusen beobachtet wurde (373,5 in Nativ vs. 582,8 in Pankreatektomie; $p = 0,0427$). IL-6 war hingegen als einziger Faktor in Lebern operierter Mäuse im Vergleich mit Lebern von nicht operierten Mäusen reduziert.

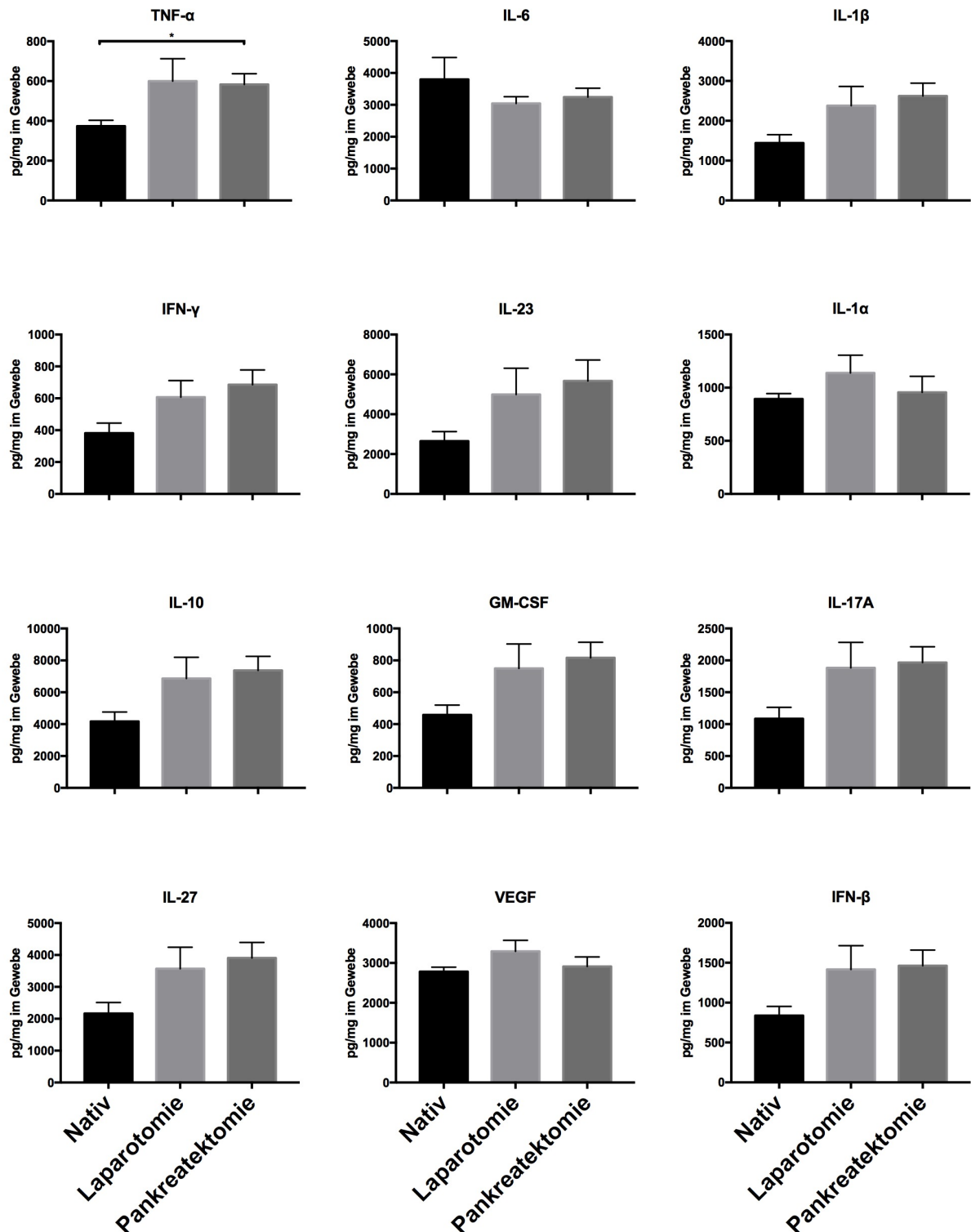


Abbildung 12: Operation induziert lokale Zytokin-vermittelte Entzündungsreaktion in der Leber *in vivo*. SCID beige Mäuse bleiben als Kontrolle unoperiert (Nativ; n=4), oder wurden einer explorativen Laparotomie (n=4) oder einer subtotalen Pankreatektomie (n=8) unterzogen. 48 Stunden nach Operation wurden die Mäuse geopfert und deren Lebern nach Kryokonservierung homogenisiert. Mittels LEGENDplex™ Multiplex-Analyse wurden Überstände der Leberhomogenisate auf entzündungsassoziierte murine Zytokine untersucht. Detektierte Zytokin-Konzentrationen wurden auf Protein-konzentrationen der jeweiligen Proben normalisiert. Die dargestellten Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von 4 bzw. 8 Tieren / Gruppe. * = $p < 0,050$

Diese Befunde untermauern die Hypothese, dass sowohl eine chirurgische Intervention am Bauch, als auch eine chirurgische Manipulation des Pankreas eine lokale Entzündung in der Leber induzieren kann.

HSC sind neben KC und Immunzellen die vornehmlichen Effektorzellen für entzündliche Vorgänge in der Leber und transdifferenzieren nach Stimulation zu HMF [75,156]. Während ruhende, inaktive HSC durch die Expression von Desmin charakterisiert sind, werden α -SMA und Kollagen Typ I (Col1A1) als Marker für HMF verstanden [157]. Um zu untersuchen, ob die in **Abbildung 12** observierte Entzündungsreaktion der Leber mit einer Transdifferenzierung von HSC zu HMF einhergeht, wurde im Folgenden die Expression von HSC und HMF-assoziierten Genen untersucht. Hierfür wurden aus den oben verwendeten Leberhomogenisaten der Mäuse RNA isoliert, in cDNA transkribiert und diese mittels qPCR untersucht.

Bezüglich des Verhältnis der Genexpressionen von α -SMA zu Desmin konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis der Genexpressionen beider Gene in Lebern von Mäusen, die einer explorativen Laparotomie unterzogen worden waren, wesentlich größer war als das in nicht operierten Kontrollmäusen (0,0005316 in Nativ vs. 0,00093106 in explorativer Laparotomie), während es in Mäusen, in denen eine Pankreatektomie erfolgt war, niedriger als in beiden anderen Gruppen war (0,0002677) (**Abbildung 13 A**). In dieser Gruppe war jedoch das Verhältnis der Genexpressionen von Col1A1 zu Desmin wesentlich erhöht im Vergleich zu nativen Mäusen und Mäusen mit einer explorativen Laparotomie (1,279 in Pankreatektomie vs. 0,353 in explorativer Laparotomie vs. 0,406 in Nativ) (**Abbildung 13 B**).

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Befunden ableiten, dass das Genexpressionsmuster von Lebern aus operierten Mäusen - sowohl nach Pankreatektomie als auch explorativer Laparotomie - im Gegensatz zu Lebern aus nativen Mäusen auf eine vermehrte Aktivierung zu HMF hinweist. Gleichzeitig zeigt die unterschiedliche Expression der HMF-assoziierten Gene in den operierten Gruppen ein inhomogenes Muster. Werden die Befunde im Zusammenhang mit der vermehrten humoralen Entzündungsreaktion nach Operation betrachtet, lässt sich daraus schließen, dass abdominale Operationen verschiedenen Ausmaßes eine lokale Entzündungsreaktion in der Leber induzieren, die von einer vermehrten Aktivierung von HSC zu HMF begleitet wird.

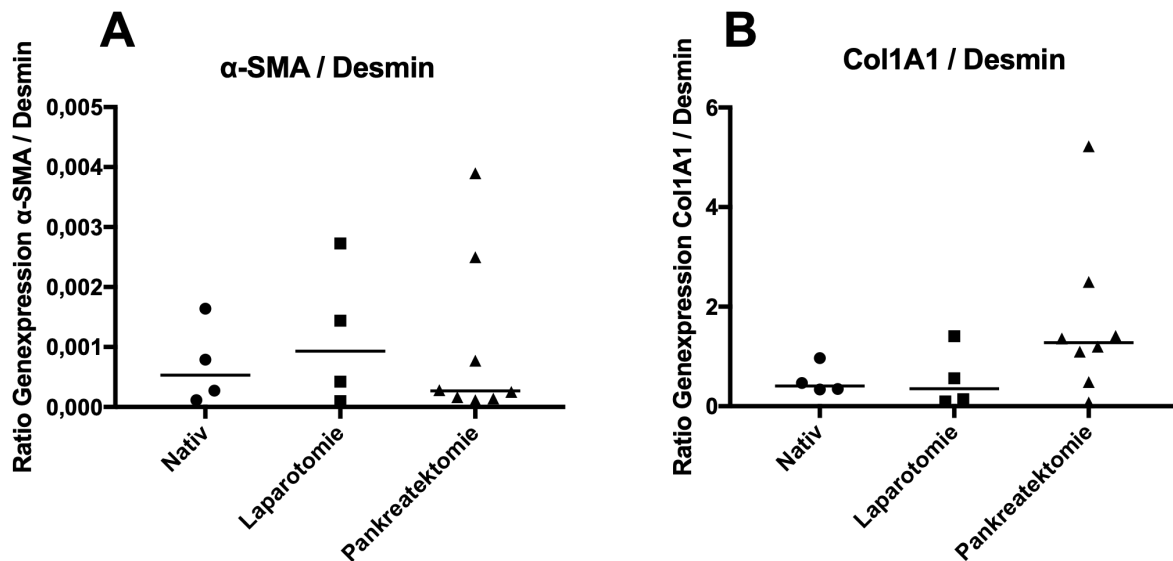


Abbildung 13: Charakterisierung der Genexpression von HSC- und HMF-assoziierten Markern in den Lebern nicht operierter und operierter Mäuse. SCID beige Mäuse blieben entweder unoperiert (Nativ; n=4), oder wurden einer explorativen Laparotomie (n=4) oder einer subtotalen Pankreatektomie (n=8) unterzogen. 48 Stunden nach Operation wurden die Mäuse geopfert und deren Lebern nach Kryokonservierung homogenisiert. RNA wurde aus den Homogenisaten gewonnen, in cDNA transkribiert und mittels qRT-PCR auf HSC und HMF-assoziierte Gene untersucht. Die Genexpression von *α-SMA*, *Col1A1* und *Desmin* wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert. Anschließend wurde die Ratio aus (A) *α-SMA* bzw. (B) *Col1A1* und *Desmin* gebildet. Die Daten zeigen Einzelwerte und Mediane von 4 bzw. 8 Tieren / Gruppe.

4.4 Kokultur mit HSC und HMF beeinflusst das Wachstumsverhalten von PDAC Zellen mit einem moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus

Wir und andere Gruppen konnten in der Vergangenheit demonstrieren, dass sowohl HSC als auch HMF eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von Lebermetastasen des PDAC spielen [79,80,137,139]. Um zu untersuchen, ob das beobachtete verminderte Auswachsen von Lebermetastasen in Mäusen nach Inokulation von PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression im Zusammenhang mit einer durch die operative Entfernung des Primärtumors induzierten Entzündung steht, wurden PancTu-I shTR2 bzw. shCtrl Zellen zusammen mit murinen HSC, stellvertretend für eine physiologische, nicht entzündliche Lebermikroumgebung vor der Operation, oder aber mit HMF, repräsentativ für eine inflammatorische Situation nach dem Eingriff, kokultiviert. Da die in **Abbildung 12** beobachtete ausgedehnte humorale Entzündungsreaktion in der Leber nach Operation vermuten lässt, dass der Einfluss von HSC beziehungsweise HMF vor allem über lösliche Faktoren vermittelt wird, wurde ein indirektes Kokulturmodell benutzt.

Da die *in vivo* Befunde vor allem Unterschiede im Wachstumsverhalten der Lebermetastasen zwischen den Gruppen zeigten, wurde die vitale Zellzahl der PDAC Zellen nach sechs Tagen Kokultur untersucht (**Abbildung 14 A**). Sowohl PancTu-I Zellen mit shCtrl als auch shTR2 zeigten nach Kokultur mit HMF eine erhöhte Zellzahl im Vergleich zu Zellen nach HSC-Kokultur. Das Ausmaß der Erhöhung von HSC zu HMF Kokultur war in PancTu-I shCtrl Zellen im Vergleich zu shTR2 Zellen höher. Weiterhin zeigte sich eine verminderte Zellzahl in PancTu-I shTR2 Zellen nach HSC Kokultur im Vergleich zu shCtrl Zellen unter gleichen Bedingungen (PancTu-I shCtrl + HSC $21,09 \times 10^4$ vs. PancTu-I shTR2 + HSC $17,46 \times 10^4$).

Da verschiedene funktionelle Eigenschaften wie Zelltod und Proliferation verantwortlich sein können für die unterschiedlichen Zellzahlen, wurden diese Parameter als nächstes unter den oben genannten Kokulturbedingungen untersucht. Mit Hilfe einer PI-Färbung wurde der Anteil toter Zellen (PI+) nach sechs Tagen Kokultur ermittelt (**Abbildung 14 B**). Es zeigte sich vor allem ein Unterschied zwischen HSC und HMF kokultivierten PDAC Zellen: Unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus war zu beobachten, dass PDAC Zellen nach Kokultur mit HMF weniger starben als nach Kokultur mit HSC. Zuletzt wurde eine immunzytochemische Färbung auf Ki67 durchgeführt, um die Proliferation der Zellen nach Kokultur zu analysieren (**Abbildung 14 D**). Analog zur Zellzahlbestimmung zeigte sich, dass nach HMF Kokultur in beiden PDAC Zellenlinien eine gesteigerte Proliferation zu verzeichnen war, die in beiden Ansätzen ungefähr gleich stark ausgeprägt war. Nach HSC Kokultur zeigten sich interessanterweise große Unterschiede zwischen den PancTu-I shCtrl und shTR2 Zellen: In letzteren war nach Kokultur mit HSC die Anzahl der Ki67 positiven Zellen im Vergleich zu PancTu-I shCtrl Zellen unter denselben Bedingungen erheblich reduziert (PancTu-I shCtrl 1 vs. PancTu-I shTR2 0,57; $p < 0,0001$). Repräsentative Bilder der Ki67-Färbung sind in **Abbildung 14 D** dargestellt.

In Zusammenschau demonstrieren die bisherigen Befunde, dass nach Kokultur mit HMF die Zellzahl der PDAC Zellen im Vergleich zur Kokultur mit HSC erhöht ist, was im Einklang mit einer erhöhten Proliferation und einem verminderten Zelltod steht. Während die Ergebnisse nach HMF Kokultur weitestgehend unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus der Zellen zu sein scheinen, zeigt sich nach HSC Kokultur eine starke Unterdrückung der Proliferation in PancTu-I shTR2 Zellen im Vergleich zu shCtrl Zellen.

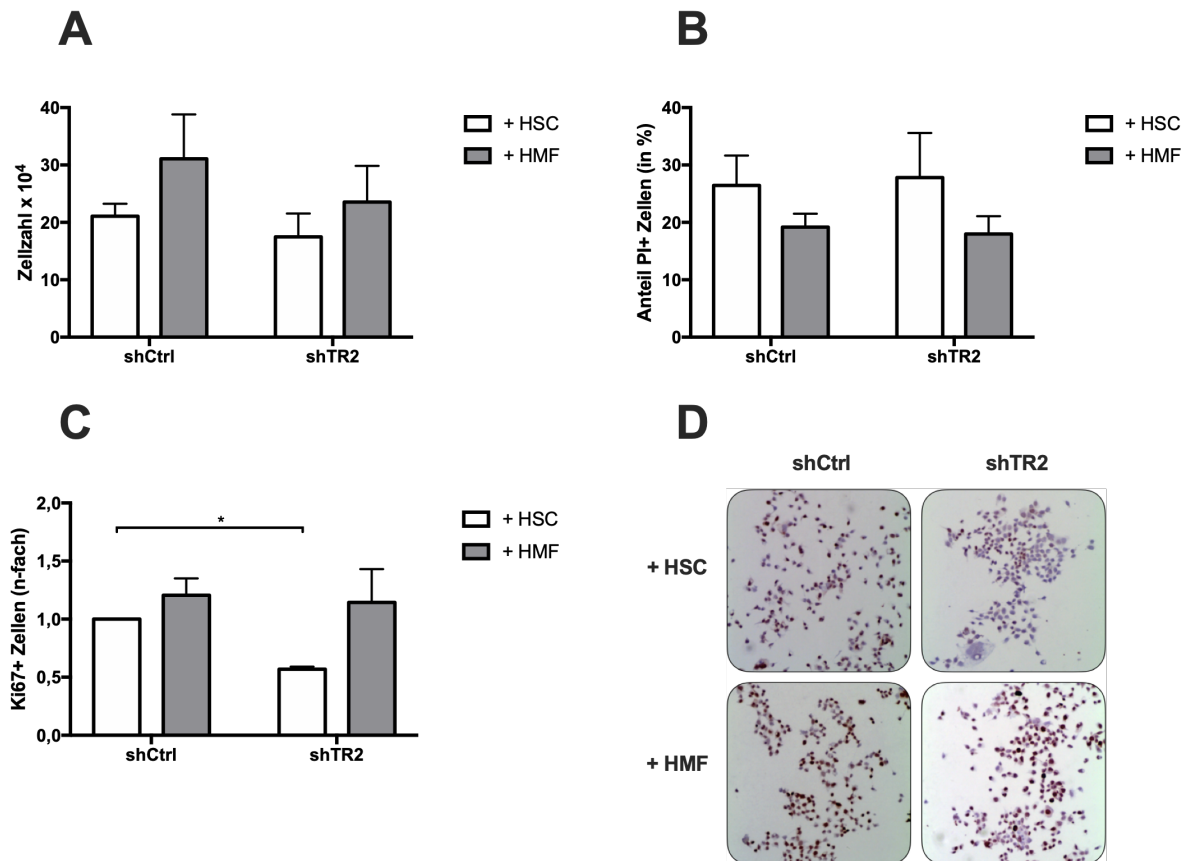


Abbildung 14: Kokultur mit HSC und HMF beeinflusst das Wachstumsverhalten von PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus. 1×10^4 PancTu-I Zellen, transduziert mit einer shRNA für TRAIL-R2 oder einer Kontroll-shRNA, wurden entweder mit $2,5 \times 10^4$ HSC oder HMF kokultiviert. Nach sechs Tagen wurde **(A)** die vitale Zellzahl und **(B)** der Anteil toter Zellen (PI +) mit Hilfe einer PI-Färbung untersucht. **(C)** Die Proliferation der PancTu-I Zellen wurde durch eine immunzytochemische Färbung von Ki67 bestimmt. Dargestellte Werte letzterer sind normalisiert auf die endogene Kontrolle shCtrl + HSC. Repräsentative Aufnahmen der Ki67 Färbung in 200-facher Vergrößerung sind in **(D)** dargestellt. Alle Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$

4.5 Unterdrückung von TRAIL-R2 führt zur Hochregulation von TRAIL-R1 nach HSC Kokultur

Der Einfluss von TRAIL-R2 auf zelluläre Funktionen wie Proliferation oder Zelltod-Induktion ist abhängig von seiner Expression, aber auch von der Expression des anderen Todesrezeptors TRAIL-R1, der die gleichen, aber auch distinkte Funktionen ausüben kann. Weiterhin wird seine Wirkungsweise durch die An- oder Abwesenheit der Decoy-Rezeptoren TRAIL-R3 und TRAIL-R4 beeinflusst [158,159]. Um zu untersuchen, inwieweit sich die Unterdrückung von TRAIL-R2 im Kontext von HSC oder HMF auf die Expression der anderen TRAIL-Rezeptoren auswirkt, wurde im Folgenden die Genexpression von TRAIL-R1 und TRAIL-R4 nach sechs Tagen Kokultur von PancTu-I shTR2 und shCtrl Zellen mit HSC oder HMF analysiert (**Abbildung 15**).

In PancTu-I Zellen, in denen TRAIL-R2 mittels shRNA Transduktion unterdrückt war, war eine Hochregulation der Genexpression von TRAIL-R1 nach Kokultur mit HSC zu beobachten (PancTu-I shCtrl + HSC 1 vs. PancTu-I shTR2 + HSC 1,65), während die Expression nach HMF Kokultur keine Veränderung im Vergleich zu der Expression in PancTu-I shCtrl Zellen unter HSC Kokultur aufwies (**Abbildung 15 A**). Bezüglich der Genexpression von TRAIL-R4 war eine leichte Hochregulation in PancTu-I shTR2 Zellen nach HMF Kokultur im Vergleich zu mit HSC kokultivierten Zellen zu verzeichnen. Die Genexpression von TRAIL-R4 in PancTu-I shCtrl Zellen zeigte keine Veränderungen durch die Kokulturbedingungen.

Zusammenfassend war vor allem auffällig, dass in PancTu-I Zellen mit unterdrückter TRAIL-R2 Expression die Expression des anderen Todesrezeptors nach HSC Kokultur anzusteigen scheint, während die Expression nach Kokultur mit HMF ein ähnliches Niveau wie das der Kontroll-transduzierten Zellen nach HSC Kokultur zeigte.

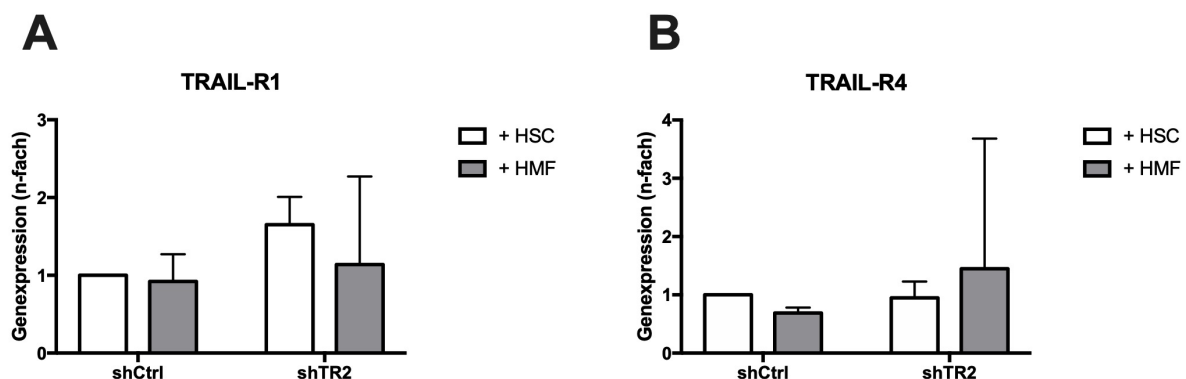


Abbildung 15: Untersuchung der TRAIL-Rezeptor Expression in PancTu-I nach Kokultur mit HSC oder HMF. 1×10^4 PancTu-I Zellen, transduziert mit shRNA für TRAIL-R2 oder Kontroll-shRNA, wurden entweder mit $2,5 \times 10^4$ HSC oder $2,5 \times 10^4$ HMF kokultiviert. Nach sechs Tagen Kokultur wurde die Genexpression von (A) *TRAIL-R1* sowie (B) *TRAIL-R4* mittels qRT-PCR untersucht. Die Genexpression der Zielgene wurde auf die Expression von *GAPDH* normalisiert, weiterhin wurden alle Werte auf die Expression von PancTu-I shCtrl normalisiert. Dargestellte Werte zeigen Mediane \pm Interquartilsabstand aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.6 Wechsel der Kokultur von HSC auf HMF kann die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation in PancTu-I shTR2 Zellen nur bedingt aufheben

Da die in 4.4 gezeigte Unterdrückung der Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen nach Kokultur mit HSC erklären könnte, warum die von diesen Zellen gebildeten Metastasen *in vivo* vermindert in ein makroskopisches Stadium auswachsen (**Abbildung 10**), sollten im Folgenden der Einfluss des „*inflammatory switch*“, welcher möglicherweise durch eine Operation induziert wird, untersucht werden. Dafür wurden

PancTu-I shCtrl und shTR2 Zellen für 6 Tage zuerst mit HSC und im Anschluss entweder mit frischen HSC, als Prolongierung der physiologischen prä-operativen Bedingungen, oder HMF, als Simulation der post-operativen Situation, kokultiviert.

PancTu-I shTR2 Zellen zeigten nach prolongierter Kokultur mit HSC weiterhin eine verminderte Zellzahl (**Abbildung 16 A**) und eine signifikant reduzierte Proliferationsfähigkeit im Vergleich mit PancTu-I shCtrl Zellen nach prolongierter Kokultur mit HSC (MFI 488 PancTu-I shCtrl 6218,33 vs. PancTu-I shTR2 3364,76; $p = 0,0293$) (**Abbildung 16 B**). Interessanterweise zeigte sich außerdem, dass die vitale Zellzahl (**Abbildung 16 A**) sowie die Proliferation (**Abbildung 16 B**) auch in PancTu-I shTR2 Zellen, die zuerst mit HSC und im Folgenden mit HMF kokultiviert wurden, im Vergleich mit PancTu-I shCtrl Zellen unter den gleichen Bedingungen stark reduziert war.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass PancTu-I Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression nach Veränderung der hepatischen Mikroumgebung von physiologisch (HSC) zu entzündlich (HMF), weniger proliferativ aktiv sind als PancTu-I Zellen mit TRAIL-R2 Expression.

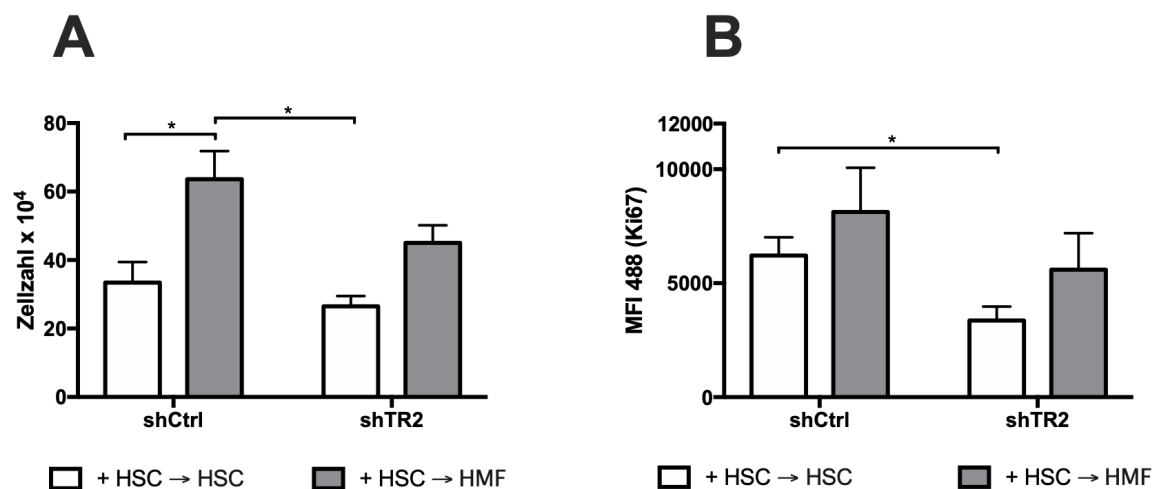


Abbildung 16: Wechsel der Kokultur von HSC auf HMF kann die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation in PancTu-I shTR2 Zellen nur bedingt aufheben. 1×10^4 PancTu-I Zellen, transduziert mit shTR2 oder shCtrl, wurden entweder mit 5×10^4 HSC oder HMF kokultiviert. Nach sechs Tagen Kokultur wurden die PancTu-I Zellen gezählt und erneut ausgesät in Kokultur mit frischen HSC oder HMF. Nach erneuten sechs Tagen Kokultur wurde **(A)** die vitale Zellzahl bestimmt und **(B)** die Proliferation mit einer Ki67-Immunfluoreszenzfärbung anhand der MFI erfasst. Dargestellte Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$

4.7 Bestimmung von Zytokinen, welche den Einfluss der HSC auf PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus vermitteln

Zellen können entweder über Zell-Zell-Kontakte oder aber über humorale Botenstoffe wie Zytokine oder Chemokine miteinander interagieren [160]. Da in dieser Arbeit ein indirektes Kokultur-Modell genutzt wurde, sollte im Folgenden aufgeklärt werden, ob und welche löslichen Faktoren in der Wechselwirkung zwischen HSC und PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus eine Rolle spielen und einen Grund für das verminderte Wachstum der PDAC Zellen unter diesen Bedingungen darstellen könnten.

Hierfür wurden zuerst die Genexpression diverser muriner Zytokine wie IL-6 [133,148] und TNF- α [147], deren Beteiligung in der Lebermetastasierung des PDAC bereits beschrieben wurde, mittels qRT-PCR in HSC und HMF nach Kokultur mit PancTu-I Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus untersucht. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede, die das beobachtete Proliferationsverhalten von PancTu-I shTR2 nach Kokultur mit HSC erklären konnten (Daten nicht gezeigt).

Da ebenfalls die Möglichkeit besteht, dass die für das Proliferationsverhalten verantwortlichen Botenstoffe von den PDAC Zellen autokrin sezerniert werden, als Folge einer der Interaktion mit HSC bzw. HMF, wurde das LEGENDplex™ *Human Inflammation Panel* genutzt, um durchflusszytometrisch die Konzentrationen von 13 humanen Zytokinen zu messen.

Aus diesen 13 Zytokinen korrespondierten vor allem die Konzentrationen von humanem IL-8 und IL-6 mit dem beobachteten Wachstumsverhalten der PDAC Zellen nach Kokultur mit HSC, während bei den 11 anderen (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-23, MCP-1, CCL2, IL-10, IFN- α 2, IL-17A, IL-18, IL-33) keine relevante Assoziation mit der Proliferationsverminderung von PDAC Zellen nach Kokultur mit HSC ausgemacht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Menge an IL-8 war interessanterweise in Überständen aus der Kokultur von PancTu-I shTR2 Zellen mit HSC wesentlich höher im Vergleich zu PancTu-I shTR2 Zellen mit HMF (PancTu-I shTR2 + HSC 25,34 pg/10⁴ Zellen vs. PancTu-I shTR2 + HMF 9,95 pg/10⁴ Zellen), während Überstände der PancTu-I shCtrl Zellen keine Regulation unter den verschiedenen Kokulturbedingungen zeigten (**Abbildung 17 A**). IL-6 hingegen war vermehrt in Überständen von PancTu-I shCtrl und shTR2 Zellen nach Kokultur mit HSC aufzufinden im Vergleich zu Überständen der beiden PDAC Zelllinien nach Kokultur mit HMF (**Abbildung 17 B**). Gleichzeitig war auch hier der

Unterschied zwischen HSC und HMF kokultivierten Zellen bei PancTu-I shTR2 Zellen am größten (PancTu-I shTR2 + HSC 0,986 pg/10⁴ Zellen vs. PancTu-I shTR2 + HMF 0,336 pg/10⁴ Zellen).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass sowohl IL-8 als auch IL-6 durch die Interaktion der PDAC Zellen mit HSC (physiologischen Lebermikroumgebung) moduliert werden und dass dieser Prozess abhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus ist.

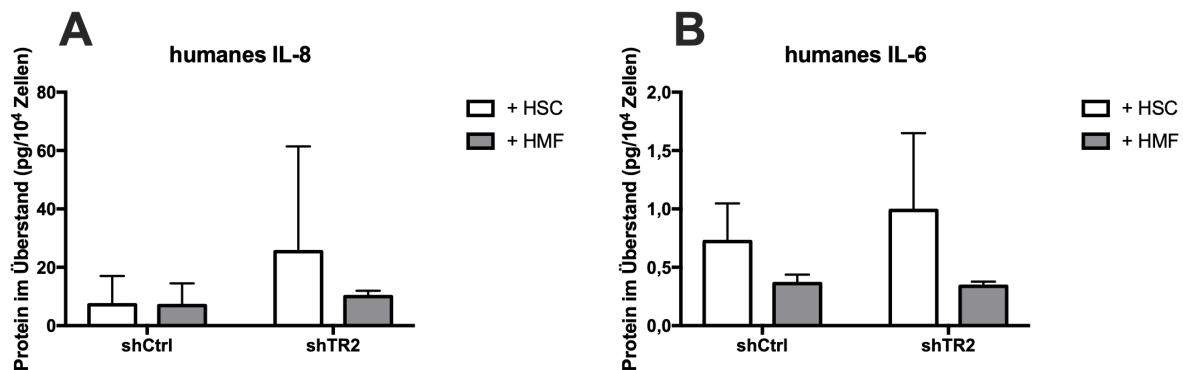


Abbildung 17: Bestimmung von Zytokinen, welche den Einfluss von HSC auf PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus vermitteln. 1 x 10⁴ PancTu-I Zellen, transduziert mit shRNA für TRAIL-R2 oder Kontroll-shRNA, wurden entweder mit 2,5 x 10⁴ HSC oder HMF kokultiviert. Nach sechs Tagen Kokultur wurden Überstände der Zellkulturen abgenommen, zentrifugiert und mittels LEGENDplex™ Multiplex Assay auf 13 verschiedene humane Zytokine untersucht. Konzentrationen der ausgewählten Analyte **(A)** IL-8 und **(B)** IL-6 sind auf Zellzahlen der korrespondierenden Experimente normalisiert. Dargestellte Daten zeigen Mediane ± Interquartilsabstand **(A)** oder Mittelwerte ± SEM **(B)** aus drei unabhängigen Experimenten.

4.8 Die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen ist IL-8 abhängig

Die Befunde aus 4.7 geben Anlass für die Hypothese, dass die verminderte Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen in Gegenwart von HSC entweder IL-8 oder IL-6 vermittelt ist. Um nun zu untersuchen, ob IL-8 oder IL-6 kausal für die verminderte Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen nach HSC Kokultur verantwortlich ist, sollte einer der Faktoren unter HSC Kokultur inhibiert werden. Da IL-8 bereits in früheren Studien als ein Faktor identifiziert wurde, der einen HSC-vermittelten Wachstumsarrest induzieren kann [139] und weiterhin zum TRAIL assoziiertem Sekretom gehört [144,158,161], wurde IL-8 durch die Applikation eines neutralisierenden Antikörpers in Kokulturen mit HSC gehemmt. Während die Applikation des Antikörpers in PancTu-I shCtrl Zellen keinen Effekt zeigte, erhöhte die Antikörper-vermittelte Blockade von IL-8 die Zellzahl von PancTu-I shTR2 Zellen auf fast das gleiche Niveau wie die der PancTu-I shCtrl Zellen, die mit einem Kontroll-Antikörper inkubiert wurden (PancTu-I

shTR2 + HSC + Ctrl IgG1 24×10^4 vs. PancTu-I shTR2 + HSC + anti-IL-8 $37,325 \times 10^4$ vs. PancTu-I shCtrl + HSC + Ctrl IgG1 $46,187 \times 10^4$) (**Abbildung 18 A**). Auch die verminderte Proliferation in PancTu-I shTR2 Zellen nach Kokultur mit HSC konnte durch Inhibition von IL-8 deutlich erhöht werden, es zeigte sich sogar eine höhere Ki67 Positivität als in PancTu-I shCtrl Zellen unter den gleichen Bedingungen (PancTu-I shTR2 + HSC + Ctrl IgG1 0,61 vs. PancTu-I shTR2 + HSC + anti-IL-8 1,67; $p = 0,0246$) (**Abbildung 18 B + C**).

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der HSC-vermittelte Wachstumsarrest in PDAC Zellen ohne TRAIL-R2 Expression durch IL-8 vermittelt wird.

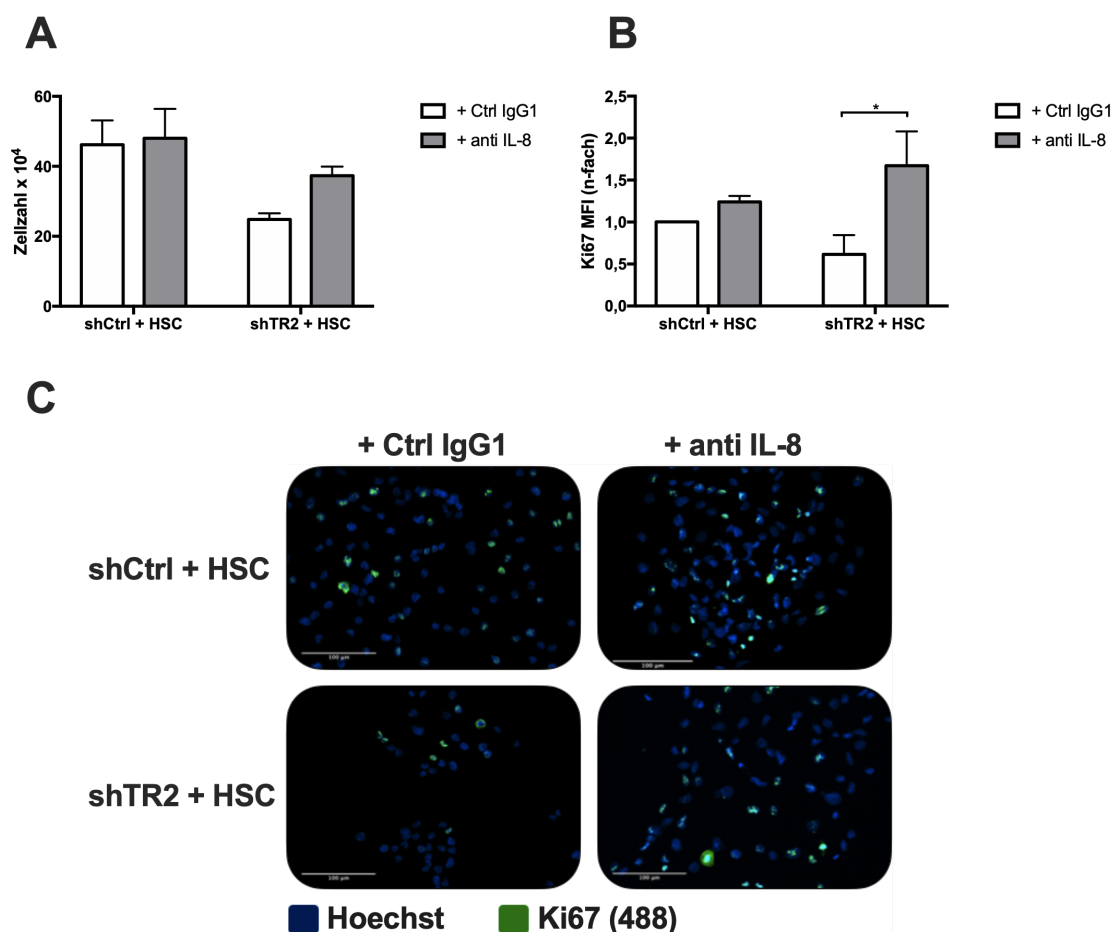


Abbildung 18: Die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen ist IL-8 abhängig. 1×10^4 PancTu-I Zellen, transduziert mit shRNA für TRAIL-R2 oder Kontroll-shRNA, wurden mit $2,5 \times 10^4$ HSC kokultiviert. Applikation von 10 µg/mL eines Kontroll-Antikörpers (+ Ctrl IgG1) oder 10 µg/mL eines IL-8 blockierenden Antikörpers (+ anti IL-8) fand an Tag 1 und Tag 3 statt. Nach sechs Tagen Kokultur wurde **(A)** die vitale Zellzahl erfasst. **(B)** Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung wurde die Proliferation untersucht, die anhand der Ki67 MFI gemessen wurde. MFI-Werte wurden normalisiert auf shCtrl + HSC + Ctrl IgG1. **(C)** zeigt repräsentative Bilder der Ki67-Färbung. Der Maßstab entspricht 100 µm. Dargestellte Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,050$

4.9 TNF- α erhöht nicht die Proliferation der PDAC Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung

Die *in vivo* beobachtete lokale Entzündung der Leber nach chirurgischer Manipulation zeigte eine deutliche humorale Reaktion in Verbindung mit einer erhöhten Expression von HMF-assoziierten Markern (**Abbildung 12 + Abbildung 13**). Um zu untersuchen, welcher lösliche Faktor für die Verstärkung von Zellproliferation der PDAC Zellen nach Kokultur mit HMF verantwortlich ist, wurde im Folgenden das am stärksten durch eine Operation regulierte Zytokin, TNF- α , unter Kokultur mit HMF blockiert. TNF- α konnte bereits im Vorfeld als ein Faktor identifiziert werden, der die Lebermetastasierung des PDACs fördert [162] und ist darüber hinaus an vielen Schritten der Tumorprogression beteiligt [163]. Für die Inhibition wurde Etanercept genutzt, ein Fusionsprotein bestehend aus der extrazellulären Bindungsdomäne des TNF- α Rezeptors verbunden mit der F_C-Untereinheit des humanen IgG1, welches klinisch bereits für die Behandlung von rheumatischen Erkrankungen eingesetzt wird [164]. Im Gegensatz zu anderen TNF- α Inhibitoren konnte für Etanercept bereits gezeigt werden, dass es neben der Aktivität des humanen auch die des murinen TNF- α hemmen kann [165,166].

Die Applikation von Etanercept führte in HMF kokultivierten PancTu-I shCtrl und PancTu-I shTR2 Zellen eher zu marginalen Steigerungen der vitalen Zellzahl im Vergleich zu Ansätzen ohne Zugabe mit Etanercept (**Abbildung 19 A**). Die Analyse der Proliferation mittels Immunfluoreszenz-Färbung auf Ki67 zeigte inkongruente Ergebnisse: Während die Inhibition von TNF- α die Proliferation in PancTu-I shCtrl Zellen in Kokultur mit HMF senkte, war in shTR2 Zellen eine erhöhte Proliferation im Vergleich mit Kontroll-behandelten Zellen zu beobachten (**Abbildung 19 B**). Letztere Befunde sind jedoch weder mit den korrespondierenden Zellzahlen vereinbar noch erklären sie die in **Abbildung 14 D** beobachtete verstärkte Proliferation von PDAC Zellen nach Kokultur mit HMF. Daher deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass TNF- α nicht der gesuchte Faktor der HMF-vermittelten Proliferation ist.

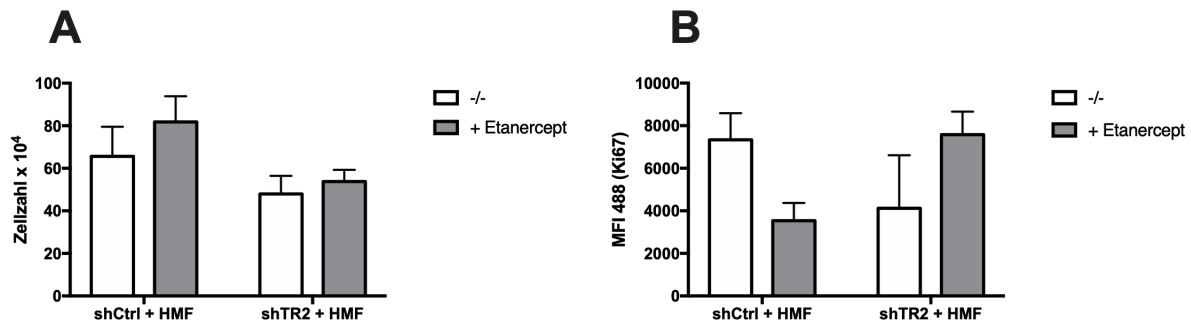


Abbildung 19: TNF- α erhöht nicht die Proliferation der PDAC Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung. 1×10^4 PancTu-I Zellen, transduziert mit shRNA für TRAIL-R2 oder Kontroll-shRNA, wurden mit $2,5 \times 10^4$ HMF kokultiviert. Applikation von $10 \mu\text{g/mL}$ eines TNF- α blockierenden Antikörpers (+ Etanercept) fand an Tag 1 und Tag 3 statt, während Kontrollansätze (-/-) unbehandelt blieben. Nach sechs Tagen Kokultur wurde **(A)** die vitale Zellzahl erfasst. **(B)** Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung wurde die Proliferation untersucht, die anhand der Ki67 MFI gemessen wurde. Dargestellte Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3-4 unabhängigen Experimenten.

4.10 Die Steigerung der PDAC Zellproliferation nach HMF Kokultur wird unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus durch VEGF vermittelt

Da TNF- α offenbar nicht der Faktor ist, der unter HMF Kokultur fördernd auf die PDAC Zellproliferation wirkt, wurde im Folgenden nach weiteren löslichen Faktoren gesucht. VEGF ist schon seit längerem wegen seiner pro-angiogenetischen Funktion als Tumor-fördernder Botenstoff bekannt und wird bereits als Zielstruktur von Antikörpern wie Bevacizumab oder Aflibercept therapeutisch in der Behandlung von Kolonkarzinompatienten genutzt [167–169]. Darüber hinaus konnten bereits verschiedene tumorprogressionsfördernde Eigenschaften auf zellulärer Ebene für VEGF-A beschrieben werden [170]. Lenk *et al.* konnten zeigen, dass VEGF die Proliferation von PDAC Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung erhöhen kann [139]. Da VEGF auch in unserem *in vivo* Modell nach chirurgischer Manipulation leicht erhöht war (**Abbildung 12**), sollte seine Relevanz im Kokulturmodell untersucht werden.

Dafür wurde aus HSC und HMF, die mit PancTu-I shCtrl or shTR2 Zellen kokultiviert worden waren, RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Genexpression von murinem VEGF-A untersucht (**Abbildung 20 A**). Hier zeigte sich, dass die Expression von VEGF-A in kokultivierten HMF wesentlich höher war als in kokultivierten HSC, sowohl nach Kokultur mit PancTu-I shCtrl (HSC + PancTu-I shCtrl 1 vs. HMF + PancTu-I shCtrl 1,47) als auch mit PancTu-I shTR2 (HSC + PancTu-I shCtrl 0,90 vs HMF + PancTu-I shTR2 1,22), wobei in letzteren die Expression etwas geringer war als in HMF

kokultiviert mit shCtrl Zellen. Um einen direkten Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von VEGF in HMF und der erhöhten Proliferation der PDAC Zellen nach Kokultur mit HMF zu zeigen, wurde VEGF durch Applikation eines blockierenden Antikörpers inhibiert. Da Aflibercept ein löslicher VEGF-Rezeptor ist und im Gegensatz zu Bevacizumab nicht nur humanes VEGF-A, sondern auch alle Isoformen von murinem und humanen VEGF bindet [171,172], wurde 10 µg/mL Aflibercept für die folgenden Versuche verwendet [173]. Als Kontrolle wurde Rituximab in derselben Konzentration eingesetzt.

Applikation von Aflibercept in Kokulturen von PDAC Zellen mit HMF führte zu einer erniedrigten vitalen Zellzahl sowohl in PancTu-I shCtrl (PancTu-I shCtrl + HMF + Rituximab $34,66 \times 10^4$ vs. PancTu-I shCtrl + HMF + Aflibercept $24,83 \times 10^4$) als auch in PancTu-I shTR2 Zellen (PancTu-I shTR2 + HMF + Rituximab $31,45 \times 10^4$ vs. PancTu-I shTR2 + HMF + Aflibercept $20,48 \times 10^4$) im Gegensatz zur Zugabe von Rituximab (**Abbildung 20 B**). Auch die Proliferation war nach Inhibition von VEGF durch Aflibercept um 40% im Falle von PancTu-I shCtrl ($p = < 0,0001$) beziehungsweise um 55% in PancTu-I shTR2 Zellen ($p = < 0,0001$) reduziert (**Abbildung 20 C + D**).

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass die HMF-vermittelte Proliferationssteigerung von PDAC Zellen durch Hemmung von VEGF reduziert werden kann. Gleichzeitig sind diese Effekte vom Ausmaß vergleichbar in PancTu-I shCtrl und PancTu-I shTR2 Zellen, so dass davon auszugehen ist, dass dieser Effekt TRAIL-R2 unabhängig vermittelt wird.

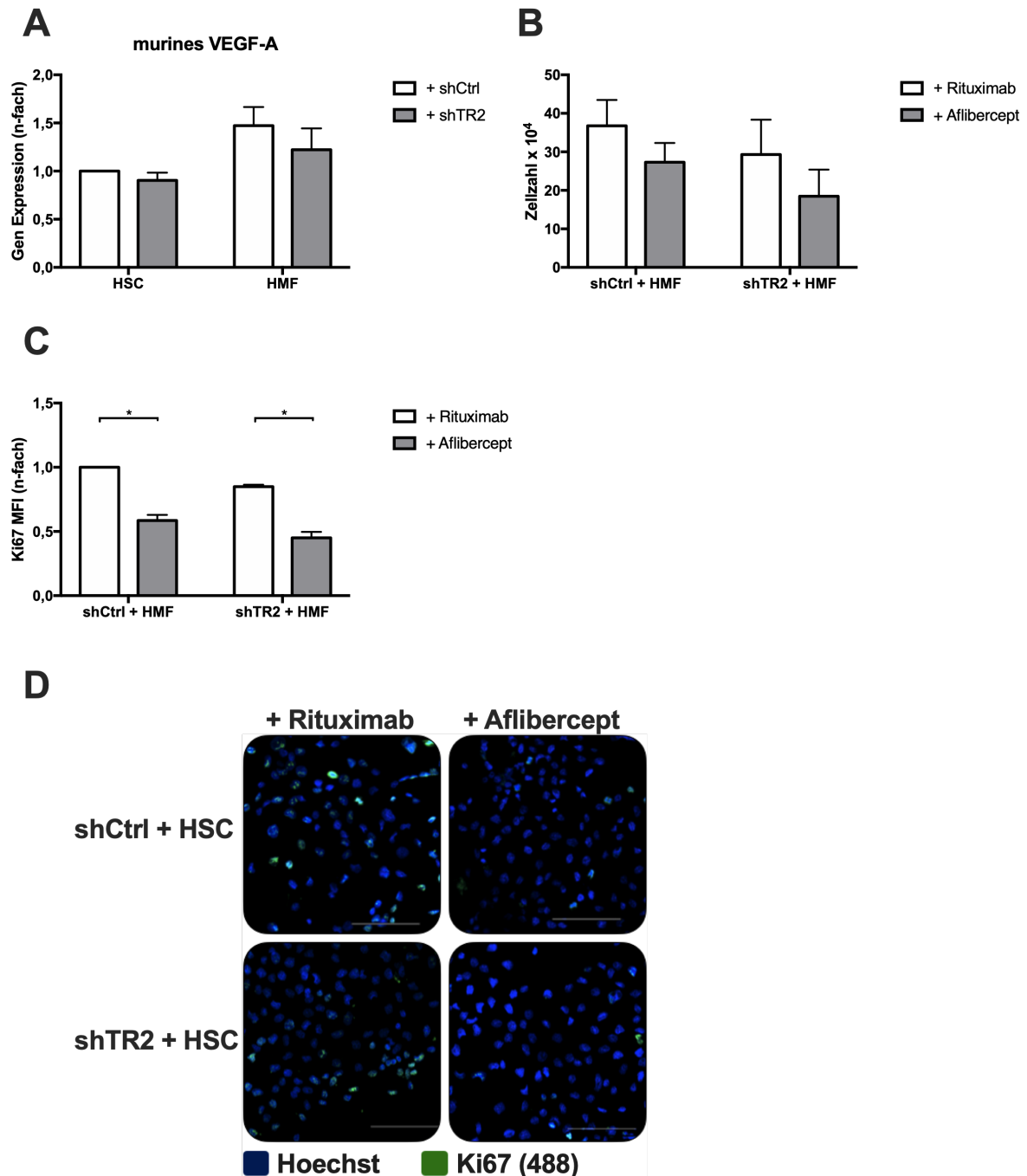


Abbildung 20: Die Steigerung der PDAC Zellproliferation nach HMF Kokultur wird unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus durch VEGF vermittelt. (A) Die Genexpression von murinem VEGF-A wurde in HSC und HMF nach 6-tägiger Kokultur mit PancTu-I shCtrl oder shTR2 mittels qRT-PCR erfasst. Die Genexpression des Zielgens wurde auf die Expression von GAPDH und im Anschluss auf die Werte von HSC + shCtrl normalisiert. 1×10^4 PancTu-I Zellen, transduziert mit shRNA TRAIL-R2 oder Kontroll-shRNA, wurden mit $2,5 \times 10^4$ HMF kokultiviert. Applikation von 10 µg/mL eines Kontroll-Antikörpers (+ Rituximab) oder von 10 µg/mL eines VEGF blockierenden Antikörpers (+ Aflibercept) fand an Tag 1 und Tag 3 statt. Nach sechs Tagen Kokultur wurde (B) die vitale Zellzahl erfasst. (C) Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung wurde die Proliferation untersucht, die anhand der Ki67 MFI gemessen wurde. MFI-Werte wurden normalisiert auf shCtrl + HMF + Rituximab. (D) zeigt repräsentative Bilder der Ki67-Färbung. Der Maßstab entspricht 100 µm. Dargestellte Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,050$

5 Diskussion

5.1 TRAIL-R2 ist eine wichtige Determinante für das Auswachsen von Metastasen in der Leber nach Resektion des primären PDAC

Eine metastasierungs-fördernde Rolle des TRAIL-Systems konnte erstmals 2006 beschrieben werden. Die Behandlung mit TRAIL von Mäusen, denen orthotop humane PDAC Zellen inokuliert worden waren, führte zu einer starken Zunahme der Anzahl und Größe von Lebermetastasen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne TRAIL-Behandlung [114]. Auch im kolorektalen Karzinom führte die Behandlung mit TRAIL in Abhängigkeit von einer Mutation im *KRAS*-Gen zu einer vermehrten Bildung von Lebermetastasen [113]. Während diese beiden Studien die metastasierungs-fördernde Rolle von TRAIL in Xenograftmodellen beschreiben, konnte im Einklang damit eine weitere Studie nachweisen, dass die genetische Unterdrückung von *mTRAIL-R*, einem murinen TRAIL-Rezeptor homolog zu TRAIL-R1 und TRAIL-R2 im Menschen, in einem endogenen PDAC Modell die Lebermetastasierung erheblich reduziert [115]. Weiterhin demonstrierten Karstedt *et al.* in derselben Studie, dass die Unterdrückung von TRAIL-R2 in humanen PDAC Zellen in einem klinisch-adaptierten Resektionsmodell die post-operative Lebermetastasierung ebenfalls deutlich verringert. Ausgehend von diesen Befunden stellte sich die erste Fragestellung dieser Arbeit, ob die verringerte post-operative Lebermetastasierung von TRAIL-R2 unterdrückten PDAC Zellen durch ein vermindertes *Homing* der Tumorzellen in die Leber oder aber durch ein vermindertes Auswachsen dieser Zellen innerhalb der Lebermikroumgebung verursacht wird. Da in dem oben genannten klinisch-adaptierten Resektionsmodell bisher nur makroskopische Lebermetastasen untersucht worden waren, mikroskopische Metastasen und DTC aber als Ausgang für neuauftretende Metastasierung nach Resektion des Primärtumors angesehen werden [174,175], wurden in dieser Arbeit zuerst die Lebern dieser Mäuse mittels Immunfluoreszenzfärbung auf DTC, Nano- und Mikrometastasen untersucht. Im Einklang mit den obigen Ergebnissen waren in Lebern von Mäusen, die mit TRAIL-R2 unterdrückten PDAC Zellen inokuliert worden waren, weniger makroskopische Metastasen zu detektieren (**Abbildung 10 B**), wohingegen sich jedoch eine deutlich erhöhte Anzahl an DTC und Nanometastasen zeigte (**Abbildung 10 C**). Da auch in der Gruppe mit TRAIL-R2

unterdrückten PDAC Zellen größere Mengen an kleinen Metastasen zu finden waren, deuten diese Befunde darauf hin, dass TRAIL-R2 in diesem Modell nicht die Invasion, Intravasation oder das Überleben in der Zirkulation beeinflusst, sondern eher die Kolonisation und das Auswachsen im Sekundärkontext der Leber. Im Gegensatz dazu konnte in einem Brustkrebs-Xenograftmodell gezeigt werden, dass TRAIL-R2 vor allem wichtig für das *Homing* der Krebszellen in das Sekundärorgan ist, in diesem Falle der Knochen [145]. Mechanistisch konnten die Autoren zeigen, dass TRAIL-R2 die Migration der Brustkrebszellen verstärkt sowie die Expression des für das *Homing* essentiellen Rezeptors *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4) reguliert. CXCR4 konnte in dieser Studie in der verwendeten Zelllinie PancTu-I auf mRNA Ebene nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt), weshalb ein TRAIL-R2 vermitteltes *Homing* wie in Fritsche *et al.* als Mechanismus für die in dieser Arbeit vorliegenden Befunde unwahrscheinlich ist. Gleichzeitig deuten die im Vergleich zu PDAC Zellen mit normaler TRAIL-R2 Expression hohe Anzahl an DTC und Nanometastasen sowie niedrige Anzahl an Makrometastasen in PDAC Zellen mit unterdrückter TRAIL-R2 Expression darauf hin, dass das Auswachsen zu makroskopischen Metastasen vermindert ist und die Metastasen in einem kleinen Stadium verharren.

Da das verminderte Auswachsen der Lebermetastasen in den Mäusen mit PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression sowohl durch eine verminderte Proliferation als auch einen vermehrten Zelltod begründet sein könnte, wurde als nächstes die Tumorzellproliferation der Metastasen mit Hilfe einer Ki67 Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Interessanterweise zeigten Nanometastasen aus TRAIL-R2 unterdrückten PDAC Zellen eine signifikant geringere Proliferationstätigkeit als solche mit TRAIL-R2 Expression (**Abbildung 11 B**). DTC aus beiden Gruppen waren gleichwertig wenig proliferativ (**Abbildung 11 A**). Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass TRAIL-R2 das Auswachsen von DTC in der Leber zu makroskopischen Läsionen durch Kontrolle der Proliferation beeinflusst, so dass seine Abwesenheit die Tumorzellen in einen nicht proliferativen, ruhenden Zustand versetzt, in dem sie in der Leber vital verharren. Ein solcher Phänotyp, charakterisiert durch einzelne oder kleine Gruppen von DTC, welche negativ für Proliferationsmarker wie Ki67 sind, wird in der Literatur als Dormanz bezeichnet [129,174,176,177]. Grundsätzlich wird zwischen drei verschiedenen Kategorien der Dormanz unterschieden: 1. Zelluläre Dormanz, durch welche solitäre Zellen oder Zellcluster einen Zellzyklusarrest erfahren, 2. angiogeneti-

sche Dormanz, in der die gesamte Tumormasse durch die Balance zwischen proliferierenden und durch mangelnde Vaskularisierung versterbende Tumorzellpopulation klein gehalten und kontrolliert wird und 3. die immun-vermittelte Dormanz, in der die Tumorzellpopulation durch kontinuierliche Abtötung einiger Tumorzellen durch die Immunabwehr kontrolliert wird und daher nicht zu makroskopisch sichtbaren Metastasen auswächst [129]. Für das PDAC konnte zuletzt sehr eindrücklich demonstriert werden, dass sich dormante Tumorzellen in der Leber durch die Herunterregulation von *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Molekülen und dem epithelialen Marker E-Cadherin vor der Elimination durch zytotoxische T-Zellen schützen [178]. In diesem Modell ging die Aufnahme der Proliferationsfähigkeit der Tumorzellen mit einer Re-expression der MHC I Moleküle und einer Elimination durch T-Zellen einher. Erst die Depletion der T-Zellen ermöglichte das Auswachsen zu makroskopischen Metastasen. Auch in anderen Tumorentitäten wurde bereits der Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Induktion und Aufrechterhaltung von dormanten Tumorzellen im Sekundärkontext gezeigt [140,179,180]. Da die in unserem Modell verwendeten Mäuse die Mutationen SCID (*Prkdc^{scid}*) und beige (*Lyst^{bg-J}*) tragen, die in die Abwesenheit von funktionalen T-, B- und NK-Zellen verursachen [181], lässt sich ein Mechanismus, welcher durch das adaptive Immunsystem vermittelt wird, ausschließen. In dieser Studie sollte spezifisch die Rolle von TRAIL-R2 untersucht werden. Da aber Mäuse nur mTRAIL-R exprimieren, welcher homolog zu beiden Rezeptoren, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, ist [182], wurden in dieser Studie humane Tumorzellen mit unterschiedlicher TRAIL-R2 Expression verwendet. Diese erfordern die Verwendung von immun-komprimierten Mäusen, da es sonst zu einer immunologischen Abstoßungsreaktion kommt. Einerseits stellt diese Tatsache eine mögliche Limitierung der Aussagekraft von beobachteten Ergebnissen dar, da der Beitrag des adaptiven Immunsystems auf das Wachstumsverhalten der PancTu-I Zellen nicht berücksichtigt werden kann. Andererseits ermöglicht das Modell gezielt die funktionelle Charakterisierung von TRAIL-R2, im Wachstumserhalten von PDAC Zellen. Weiterhin kann in den bisherigen Beobachtungen der Studie nun der Einfluss des adaptiven Immunsystems ausgeschlossen werden, so dass sich die Suche nach einem möglichen Mechanismus auf entweder tumor-intrinsische Funktionen oder aber auf die Interaktion von TRAIL-R2 unterdrückten Tumorzellen mit Zellen des angeborenen Immunsystems sowie anderen Stroma-Zellen konzentriert. In diesem Zusammenhang konnten Hartwig *et al.* vor kurzem demonstrieren, dass TRAIL-R in Tumorzellen die Sekretion von *C-C Motif*

Cytokine Ligand 2 (CCL2) stimuliert, welches die Akkumulation und Polarisierung von tumor-unterstützenden *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) und M2-Makrophagen fördert [144]. Interessanterweise wurde auch für diese Zellpopulationen bereits eine Beteiligung an der Ausbildung von Lebermetastasen des PDAC gezeigt: Steele *et al.* zeigten, dass die Etablierung von Lebermetastasen mit einer massiven Akkumulation von MDSCs und Makrophagen verbunden ist und dass die Inhibition von *C-X-C chemokine receptor type 2*, ein von MDSC und Makrophagen exprimierter Chemokinrezeptor, die Ausbildung von PDAC-Metastasen in der Leber massiv reduziert [183]. Auch funktionell konnte die Bedeutung von M2-Makrophagen für die Ausbildung von Lebermetastasen im PDAC aufgedeckt werden; sie akkumulieren bereits in kleinen metastatischen Läsionen und sezernieren Granulin, welches hepatische Sternzellen aktiviert. Diese werden aktiviert und bilden ein periostin-reiches Stroma im Tumor und fördern so zum einen das Tumorwachstum und schützen zum anderen die Tumorzellen vor der Eliminierung durch zytotoxische T-Zellen [134,184]. Aufgrund dieser Beobachtungen und der kausalen Verbindung zwischen dem TRAIL-induziertem Sekretom und der Akkumulation von pro-tumoralen MDSC und Makrophagen, könnte eine Rolle dieser Zellen bei der Entstehung von Lebermetastasen auch in unserer Studie denkbar sein. Da die eben genannten Studien sich vor allem auf eine palliative Situation beziehen, wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit diese Zellpopulationen auch an der Ausbildung von Lebermetastasen nach Resektion des Primärtumors beteiligt sind.

Zusammengefasst demonstrieren diese *in vivo* Befunde, dass TRAIL-R2 eine wichtige Determinante für das Auswachsen von Metastasen in der Leber nach Resektion des Primärtumors darstellt. Die genetische Unterdrückung des Rezeptors hemmt vor allem die Proliferation in kleinen Tumorerläsionen und mindert dadurch das Auswachsen in manifeste Makrometastasen. Aus diesem Kontext und aus dem der Literatur ergeben sich verschiedene Fragen: Beruht das verminderte Auswachsen der TRAIL-R2 unterdrückten Lebermetastasen auf einem zell-intrinsischen Mechanismus oder auf einem Zusammenspiel mit zellulären Partnern der hepatischen Mikroumgebung? Welche Rolle spielt die Resektion des Primärtumors im Zusammenhang mit dem Auswachsen von Lebermetastasen mit verminderter Expression von TRAIL-R2 im Vergleich zu dem von Lebermetastasen mit hoher TRAIL-R2 Expression?

5.2 Die Resektion des Primärtumors induziert eine lokale Entzündungsreaktion der Leber und geht mit einer Aktivierung von hepatischen Sternzellen einher

Die in 5.1 diskutierten Befunde zeigten in einem klinisch-adaptierten Mausmodell, dass die Unterdrückung von TRAIL-R2 in Tumorzellen das Auswachsen von Lebermetastasen nach Resektion des Primärtumors effektiv verringert, da diese Zellen zwar in die Leber eingewandert waren, allerdings im Vergleich zu TRAIL-R2 exprimierenden Tumorzellen vermehrt einen ruhenden, nicht proliferierenden Phänotyp zeigten. Das verwendete Mausmodell dient dazu, eine klinisch relevante Herausforderung zu simulieren: Das Kriterium für die potentiell kurative Resektion des Primärtumors ist unter anderem, dass der Patient innerhalb der Staging-Untersuchungen keine Anzeichen für Fernmetastasen oder für ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium zeigt [6]. Nach einer erfolgreichen R0-Resektion des Primärtumors ist daher davon auszugehen, dass der Patient tumorfrei ist. Trotzdem entwickeln 75% dieser Patienten Metastasen innerhalb von zwei Jahren nach Resektion [123]. Diese Beobachtung legt nahe, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bereits disseminierte, dormante Tumorzellen in der Leber vorhanden sind, welche nach der Operation als Ursprung für sich entwickelnde Lebermetastasen gesehen werden müssen. Dieses Phänomen wurde nicht nur für das PDAC, sondern auch in anderen Entitäten wie dem Mammakarzinom beobachtet [185,186]. Mit wenigen Monaten bis 25 Jahren zeigen sich große Unterschiede bezüglich der Zeitspanne die vergeht bis die Erkrankung wieder auftritt [185,186]. Daher stellt sich die Frage, ob es bestimmte Auslöser für das „Aufwachen“ der ruhenden Tumorzellen gibt, die diese großen Unterschiede bezüglich der Detektion von Lebermetastasen nach Resektion des Primärtumors erklären. Ein möglicher Auslöser, welcher in der Literatur diskutiert wird, ist der operative Eingriff zur Entfernung des Primärtumors [187]. Voruntersuchungen im selben klinisch-adaptierten Mausmodell, wie in dieser Studie verwendet, konnten bereits zeigen, dass die Inhibition von Entzündungsmediatoren wie IL-6 [148] oder TNF- α [162] die Ausbildung von Lebermetastasen nach Resektion des Primärtumors deutlich verringert. Diese Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer post-operativen Entzündungsreaktion und dem Auswachsen von Lebermetastasen hin. Unklar war allerdings, ob die Resektion nur eine systemische oder auch eine lokale Entzündungsreaktion hervorruft, und wenn ja, wie diese vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Mäuse entweder einer explorativen Laparotomie, einer subtotalen Pankreatektomie oder gar keiner

operativen Prozedur unterzogen und 48 Stunden danach die Lebern auf das Vorhandensein von humoralen Entzündungsmediatoren untersucht. Interessanterweise konnten wir in den Lebern beider Gruppen, die einer operativen Prozedur ausgesetzt worden waren, erhöhte Spiegel von löslichen Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-23, IL-1 α , GM-CSF, IL-10, IFN- β , IL-17A, IL-27 und VEGF detektieren (**Abbildung 12**), im Vergleich mit nicht operierten Mäusen. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die operative Manipulation des Pankreas eine zytokinvermittelte Entzündungsreaktion lokal in der Leber auslöst. Da sich diesbezüglich kaum Unterschiede zwischen explorativ laparotomierten und pankreatektomierten Mäusen zeigten, kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass generell eine Entzündungsreaktion durch operative Eingriffe des Abdomens verursacht wird und nicht zwangsläufig nur durch die operative Entfernung des Pankreas. Für alle detektierten Zytokine konnte bereits die Förderung von pro-tumorigenen Eigenschaften wie Migration, Invasion, Angiogenese und Proliferation nachgewiesen werden [163,170,188–190] und die Entzündung wird bereits seit längerem als eine der „*Hallmarks of Cancer*“ betrachtet, welche erheblich zur Entstehung und Progression des Tumor beiträgt [154]. Unsere Befunde untermauernd zeigten Krall *et al.* kürzlich in einem Brustkrebsmodell, dass die Resektion des Primärtumors eine systemische Entzündung und im Zuge dessen die Rekrutierung von Makrophagen in den Tumor induziert, welche dann das Auswachsen von Fernmetastasen unterstützen, die vorher durch zytotoxische T-Zellen in Schach gehalten worden sind [140]. Dieser Effekt ließ sich durch die perioperative Applikation des anti-entzündlich wirkendem Medikaments Meloxicam unterdrücken. Ähnliche Effekte konnten sogar schon klinisch beobachtet werden, da die Rezidivrate von Brustkrebspatientinnen nach Resektion durch die perioperative Anwendung des nicht-steroidalen Entzündungshemmers Ketorolac gesenkt wurde [191,192]. Diese Ergebnisse werden untermauert von klinischen Befunden, dass nach Resektion des Primärtumors ein erhöhter *C-Reactive Protein* (CRP)-Wert, ein unspezifischer klinischer Marker für Entzündung, mit einer verkürzten progressionsfreien Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit von Brustkrebs- [193] sowie von Pankreaskarzinompatienten korreliert [194,195]. Auch für die Entstehung von Lebermetastasen durch operations-induzierte Entzündung gibt es bereits Hinweise: Tohme *et al.* konnten zeigen, dass die chirurgische Manipulation in einem Mausmodell des kolorektalen Karzinoms die Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* induziert, welche dann die Ausbildung und Progression von Lebermetastasen beschleunigen

[136]. Während diese Befunde unsere Hypothese stützen, dass eine operations-induzierte Entzündung das Auswachsen von dormanten Fernmetastasen initiieren und beschleunigen kann, zeigten unsere Befunde im Gegensatz zu den diskutierten Studien nicht nur eine systemische, sondern auch eine lokale Entzündungsreaktion am Ort der Fernmetastasierung. Dass diese wahrscheinlich die Folge einer vorangegangenen systemischen Entzündung war, ist nicht auszuschließen. Inflammatorische Zytokine wurden nicht nur in der Leber, sondern auch im peripheren Blut der Mäuse untersucht, waren aber unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten Assays (Daten nicht gezeigt). Daher ist diesbezüglich keine genaue Aussage zu treffen, da dies entweder an der mangelnden Sensitivität des Assays oder aber an echten geringen Spiegeln der Zytokine im peripheren Blut liegen kann. Diesbezüglich wäre ebenfalls denkbar, dass der gewählte Zeitpunkt der Blutentnahme mit 48 Stunden nach Resektion bereits zu spät ist, um eine direkte Entzündungsreaktion im peripheren Blut zu detektieren. Über die mechanistische Entstehung der lokalen Entzündungsantwort kann nur spekuliert werden: grundsätzlich führt ein operativer Eingriff zu einer systemischen Stressreaktion, die unter anderem durch die Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF- α aus aktivierten Makrophagen am Ort des Traumas initiiert wird. Diese setzen dann eine Vielzahl an hormonellen und immunologischen Vorgängen in Gange, von denen einer der ersten die akute Phase Antwort ist. Die akute Phase Antwort ist charakterisiert durch die erhöhte Produktion von inflammatorischen Mediatoren und Anti-Proteasen wie CRP, Fibrinogen und α_2 -Makroglobulin in der Leber [196]. Daher ist es denkbar, dass aufgrund der räumlichen Nähe zum Produktionsort dieser eigentlich systemisch gerichteten inflammatorischen Mediatoren die Konzentration in der Leber besonders hoch ist und daher dort eine lokale Entzündungsreaktion, charakterisiert durch die in **Abbildung 12** beobachteten Zytokine, verursacht. Nicht in Einklang mit dieser Überlegung ist allerdings die Beobachtung, dass IL-6, dessen überschießende Produktion eigentlich Teil der Akuten Phase Reaktion ist [196], das einzige Zytokin war, welches in Lebern von nicht-operierten Mäusen vermehrt vorgefunden wurde als in Lebern von operierten Mäusen. Hier ist es aber auch denkbar, dass die Produktion von IL-6 einer unterschiedlichen Kinetik unterliegt als andere Mediatoren und diese daher durch die Untersuchung der gewählten Zeitpunkte nicht dargestellt werden konnte.

Insgesamt zeigen unsere *in vivo* Befunde, dass ein operativer Eingriff im Abdomen eine lokale Entzündungsreaktion in der Leber hervorruft. Diese Befunde zusammen

mit den Beobachtungen, dass PDAC Metastasen im selben Modell nach Resektion des Primärtumors abhängig von TRAIL-R2 in der Leber auswachsen, weisen im Kontext der Literatur darauf hin, dass durch die operations-induzierte Entzündung das Auswachsen der vorher ruhenden DTC in der Leber initiiert wird. Da aber in dem klinisch-adaptierten PDAC Modell keine Befunde von Mäusen vorliegen, in denen die Primärtumore nicht reseziert wurden, lässt sich dieser Zusammenhang nur vermuten.

5.3 Der Entzündungsstatus der hepatischen Mikroumgebung kontrolliert das Wachstumsverhalten von PDAC Zellen in Abhängigkeit von TRAIL-R2

Wie oben beschrieben sind an der Ausbildung von Lebermetastasen verschiedene Zellpopulationen beteiligt, welche zum Teil auch durch eine inflammatorische Reaktion der Leber rekrutiert oder aktiviert werden können. Daher stellte sich die Frage, ob die durch den chirurgischen Eingriff verursachte lokale Entzündungsreaktion der Leber zellulär vermittelt und/oder von der Aktivierung bestimmter Zellpopulationen begleitet wurde. Die Hauptmediatoren von entzündlichen Prozessen in der Leber sind HSC [75]. In ihrer ruhenden Form dienen sie vor allem der Speicherung von Vitamin A, werden aber durch verschiedene entzündliche Stimuli zu HMF aktiviert, die sich durch die Produktion von Proteinen der ECM sowie durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine auszeichnen [74,75]. Da unsere Arbeitsgruppe in Vorarbeiten bereits eine entscheidende Rolle für HSC beziehungsweise HMF in der Entstehung von Lebermetastasen nachweisen konnte [137–139], wurde zunächst überprüft, ob diese ebenfalls in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell eine Rolle spielen. Hier konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die lokale humorale Entzündungsreaktion der Lebern von operierten Mäusen mit einer Hochregulation einer Gensignatur assoziiert war, die auf eine Aktivierung von HMF hindeutet (**Abbildung 13**). Während in den ausschließlich laparotomierten Mäusen vornehmlich die Ratio zwischen α -SMA / Desmin mRNA Level erhöht war, war in den pankreatektomierten Mäusen die Ratio zwischen Col1A1/Desmin mRNA Level erhöht. Diese divergenten Ergebnisse lassen sich möglicherweise mit der Intensität des chirurgischen Traumas erklären: Der Eingriff der explorativen Laparotomie beinhaltet nur die Eröffnung der Bauchhöhle und ist daher von der Manipulation in der Bauchhöhle sowie von der Dauer des Eingriffes als geringeres Trauma anzusehen [196]. Daher kommt es bei einem solchen Eingriff vermutlich nur zu einer leichten inflammatorischen Reaktion, zwar charakterisiert durch

die Aktivierung von α -SMA⁺ HMF, aber ohne die Synthese des ECM-Proteins Collagen 1A1. Der Prozess der subtotalen Pankreatektomie hingegen stellt einen großen Eingriff dar, der mit erheblichen Manipulation des umliegenden Gewebes sowie mit Blutverlust einhergeht, so dass es möglich erscheint, dass diese Form von Trauma eine höhergradige Inflammation in der Leber auslöst, die mit der Synthese von ECM-Proteinen verbunden ist. Gegen diese Erklärung sprechen allerdings zwei Punkte: Zum einen lässt sich dieser Unterschied zwischen laparotomierten und pankreatektomierten Mäusen nicht auf humoraler Ebene beobachten (**Abbildung 12**), zum anderen sollte nach diesem Erklärungsansatz in pankreatektomierten Mäusen die Ratio zwischen α -SMA / Desmin ebenfalls hochreguliert sein. Dies war hier nicht der Fall (**Abbildung 13 B**). Gleichzeitig lässt sich letztere Beobachtung dadurch erklären, dass HMF bezüglich ihrer Aktivierungsmarker und Funktionen keine homogene Population darstellen, sondern sich im Gegenteil durch eine außerordentliche Heterogenität auszeichnen. In diesem Zusammenhang konnten Krenkel *et al.* mittels *Single Cell RNA-Sequencing* zeigen, dass während HSC bezüglich ihrer Genexpression eine homogene Population darstellen, HMF sich in verschiedene Cluster einteilen lassen, die sich bezüglich ihrer Expression von α -SMA und verschiedenen Kollagenen grundlegend unterscheiden [197]. Daher sind weitere Untersuchungen wie zum Beispiel Immunfluoreszenzfärbungen von HMF-assoziierten Aktivierungsmarkern in den Lebergeweben notwendig, um diesen Prozess genauer zu charakterisieren.

Trotz dieser divergenten Regulation ist aufgrund dieser Befunde grundsätzlich von einer Aktivierung von HMF im Zuge einer lokalen Entzündungsreaktion auszugehen. Diese Ergebnisse ergänzen die Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe: Lenk *et al.* konnten zeigen, dass in einem syngenem Mausmodell die Lebern älterer Mäuse einen höhergradigen Entzündungsstatus aufweisen als solche von jungen Mäusen, charakterisiert durch die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen sowie einer höheren Ratio von α -SMA/Desmin mRNA Spiegel. Interessanterweise zeigten DTC in den entzündlicheren Lebern der alten Mäuse auch ein vermehrtes Wachstum sowie eine gesteigerte Proliferation [139]. Auch in einem endogenen PDAC Mausmodell waren kleine, nicht proliferierende Lebermetastasen und DTC vor allem von HSC, größere, proliferierende Metastasen hingegen eher von HMF umgeben [139]. Während diese Studie vor allem den Einfluss von chronischer (alterungsbedingter) Entzündung beschreibt, die sich über Jahre beziehungsweise Jahrzehnte entwickelt, ist die Entzündung in unserer Studie mehr an ein auslösendes Ereignis gekoppelt. Trotzdem stützen

die Ergebnisse aus den verschiedenen Modellen unsere Hypothese, dass der Entzündungsstatus der Lebermikroumgebung wichtig für das Auswachsen von Lebermetastasen ist. Die Relevanz von HSC beziehungsweise HMF in diesem Zusammenhang konnten auch andere Arbeitsgruppen untermauern. Aiello *et al.* zeigten in einem endogenen PDAC Mausmodell (KPCY; Pdx1-cre, Kras^{LSL-G12D}, p53^{L/+}, Rosa^{YFP/YFP}), dass die Größe von PDAC Lebermetastasen, beginnend ab 2-10 Zellen, mit der Anzahl der umgebenden α -SMA+ Myofibroblasten sowie mit der Menge an Col1A1 korreliert [82]. Nielsen *et al.* konnte weiterhin mechanistisch aufklären, dass bereits PanINs Exosomen freisetzen, die in der Leber über Makrophagen HSC aktivieren, welche dann im Verlauf durch Produktion des ECM-Proteins Fibronectin eine prä-metastatische Nische etablieren [80]. Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Studien die Relevanz von HSC beziehungsweise HMF für die Ausbildung von PDAC Lebermetastasen in ihrer Funktion als Vermittler von entzündlichen Prozessen. Um zu untersuchen, inwiefern HSC und HMF ebenfalls eine Rolle in der Etablierung von Lebermetastasen in einer post-operativen Situation in Abhängigkeit von TRAIL-R2 spielen, wurde ein *in vitro* System genutzt, in dem PancTu-I Zellen mit oder ohne genetische Unterdrückung der TRAIL-R2 Expression zusammen mit HSC oder HMF kokultiviert wurden. Die Kokultur mit HSC diente in diesem Fall dazu, die (nicht entzündliche) *in vivo* Situation vor der Operation zu simulieren. Dieses Modell setzt voraus, dass PDAC Zellen bereits in einem sehr frühen Stadium metastasieren und in einer physiologischen Lebermikroumgebung ankommen, die charakterisiert durch HSC ist. Durch die chirurgische Resektion des Primärtumors wird eine lokale Entzündungsreaktion in der Leber hervorgerufen, die mit der Aktivierung von HMF einhergeht. Diese Situation wird durch die Kokultur mit HMF *in vitro* nachgestellt.

Mit diesem *in vitro* Kokulturmodell konnten wir zeigen, dass die Kokultur mit HMF im Gegensatz zur Kokultur mit HSC die Zellzahlen sowohl von PancTu-I shCtrl als auch PancTu-I shTR2 Zellen erhöht, wobei die Zellzahlen in PancTu-I shTR2 Zellen am geringsten waren (**Abbildung 14 A**). Diese Ergebnisse ließen sich vor allem der Steigerung der Proliferation von beiden Zellvarianten durch die Kokultur mit HMF zuschreiben. Interessanterweise zeigte sich hier jedoch auch, dass die Kokultur mit HSC die Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen im Vergleich zu PancTu-I shCtrl Zellen signifikant verringerte (**Abbildung 14 C**). Diese Ergebnisse zeigen eine deutliche Beeinflussung der Proliferation von PDAC Zellen in einer physiologischen, nicht entzündlichen Lebermikroumgebung in Abhängigkeit von TRAIL-R2. Diese Ergebnisse

stimmen mit denen von Lenk *et al.* überein, die nachweisen konnten, dass eine physiologische Mikroumgebung in Form von HSC zu einer verminderten Proliferation von PDAC Zellen führt. Zusätzlich konnte dieser Zellzustand weiter charakterisiert werden durch eine abgeflachte Morphologie, eine erniedrigte Expressionsratio von phosphoryliertem ERK zu phosphoryliertem p38 und einer erhöhten Aktivität der seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase. Diese Merkmale sind konform mit der Definition von dormanten Zellen und waren entsprechend nach Kokultur mit HMF reversibel [139,174]. Um zu überprüfen, ob diese HSC-vermittelte Kontrolle der Proliferation in PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression durch einen Entzündungsreiz aufgehoben werden kann, sollte der „*inflammatory switch*“ in Form eines chirurgischen Eingriffs *in vitro* simuliert werden. Dafür wurden die PDAC Zellen zuerst entsprechend der prä-operativen Situation mit HSC und anschließend entsprechend der post-operativen Situation mit HMF kultiviert. Im Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen *in vivo* reagierten PancTu-I shTR2 Zellen weniger auf den Wechsel von HSC zu HMF, so dass diese nach der HMF Kokultur wesentlich weniger vitale und proliferierende Zellen zeigten als PDAC Zellen mit TRAIL-R2 Expression (**Abbildung 16**). Unsere Studie ergänzt die Befunde von Lenk *et al.* dadurch, dass TRAIL-R2 ein wichtiger Wachstumsvorteil für PDAC Zellen in der nicht-entzündlichen Lebermikroumgebung ist, da seine Anwesenheit es den Tumorzellen ermöglicht, dem HSC-vermittelten Ruhestadium zu entkommen. Für die Reversibilität dieses Stadiums durch HMF scheint TRAIL-R2 keine besondere Rolle einzunehmen, da die Proliferation nach HMF Kokultur in PDAC Zellen mit und ohne TRAIL-R2 vergleichbar war (**Abbildung 14**).

Welche mechanistische Rolle TRAIL-R2 in der HSC-vermittelten Unterdrückung der Proliferation spielt, lässt sich nur spekulieren. Sosa *et al.* identifizierten *RAR-related orphan receptor beta* (NR2F1) als einen der Schlüsselfaktoren, welcher das Dormanz-Programm in Kopf-Hals-Tumorzellen steuert und auch in Brustkrebspatienten dormante DTC charakterisiert [198,199]. NR2F1 ist ein Rezeptor, welcher durch Retinsäuren aktiviert wird, eine Stoffwechselproduktgruppe von Vitamin A [200]. In dormanten Krebszellen bewirkt die Aktivierung von NR2F1 die Inhibition von Proliferation und die Hochregulierung einer Dormanz-Gensignatur bestehend aus pluripotenz-assoziierten Genen *Sex determining region Y-box 9*, *Retinoic acid receptor β* und *NANOG* [199]. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass in PDAC Zellen die Expression von *NANOG* nach Kokultur mit Hepatozyten und HSC

höher ist als in PDAC Zellen kokultiviert mit Hepatozyten und HMF [137]. Weiterhin zeigten vorläufige Daten dieser Studie, dass die NANOG Expression in PancTu-I shTR2 gegenüber PDAC Zellen mit TRAIL-R2 Expression nach Kokultur mit HSC vermehrt zu detektieren war (Daten nicht gezeigt). Da HSC eine der Hauptspeicherzellen für Vitamin A und Retinsäuren sind, könnte die Aktivierung des Dormanzprogramms über NR2F1 in PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression durch die Stimulation mit Retinsäuren aus HSC-vermittelt sein.

Grundsätzlich ergibt sich aus den vorliegenden Befunden die Fragestellung, wie die Kontrolle der hepatischen Mikroumgebung über das Wachstumsverhalten der PDAC Zellen mit unterschiedlichem TRAIL-Rezeptorstatus vermittelt wird. Da wir ein indirektes Kokultursystem verwenden, finden keine direkten Zell-Zell-Kontakte statt, sondern die Interaktion der beiden Zellpopulationen ist nur über lösliche Faktoren möglich. Diese wurden mittels eines Multiplex-Assays analysiert. Mit dieser Untersuchung konnten IL-6 und IL-8 als Faktoren identifiziert werden, deren Sekretionsmuster negativ mit dem Wachstumsmuster von PancTu-I shTR2 Zellen nach Kokultur korrelierte (**Abbildung 17**). Dementsprechend war die IL-8 Sekretion in PancTu-I shTR2 nach Kokultur mit HSC am höchsten. In diesen Zellen konnte das Blockieren von IL-8 mit einem neutralisierenden Antikörper in Folge auch die HSC-vermittelte Proliferationsminderung im Vergleich mit PancTu-I shCtrl Zellen nach HSC Kokultur wieder komplett revertieren (**Abbildung 18**). Diese Ergebnisse identifizieren IL-8 als einen löslichen Faktor, welcher in PDAC Zellen mit unterdrücktem TRAIL-R2 ein dormanz-ähnliches Ruhestadium induziert. Auch diese Befunde stehen im Einklang mit denen von Lenk *et al.*, dessen Studie ebenfalls IL-8 als einen Induktor der HSC-vermittelten Dormanz in PDAC Zellen beschreiben konnte [139]. Auch ein Zusammenhang zwischen der Sekretion von IL-8 und dem TRAIL-Rezeptorsystem ist bereits bekannt: Trauzold *et al.* konnten zeigen, dass die Stimulation von PDAC Zelllinien mit TRAIL die Expression von IL-8 deutlich erhöht [114]. In vertiefenden Studien konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die IL-8 Sekretion im PDAC vor allem durch die Aktivierung von NF- κ B durch TRAIL-R1 und nicht TRAIL-R2 vermittelt wird [158,161,201]. Die Erklärung, dass die beobachtete Hochregulierung der IL-8 Expression in TRAIL-R2 unterdrückten PDAC Zellen durch TRAIL-R1 vermittelt wird, wird untermauert durch die Befunde, dass TRAIL-R1 in diesen Zellen nach HSC Kokultur hochreguliert wird, und zwar sowohl höher als die TRAIL-R1 Expression in PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression nach Kokultur mit HMF als auch höher

als die TRAIL-R1 Expression von nicht genetisch modifizierten PDAC Zellen nach HSC Kokultur (**Abbildung 15 A**). Dieser Mechanismus würde in PDAC Zellen, die vorwiegend TRAIL-R1 statt TRAIL-R2 exprimieren, die Proliferation innerhalb der Lebermikroumgebung behindern und somit TRAIL-R1 eine anti-tumorigene Funktion in diesem Kontext zuschreiben. Tatsächlich konnte die Expression von TRAIL-R1 in einem PDAC Patientenkollektiv als ein positiv prognostischer Marker identifiziert werden [202], während TRAIL-R2 vor allem mit einer schlechten Prognose in Patienten mit einem PDAC im UICC Stadium 2 korreliert [116]. Weiterhin wird dieses Erklärungsmodell durch die klinische Beobachtung von Yang et al. gestützt, dass auch postoperativ erhöhte IL-8 Konzentrationen mit einer verbesserten Prognose und einem verlängerten Gesamtüberleben in R0-resezierten PDAC Patienten korreliert [203]. Zusammengefasst führen diese Befunde zu folgendem Modell: HSC unterdrücken die Proliferation von PDAC Zellen, was durch IL-8 vermittelt wird und welches wiederum TRAIL-R1 abhängig von Tumorzellen sezerniert wird. Da in Abwesenheit von TRAIL-R2 und nach HSC Kokultur vermehrt TRAIL-R1 exprimiert wird, ist dieser Effekt in PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression verstärkt. In Umkehr bedeutet dies, dass die Hochregulation und Expression von TRAIL-R2 in PDAC Zellen einen Mechanismus darstellt, durch den PDAC Zellen sich der HSC-vermittelten Wachstumskontrolle entziehen können. Da das in dieser Studie verwendete Kokultursystem aus murinen HSC beziehungsweise HMF sowie humanen PDAC Zellen besteht, konnte das hier detektierte IL-8 den humanen PDAC Zellen zugeordnet werden. Da die Regulation der IL-8 Sekretion abhängig von den verschiedenen Kokultur-Bedingungen war, ist zu vermuten, dass diese durch einen bis jetzt unbekannten, durch die HSC sezernierten Faktor induziert wird, wodurch dann ein positiver *Feedback-Loop* in Gang gesetzt wird. Da sowohl gezeigt werden konnte, dass HSC TRAIL exprimieren und sezernieren [204] als auch, dass murines TRAIL – wenn gleich mit geringerer Affinität – in der Lage ist, die humanen TRAIL-Rezeptoren zu aktivieren [205], könnte HSC-sezerniertes TRAIL der anstoßende Faktor sein. Auch wenn dies einen möglichen Erklärungsansatz darstellt, muss an dieser Stelle diskutiert werden, dass ein murin-humanes Kokultursystem neben seinen Vorteilen gewisse Nachteile hat. Wie oben erwähnt erlaubt es, auf einfache und saubere Art und Weise die Herkunft von Zytokinen anhand der Spezies genau einer Zellpopulation zuzuordnen. Gleichzeitig schränkt diese Tatsache die Übertragbarkeit und Funktionalität dieses Modells ein, da für einige murine Zytokine keine Bindungsmöglichkeit an den

korrespondierenden humanen Rezeptoren besteht, und umgekehrt. Die Relevanz von humanem IL-8 als Dormanz vermittelnder Faktor konnte jedoch in der Arbeit von Lenk *et al.* auch in einer Kokultur mit humanen HSC validiert werden [139].

Nachdem mit IL-8 ein Faktor identifiziert werden konnte, der verantwortlich ist für die Kontrolle der Proliferation von PancTu-I shTR2 in einer prä-operativen (physiologischen) Leberumgebung, wurde als nächstes der Frage nachgegangen, welcher Faktor in der Lage ist, in wachstums-arretierten Zellen post-operativ die Proliferation wieder anzuregen. Da die Kokultur mit HMF als Simulation für die Situation in der Leber nach der chirurgischen Resektion des Primärtumors diene, lag TNF- α als vielversprechender Kandidat nahe, da es *in vivo* signifikant erhöht in den Lebern operierter Mäuse zu detektieren war (**Abbildung 12**). Zusätzlich konnten Egberts *et al.* bereits im selben Tiermodell zeigen, dass die Inhibition von TNF- α mit den klinisch validierten Antikörpern Etanercept und Infliximab die Anzahl an Lokalrezidiven sowie Lebermetastasen nach Resektion des Primärtumor effektiv verringert [162]. TNF- α wurde daher in Kokulturen von HMF und PDAC Zellen mit und ohne TRAIL-R2 Expression durch den neutralisierenden Antikörper Etanercept inhibiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass TNF- α spezieübergreifend an die murinen beziehungsweise humanen Rezeptoren bindet und dort auch aktiv ist [205], und dass Etanercept humanes und murines TNF- α inhibiert. Während die Blockade mit Etanercept in PDAC Zellen mit TRAIL-R2 Expression die Proliferation sogar steigerte, zeigte sich in Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression eine gegenteilige Veränderung (**Abbildung 19 B**). Insgesamt konnten hier keine kongruenten Effekte beobachtet werden, so dass TNF- α offenbar nicht der proliferations-fördernde Faktor unter HMF Kokultur ist. (**Abbildung 19 A**). Diese Befunde stehen nicht zwangsläufig im Gegensatz zu den *in vivo* erhobenen Ergebnissen von Egberts *et al.* [162]. Während in unserer Studie nur die Relevanz von TNF- α im Kontext der Kokultur mit HMF in Bezug auf die Proliferation untersucht wurde, ist es gut möglich, dass die von Egberts *et al.* beobachtete Inhibition der Lebermetastasierung durch Etanercept auf andere Wirkungsbeziehungen oder Mechanismen zurückzuführen ist. Denkbar wäre zum Beispiel, dass die Inhibition von TNF- α die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an das Leberendothel verringert und somit das Ankommen der Tumorzellen im Sekundärorgan unterbindet, wie dies *in vitro* bereits gezeigt worden ist [206,207]. Eine andere Erklärung für die Divergenz zwischen den *in vivo* Befunden von Egberts *et al.* und den *in vitro* Befunden unserer Studie ist, dass die Inhibition von TNF- α zwar keinen relevanten Einfluss auf die Proliferation hat,

aber möglicherweise stammzell-assoziierte Eigenschaften in den Tumorzellen unterdrückt, für die ebenfalls eine Relevanz für das Auswachsen von Metastasen nachgewiesen worden ist [208,209]. In der Tat konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass stammzell-assoziierte Eigenschaften sowie ein mesenchymalen Phänotyp von PDAC Zellen durch die Inhibition von TNF- α teilweise inhibiert werden können [137]. Gegen eine Funktion von TNF- α als lebermetastasierungs-fördernder Faktor spricht hingegen, dass post-operativ erhöhte TNF- α Spiegel in R0-resezierten PDAC Patienten mit einem verbesserten Gesamtüberleben korrelieren [203]. Insgesamt ist die Rolle von TNF- α in der Lebermetastasierung des PDAC nicht eindeutig und scheint sehr komplex zu sein.

Da in der Studie von Yang *et al.* erhöhte VEGF Konzentrationen im Serum von PDAC resezierten Patienten mit einem schlechteren Gesamtüberleben korrelierten [203] und für VEGF weiterhin bereits eine proliferations-induzierende Wirkung auf PDAC Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung gezeigt werden konnte [139], wurde als nächstes die Expression von murinem VEGF in HSC und HMF untersucht. Tatsächlich zeigten HMF höhere VEGF mRNA Spiegel als HSC, und zwar unabhängig von der Kokultur mit den unterschiedlichen PDAC Zell-Varianten (**Abbildung 20 A**). Daher wurde der Einfluss einer Antikörper-vermittelten Inhibition von VEGF auf das Wachstumsverhalten der PDAC Zellen mit oder ohne TRAIL-R2 Expression in Kokultur mit HMF untersucht. In der Tat verursachte die Applikation von Aflibercept eine Verringerung der Vitalzellzahl (**Abbildung 20 B**) sowie der Proliferation (**Abbildung 20 C**) in beiden PDAC Zelllinien nach Kokultur mit HMF. Somit war dieser Effekt weitestgehend unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus der PDAC Zellen, so dass postuliert werden kann, dass HMF post-operativ die Proliferation von PDAC Zellen durch VEGF vermittelt anregen, dies aber im Gegensatz zu den IL-8 vermittelten Effekten nicht durch den TRAIL-Rezeptorstatus beeinflusst wird. Im Einklang damit war VEGF auch erhöht in den Lebern von operierten Mäusen im Vergleich zu unoperierten Mäusen (**Abbildung 12**), wenn auch nur in geringem Ausmaß. Die Übertragung der *in vitro* Befunde auf die *in vivo* Situation ist jedoch nur bedingt möglich, da VEGF aufgrund seiner pro-angiogenetischen Funktion seine Wirkung auf das Tumorwachstum in einem komplexen Organismus auf vielfache Weise entfaltet, als es *in vitro* moduliert werden kann. Die Inhibition von VEGF durch neutralisierende Antikörper wie Bevacizumab oder Aflibercept hat schon seit einiger Zeit erfolgreich den Eingang in die therapeutische Anwendung bei verschiedenen Tumorentitäten gefunden [167,169,210,211], wobei

deren Wirkung vor allem auf die verminderte Bindung von VEGF an seinen Rezeptor auf Endothelzellen zurückgeführt wird, wodurch die Neovaskularisierung des Tumors unterbunden wird [170,212]. Darüber hinaus sind mittlerweile weitere Mechanismen bekannt, durch die VEGF angiogenese-unabhängig die Tumorprogression fördert, so dass nicht auszuschließen ist, dass die klinische Wirkung auch auf die Inhibition dieser Effekte zurückzuführen ist. Dennoch zeigte der Einsatz von VEGF-Inhibitoren in der Behandlung des PDAC bisher keine Erfolge: Weder die Kombination aus Gemcitabine + Bevacizumab noch Gemcitabine + Aflibercept verbesserte das Gesamtüberleben oder das progressionsfreie Überleben in Patienten mit einem fortgeschrittenen PDAC [213,214]. Diese Befunde stehen allerdings nicht zwangsläufig im Gegensatz zu den hier und in der Studie von Lenk *et al.* präsentierten Ergebnissen. In den oben genannten klinischen Studien [213,214] wurde ausschließlich die Applikation von VEGF-Inhibitoren bei PDAC Patienten untersucht, die bereits ein metastasiertes Stadium aufweisen. Unsere Ergebnisse deuten auf einen therapeutischen Nutzen zu einem viel früheren Zeitpunkt als adjuvante Therapie nach R0-Resektion hin, um das Auswachsen von Lebermetastasen zu unterbinden (wenn klinisch noch keine Lebermetastasen detektierbar sind). Dieser Therapie-Ansatz zielt eher darauf ab, das Auswachsen von klinisch manifesten Metastasen zu unterbinden, als die im Körper verbliebenen Tumorzellen alle abzutöten.

Zusammengefasst deuten die bisherigen Befunde darauf hin, dass eine physiologische (prä-operative) Lebermikroumgebung IL-8 vermittelt in PDAC Zellen ohne TRAIL-R2 Expression einen Wachstumsarrest induzieren kann. Die Hochregulation der TRAIL-R2 Expression stellt dabei offenbar einen Mechanismus dar, sich der Stroma-vermittelten Wachstumskontrolle zu entziehen. Ferner deuten die Befunde darauf hin, dass HMF in einer entzündlichen (post-operativen) Lebermikroumgebung VEGF-vermittelt das Ruhestadium in den PDAC Zellen zu revertieren und die Proliferation zu steigern scheinen. PDAC Zellen, die vermindert TRAIL-R2 exprimieren, wachsen unter diesen Bedingungen zwar ähnlich gut wie PDAC Zellen mit TRAIL-R2 Expression, haben allerdings dadurch, dass sie unter physiologischen Bedingungen einen Wachstumsnachteil erfahren haben, einen Wachstumsrückstand und wachsen daher *in vivo* langsamer zu sichtbaren Metastasen aus beziehungsweise verharren länger im Stadium einer okkulten Mikrometastase.

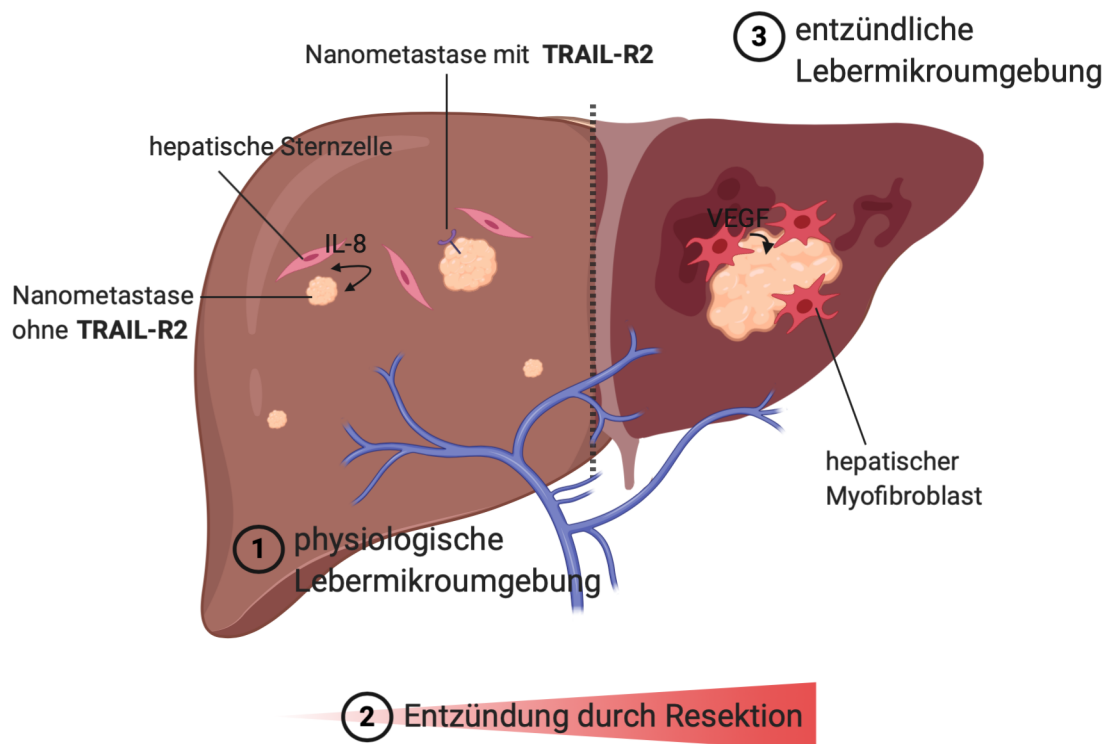


Abbildung 21: Vorgeschlagenes grafisches Modell der Interaktion von PDAC Zellen mit verschiedener TRAIL-R2 Expression und der physiologischen bzw. entzündlichen Leberumgebung. (1) In einer physiologischen Leberumgebung, charakterisiert durch HSC, wird in PDAC Nanometastasen IL-8 vermittelt ein Wachstumsarrest induziert. Nanometastasen, die TRAIL-R2 exprimieren, können sich diesem eher entziehen, als solche, die den Rezeptor nicht exprimieren. (2) Durch die Resektion des Primärtumors wird eine Entzündungsreaktion in der Leber verursacht, welche die Leber entzündlich verändert. (3) Diese entzündliche Veränderung geht einher mit der Aktivierung von HSC zu HMF. Diese fördern das Auswachsen der PDAC Metastasen durch die Sekretion von VEGF, unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus.

6 Ausblick

Diese Studie erweitert das Verständnis über die Formation von Lebermetastasen des PDAC im Zeitraum nach Resektion des Primärtumors. Es wurde gezeigt, dass die Operation eine lokale Entzündungsantwort in der Leber induziert und dass das Auswachsen von Lebermetastasen in diesem Modell in Abhängigkeit von TRAIL-R2 ist. *In vitro* zeigte sich, dass HSC, repräsentativ für eine physiologische Lebermikroumgebung vor der Operation, das Wachstum der Tumorzellen IL-8 abhängig unterdrückt und dass dieser Vorgang in Abwesenheit von TRAIL-R2 verstärkt ist. HMF, repräsentativ für eine postoperative, entzündliche Lebermikroumgebung, hingegen können diese Wachstumsbeschränkung durch Sekretion von VEGF wieder aufheben. Für das funktionelle Verständnis der Rolle der durch post-operative Entzündung geförderten Lebermetastasierung bleiben allerdings einige Fragen offen. Zum einen blieb in unserer Studie der Einfluss des adaptiven Immunsystems vollständig unberücksichtigt. Um dies aufzuklären, wäre es sinnvoll die *in vivo* Resektionsversuche in einem syngen Mausmodell durchzuführen. Hierfür könnte die murine PDAC Zelllinie R254 mit genetischer Unterdrückung des murinen TRAIL-Rezeptor 1/2 (mTRAIL-R) beziehungsweise ohne modifizierten TRAIL-Rezeptor orthotop in das Pankreas von immunkompetenten C57BL/6J Mäusen inokuliert werden, auch wenn sich hier - im Gegensatz zu unserem Modell - nicht der einzelne Beitrag der verschiedenen TRAIL-Rezeptoren deziert untersuchen ließe. Nach Resektion würde es sich anbieten, die Immuninfiltration zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Immunfluoreszenzfärbung in den Lebern zu untersuchen und deren räumliche Beziehung zu den Lebermetastasen zu beschreiben. Da in dieser Studie im klinisch-adaptierten Resektionsversuch keine tumortragenden, sondern nicht operierten Mäuse als Kontrolle mitgeführt wurden, um den Einfluss der Operation auf den Entzündungsstatus der Lebern sowie auf das Auswachsen der Metastasen zu beschreiben, sollten parallel im syngen Modell auch tumortragende Kontroll-Mäuse ohne Resektion des Primärtumors gehalten werden. Da bereits beschrieben ist, dass die genetische Unterdrückung von mTRAIL-R in einem endogenen PDAC-Modell die Tumorprogression verlangsamt und dadurch zwangsläufig die Metastasierung verringert [115], könnte gezielt der Einfluss des TRAIL-Rezeptorstatus im Kontext der Lebermikroumgebung untersucht werden, in dem durch Verwendung eines etablierten *in vivo* Metastasierungsmodells diese ersten Schritte der metastatischen Kaskade ausgeklammert werden [79,80]. Hierfür würden

dieselben murinen PDAC Zellen mit oder ohne genetischer Unterdrückung von mTRAIL-R in die Milz von C57BL/6J Mäusen inokuliert werden, da diese so auf direktem Wege in die Leber metastasieren. Anschließend würden die Mäuse einer Operation unterzogen oder unoperiert bleiben, um eine Leberentzündung zu induzieren oder nicht. Auch hier sollte die Entzündungsreaktion der Leber auf 1. humoraler und 2. zellulärer Ebene mittels Bestimmung von Entzündungsmarkern durch Multiplex-Analyse und Immunfluoreszenzfärbungen von verschiedenen Immunzellpopulationen untersucht werden. In beiden Modellen könnte der Einfluss einer adjuvanten Behandlung mit entzündungshemmenden Medikamenten und/oder Aflibercept auf das Auswachsen der Metastasen getestet werden, um die Hypothese, dass die Entzündungsreaktion der Leber und VEGF spezifisch das Auswachsen der Metastasen fördern, zu überprüfen. In den Lebern der Tiere wäre die Färbung von verschiedenen Dormanzmarkern wie NR2F1, sowie von TRAIL-R4 eine sinnvolle Ergänzung, um die dormanten PDAC Zellen näher zu charakterisieren.

Um die Ergebnisse dieser Studie sowie der weiteren vorgeschlagenen Untersuchungen im Menschen zu validieren, könnten in humanen Lebermetastasen verschiedener Größe zum einen die Präsenz von HSC bzw. HMF bestimmt werden, zum anderen könnte die Größe der Metastasen mit der Menge und prozentualen Verteilung an TRAIL-R2 korreliert werden, um zu überprüfen, ob kleine Metastasen weniger TRAIL-R2 exprimieren als größere. Weiterhin wäre es sinnvoll, die TRAIL-R2 Expression im Primärtumor bei Resektion mit der Zeit bis zum Auftreten von Lebermetastasen zu korrelieren. Insgesamt sollte das Ziel dieser und weiterer Untersuchungen sein, wirksame Therapien für Patienten mit einem metastasierten Pankreaskarzinom zu entwickeln, die sich nicht nur wie bisher gegen den Geno- und Phänotyp der Tumorzellen im Primärtumor richten, sondern auch gegen den der Tumorzellen in Metastasen, sowie die tumor-assoziierte Entzündung zu unterdrücken.

7 Zusammenfassung

Das duktale Pankreasadenokarzinom (PDAC) ist die vierthäufigste Ursache krebsbedingter Todesfälle. Es wird meist in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem bereits Fernmetastasen vorhanden sind. Diese Patienten sind einer potentiell kurativen chirurgischen Resektion des Primärtumors nicht mehr zugänglich, so dass die palliative Therapie die einzige Behandlungsmöglichkeit darstellt. Doch selbst jene Patienten, die bei Diagnosestellung keine Streuung aufweisen und deren Primärtumor im Gesunden entfernt wird, entwickeln überwiegend noch während der adjuvanten Chemotherapie oder nur wenige Monate danach lokale Rezidive oder Metastasen.

Das Hauptmetastasierungsorgan des PDAC ist die Leber. Das Auswachsen von Lebermetastasen in der Leber wird erheblich durch die Interaktion mit der lokalen Mikroumgebung beeinflusst und der Entzündungszustand der Leber ist in diesem Zusammenhang eine wichtige Determinante. Welche Veränderungen der hepatischen Mikroumgebung das Auswachsen von Lebermetastasen nach Resektion des Primärtumors bedingen ist allerdings noch unklar.

Das TRAIL-Rezeptorsystem bestehend aus verschiedenen Rezeptoren sowie dem Liganden TRAIL ist neben seiner physiologischen Bedeutung für die Induktion des Zelltods auch an verschiedenen tumorfördernden Prozessen beteiligt. Während für TRAIL-Rezeptor 2 (TRAIL-R2) bereits eine Rolle in der Metastasierung des PDAC nachgewiesen werden konnte, ist seine Relevanz für das Auswachsen von Tumorzellen in der Leber noch ungeklärt.

Da sowohl die Lebermikroumgebung als auch TRAIL-R2 wichtige Determinanten für die Lebermetastasierung des PDAC sind, ihre Interaktion aber weitestgehend unverständlich ist, wurde dies im zeitlichen Zusammenhang der post-operativen Metastasierung des PDAC untersucht. Diese Lebermetastasierung des PDAC wurde in einem klinisch adaptierten Mausmodell untersucht. Nach Resektion des Primärtumors in diesem Modell bildeten PDAC Zellen mit unterdrückter TRAIL-R2 Expression weniger makroskopische Lebermetastasen als unveränderte PDAC Zellen. Überraschenderweise zeigten die Lebern von PDAC Zellen mit verminderter TRAIL-R2 Expression jedoch eine erhöhte Anzahl von disseminierten Tumorzellen und Nanometastasen, welche ebenfalls weniger proliferativ aktiv waren. Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass die Resektion des Primärtumors eine starke humorale

Entzündungsreaktion in der Leber hervorruft, welche mit der Aktivierung von hepatischen Sternzellen einherging. Um den Einfluss der prä-operativen, physiologischen, sowie der post-operativen, entzündlichen Lebermikroumgebung auf das Auswachsen der PDAC Zellen mit verschiedener TRAIL-R2 Expression *in vitro* zu untersuchen, wurden PDAC Zellen mit hepatischen Sternzellen (HSC) sowie ihrer aktivierten Form hepatischen Myofibroblasten (HMF) kokultiviert. In Gegenwart von HSC war die Proliferation von PDAC Zellen mit vermindertem TRAIL-R2 signifikant verringert als die von Kontroll PDAC Zellen, während in Kokultur mit HMF beide gleich stark proliferierten. Um die entzündliche Veränderung der Leber durch die Operation *in vitro* zu simulieren, wurde ein Wechsel der Kokultur von HSC zu HMF untersucht. Die verminderte Proliferation von PDAC Zellen mit vermindertem TRAIL-R2 persistierte auch nach verlängerter Kokultur mit HMF. Diese Wachstumskontrolle von PDAC-Zellen mit vermindertem TRAIL-R2 durch die physiologische Lebermikroumgebung, charakterisiert durch HSC, konnte durch die Blockierung von IL-8 aufgehoben werden. Gleichzeitig konnte VEGF als Mediator der nach HMF Kokultur induzierten Steigerung der Proliferation identifiziert werden, welche unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus beobachtet wurde. Zusammengefasst zeigt diese Arbeit auf, dass die Resektion des Primärtumors eine lokale Entzündungsreaktion der Leber bedingt. Die Interaktion der physiologischen bzw. entzündlichen Lebermikroumgebung mit TRAIL-R2 exprimierenden PDAC Zellen beeinflusst das Auswachsen dieser als Lebermetastasen.

8 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. *Bericht zum Krebsgeschehen Deutschl.* **2016**, 16–77.
2. Kleeff, J.; Korc, M.; Apte, M.; La Vecchia, C.; Johnson, C.D.; Biankin, A. V.; Neale, R.E.; Tempero, M.; Tuveson, D.A.; Hruban, R.H.; Neoptolemos, J.P. Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, 2, 16022.
3. Rahib, L.; Smith, B.D.; Aizenberg, R.; Rosenzweig, A.B.; Fleshman, J.M.; Matrisian, L.M. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states. *Cancer Res.* **2014**, 74, 2913–2921.
4. Castellanos, J.A.; Merchant, N.B. Intensity of Follow-up after Pancreatic Cancer Resection. *Ann. Surg. Oncol.* **2014**, 21, 747–751.
5. Sternheim, E.T.; Voigt, J.; Kaspar, W.; Dippold, W.G. Das Pankreaskarzinom. *Internist* **2000**, 41, 848–859.
6. Seufferlein, T.; Porzner, M.; Becker, T.; Budach, V.; Ceyhan, G.; Esposito, I.; Fietkau, R.; Follmann, M.; Friess, H.; Galle, P.; Geiler, M.; Glanemann, M.; Gress, T.; Heinemann, V.; Hohenberger, W.; Hopt, U.; Izbicki, J.; Klar, E.; Kleeff, J.; Kopp, I.; Kullmann, F.; Langer, T.; Langrehr, J.; Lerch, M.; Löhr, M.; Lüttges, J.; Lutz, M.; Mayerle, J.; Michl, P.; Möller, P.; Molls, M.; Münter, M.; Nothacker, M.; Oettle, H.; Post, S.; Reinacher-Schick, A.; Röcken, C.; Roeb, E.; Saeger, H.; Schmid, R.; Schmiegel, W.; Schoenberg, M.; Siveke, J.; Stuschke, M.; Tannapfel, A.; Uhl, W.; Unverzagt, S.; Van Oorschot, B.; Vashist, Y.; Werner, J.; Yekebas, E. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0.
7. Sperti, C.; Pasquali, C.; Piccoli, A.; Pedrazzoli, S. Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J. Surg.* **1997**, 21, 195–200.
8. He, J.; Ahuja, N.; Makary, M.A.; Cameron, J.L.; Eckhauser, F.E.; Choti, M.A.; Hruban, R.H.; Pawlik, T.M.; Wolfgang, C.L. 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: Trends over three decades. *HPB* **2014**, 16, 83–90.
9. Zheng, B.; Ohuchida, K.; Yan, Z.; Okumura, T.; Ohtsuka, T.; Nakamura, M. Primary Recurrence in the Lung is Related to Favorable Prognosis in Patients

- with Pancreatic Cancer and Postoperative Recurrence. *World J. Surg.* **2017**, 1–9.
10. Klein, A.P.; Hruban, R.H.; Brune, K.A.; Petersen, G.M.; Goggins, M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J.* **2001**, 7, 266–273.
 11. Iqbal, J.; Ragone, A.; Lubinski, J.; Lynch, H.T.; Moller, P.; Ghadirian, P.; Foulkes, W.D.; Armel, S.; Eisen, A.; Neuhausen, S.L.; Senter, L.; Singer, C.F.; Ainsworth, P.; Kim-Sing, C.; Tung, N.; Friedman, E.; Llacuachqui, M.; Ping, S.; Narod, S.A. The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br. J. Cancer* **2012**, 107, 2005–2009.
 12. Lowenfels, A.B.; Maisonneuve, P.; DiMagno, E.P.; Elitsur, Y.; Gates, J.L.K.; Perrault, J.; Whitcomb, D.C. Hereditary Pancreatitis and the Risk of Pancreatic Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1997**, 89, 442–446.
 13. Giardiello, F.M.; Brensinger, J.D.; Tersmette, A.C.; Goodman, S.N.; Petersen, G.M.; Booker, S. V.; Cruz-Correa, M.; Offerhaus, J.A. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* **2000**, 119, 1447–1453.
 14. Lucenteforte, E.; La Vecchia, C.; Silverman, D.; Petersen, G.M.; Bracci, P.M.; Ji, B.T.; Bosetti, C.; Li, D.; Gallinger, S.; Miller, A.B.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Talamini, R.; Polesel, J.; Ghadirian, P.; Baghurst, P.A.; Zatonski, W.; Fontham, E.; Bamlet, W.R.; Holly, E.A.; Gao, Y.T.; Negri, E.; Hassan, M.; Cotterchio, M.; Su, J.; Maisonneuve, P.; Boffetta, P.; Duell, E.J. Alcohol consumption and pancreatic cancer: A pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann. Oncol.* **2012**, 23, 374–382.
 15. Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Silverman, D.T.; Petersen, G.; Bracci, P.M.; Ji, B.T.; Negri, E.; Li, D.; Risch, H.A.; Olson, S.H.; Gallinger, S.; Miller, A.B.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; Talamini, R.; Polesel, J.; Ghadirian, P.; Baghurst, P.A.; Zatonski, W.; Fontham, E.; Bamlet, W.R.; Holly, E.A.; Bertuccio, P.; Gao, Y.T.; Hassan, M.; Yu, H.; Kurtz, R.C.; Cotterchio, M.; Su, J.; Maisonneuve, P.; Duell, E.J.; Boffetta, P.; La Vecchia, C. Cigarette smoking and pancreatic cancer: An analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PANC4). *Ann. Oncol.* **2012**, 23, 1880–1888.
 16. Genkinger, J.M.; Kitahara, C.M.; Bernstein, L.; Berrington de Gonzalez, A.; Brotzman, M.; Elena, J.W.; Giles, G.G.; Hartge, P.; Singh, P.N.; Stolzenberg-Solomon, R.Z.; Weiderpass, E.; Adami, H.-O.; Anderson, K.E.; Beane-Freeman, L.E.; Buring, J.E.; Fraser, G.E.; Fuchs, C.S.; Gapstur, S.M.; Gaziano, J.M.;

- Helzlsouer, K.J.; Lacey, J. V.; Linet, M.S.; Liu, J.J.; Park, Y.; Peters, U.; Purdue, M.P.; Robien, K.; Schairer, C.; Sesso, H.D.; Visvanathan, K.; White, E.; Wolk, A.; Wolpin, B.M.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Jacobs, E.J. Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 2257–2266.
17. Raimondi, S.; Lowenfels, A.B.; Morselli-Labate, A.M.; Maisonneuve, P.; Pezzilli, R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; Aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2010**, *24*, 349–358.
 18. Behrens, G.; Jochem, C.; Schmid, D.; Keimling, M.; Ricci, C.; Leitzmann, M.F. Physical activity and risk of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Epidemiol.* **2015**, *30*, 279–298.
 19. Bosetti, C.; Bravi, F.; Turati, F.; Edefonti, V.; Polesel, J.; Decarli, A.; Negri, E.; Talamini, R.; Franceschi, S.; La, C.; Zeegers, M.P. Nutrient-based dietary patterns and pancreatic cancer risk. *Ann. Epidemiol.* **2013**, *23*, 124–128.
 20. Bosetti, C.; Rosato, V.; Li, D.; Silverman, D.; Petersen, G.M.; Bracci, P.M.; Neale, R.E.; Muscat, J.; Anderson, K.; Gallinger, S.; Olson, S.H.; Miller, A.B.; Bas Bueno-de-Mesquita, H.; Scelo, G.; Janout, V.; Holcatova, I.; Lagiou, P.; Serraino, D.; Lucenteforte, E.; Fabianova, E.; Ghadirian, P.; Baghurst, P.A.; Zatonski, W.; Foretova, L.; Fontham, E.; Bamlet, W.R.; Holly, E.A.; Negri, E.; Hassan, M.; Prizment, A.; Cotterchio, M.; Cleary, S.; Kurtz, R.C.; Maisonneuve, P.; Trichopoulos, D.; Polesel, J.; Duell, E.J.; Boffetta, P.; La Vecchia, C. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, 2065–2072.
 21. Hezel, A.F.; Kimmelman, A.C.; Stanger, B.Z.; Bardeesy, N.; Depinho, R. a Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **2006**, *1*, 1218–1249.
 22. Slack, J.M. Developmental biology of the pancreas. *Development* **1995**, *121*, 1569 LP – 1580.
 23. Becker, A.E.; Hernandez, Y.G.; Frucht, H.; Lucas, A.L. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 11182–11198.
 24. Distler, M.; Aust, D.; Weitz, J.; Pilarsky, C.; Grützmann, R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res. Int.* **2014**,

- 2014.
25. Strobel, O.; Dor, Y.; Alsina, J.; Stirman, A.; Lauwers, G.; Trainor, A.; Castillo, C.F. Del; Warshaw, A.L.; Thayer, S.P. In Vivo Lineage Tracing Defines the Role of Acinar-to-Ductal Transdifferentiation in Inflammatory Ductal Metaplasia. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1999–2009.
 26. De La O, J.-P.; Emerson, L.L.; Goodman, J.L.; Froebe, S.C.; Illum, B.E.; Curtis, A.B.; Murtaugh, L.C. Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 18907–18912.
 27. Reichert, M.; Blume, K.; Kleger, A.; Hartmann, D.; Von Figura, G. Developmental Pathways Direct Pancreatic Cancer Initiation from Its Cellular Origin. *Stem Cells Int.* 2016, 2016.
 28. Hruban, R.H.; Takaori, K.; Klimstra, D.S.; Adsay, N.V.; Albores-Saavedra, J.; Biankin, A. V.; Biankin, S.A.; Compton, C.; Fukushima, N.; Furukawa, T.; Goggins, M.; Kato, Y.; Kloppel, G.; Longnecker, D.S.; Luttges, J.; Maitra, A.; Offerhaus, G.J.A.; Shimizu, M.; Yonezawa, S. An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* **2004**, *28*, 977–987.
 29. Ott, C.; Heinmöller, E.; Gaumann, A.; Schölmerich, J.; Klebl, F. Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) des Pankreas als Vorläufer des Pankreaskarzinoms. *Med. Klin.* **2007**, *102*, 127–135.
 30. Hruban, R.H.; Goggins, M.; Parsons, J.; Kern, S.E. Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2969–2972.
 31. Eveno, C.; Hainaud, P.; Rampanou, A.; Bonnin, P.; Bakhouch, S.; Dupuy, E.; Contreres, J.O.; Pocard, M. Proof of prometastatic niche induction by hepatic stellate cells. *J. Surg. Res.* **2015**, *194*, 496–504.
 32. Collins, M.A.; Bednar, F.; Zhang, Y.; Brisset, J.; Galbán, S.; Galbán, C.J.; Rakshit, S.; Flannagan, K.S.; Adsay, N.V.; Pasca di Magliano, M.; Pasca, M. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 639–653.
 33. Eser, S.; Schnieke, A.; Schneider, G.; Saur, D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 817–822.
 34. Muzumdar, M.D.; Chen, P.-Y.; Dorans, K.J.; Chung, K.M.; Bhutkar, A.; Hong, E.; Noll, E.M.; Sprick, M.R.; Trumpp, A.; Jacks, T. Survival of pancreatic cancer cells lacking KRAS function. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1090.

35. Van Heek, N.T.; Meeker, A.K.; Kern, S.E.; Yeo, C.J.; Lillemoe, K.D.; Cameron, J.L.; Offerhaus, G.J.A.; Hicks, J.L.; Wilentz, R.E.; Goggins, M.G.; De Marzo, A.M.; Hruban, R.H.; Maitra, A. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1541–1547.
36. Han, H.; Von Hoff, D.D. SnapShot: Pancreatic cancer. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 424-424.e1.
37. S.L Biosanitary Studies Center Available online: <http://ceb.edu.es/en/modelo-pancreatico-de-progresion-tumoral/>.
38. Erkan, M.; Hausmann, S.; Michalski, C.W.; Fingerle, A.A.; Dobritz, M.; Kleeff, J.; Friess, H. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *9*, 454–467.
39. Helm, O.; Held-Feindt, J.; Grage-Griebenow, E.; Reiling, N.; Ungefroren, H.; Vogel, I.; Krüger, U.; Becker, T.; Ebsen, M.; Röcken, C.; Kabelitz, D.; Schäfer, H.; Sebens, S. Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 843–861.
40. Goebel, L.; Grage-Griebenow, E.; Gorys, A.; Helm, O.; Genrich, G.; Lenk, L.; Wesch, D.; Ungefroren, H.; Freitag-Wolf, S.; Sipos, B.; Röcken, C.; Schäfer, H.; Sebens, S. CD4+T cells potently induce epithelialmesenchymal- transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells—novel implications of CD4+T cells in pancreatic cancer development. *Oncoimmunology* **2015**, *4*.
41. Porembka, M.R.; Mitchem, J.B.; Belt, B.A.; Hsieh, C.-S.; Lee, H.-M.; Herndon, J.; Gillanders, W.E.; Linehan, D.C.; Goedegebuure, P. Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 1373–1385.
42. Yen, T.W.F.; Aardal, N.P.; Bronner, M.P.; Thorning, D.R.; Savard, C.E.; Lee, S.P.; Bell, R.H. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* **2002**, *131*, 129–134.
43. Rhim, A.D.; Oberstein, P.E.; Thomas, D.H.; Mirek, E.T.; Palermo, C.F.; Sastra, S.A.; Dekleva, E.N.; Saunders, T.; Becerra, C.P.; Tattersall, I.W.; Westphalen, C.B.; Kitajewski, J.; Fernandez-Barrena, M.G.; Fernandez-Zapico, M.E.; Iacobuzio-Donahue, C.; Olive, K.P.; Stanger, B.Z. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*

- 2014**, 25, 735–747.
44. Özdemir, B.C.; Pentcheva-Hoang, T.; Carstens, J.L.; Zheng, X.; Wu, C.C.; Simpson, T.R.; Laklai, H.; Sugimoto, H.; Kahlert, C.; Novitskiy, S. V.; DeJesus-Acosta, A.; Sharma, P.; Heidari, P.; Mahmood, U.; Chin, L.; Moses, H.L.; Weaver, V.M.; Maitra, A.; Allison, J.P.; LeBleu, V.S.; Kalluri, R. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* **2014**, 25, 719–734.
 45. Muerkoster, S.; Wegehenkel, K.; Arlt, A.; Witt, M.; Sipos, B.; Kruse, M.L.; Sebens, T.; Klöppel, G.; Kalthoff, H.; Fölsch, U.R.; Schäfer, H. Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 β . *Cancer Res.* **2004**, 64, 1331–1337.
 46. Wolfgang, C.L.; Herman, J.M.; Laheru, D.A.; Klein, A.P.; Erdek, M.A.; Fishman, E.K.; Hruban, R.H. Recent progress in pancreatic cancer. *CA. Cancer J. Clin.* **2013**, 63, 318–348.
 47. Tummala, P.; Junaidi, O.; Agarwal, B. Imaging of pancreatic cancer: An overview. *J. Gastrointest. Oncol.* **2011**, 2, 168–74.
 48. Edge, S.B.; Compton, C.C. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* **2010**, 17, 1471–1474.
 49. Chandrasegaram, M.D.; Goldstein, D.; Simes, J.; Gebiski, V.; Kench, J.G.; Gill, A.J.; Samra, J.S.; Merrett, N.D.; Richardson, A.J.; Barbour, A.P.; Fawcett, J.; Grimison, P.S.; Christophi, C.; Padbury, R.; Haghighi, K.S.; Chen, J.W.; Nikfarjam, M.; O'Rourke, N.; Spry, N. Meta-analysis of radical resection rates and margin assessment in pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* **2015**, 102, 1459–1472.
 50. Strobel, O.; Hank, T.; Hinz, U.; Bergmann, F.; Schneider, L.; Springfield, C.; Jäger, D.; Schirmacher, P.; Hackert, T.; Büchler, M.W. Pancreatic cancer surgery: The New R-status Counts. *Ann. Surg.* **2016**, 265, 565–573.
 51. Hartwig, W.; Werner, J.; Jäger, D.; Debus, J.; Büchler, M.W. Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* **2013**, 14, e476–e485.
 52. Neoptolemos, J.P.; Stocken, D.D.; Friess, H.; Bassi, C.; Dunn, J.A.; Hickey, H.; Beger, H.; Fernandez-Cruz, L.; Dervenis, C.; Lacaine, F.; Falconi, M.; Pederzoli,

- P.; Pap, A.; Spooner, D.; Kerr, D.J.; Büchler, M.W. A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1200–1210.
53. Colucci, G.; Labianca, R.; Di Costanzo, F.; Gebbia, V.; Carteni, G.; Massidda, B.; Dapretto, E.; Manzione, L.; Piazza, E.; Sannicola, M.; Ciaparrone, M.; Cavanna, L.; Giuliani, F.; Maiello, E.; Testa, A.; Pederzoli, P.; Falconi, M.; Gallo, C.; Di Maio, M.; Perrone, F. Randomized Phase III Trial of Gemcitabine Plus Cisplatin Compared With Single-Agent Gemcitabine As First-Line Treatment of Patients With Advanced Pancreatic Cancer: The GIP-1 Study. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 1645–1651.
54. Cunningham, D.; Chau, I.; Stocken, D.D.; Valle, J.W.; Smith, D.; Steward, W.; Harper, P.G.; Dunn, J.; Tudur-Smith, C.; West, J.; Falk, S.; Crellin, A.; Adab, F.; Thompson, J.; Leonard, P.; Ostrowski, J.; Eatock, M.; Scheithauer, W.; Herrmann, R.; Neoptolemos, J.P. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 5513–5518.
55. Burris, H.A.; Moore, M.J.; Andersen, J.; Green, M.R.; Rothenberg, M.L.; Modiano, M.R.; Cripps, M.C.; Portenoy, R.K.; Storniolo, A.M.; Tarassoff, P.; Nelson, R.; Dorr, F.A.; Stephens, C.D.; Von Hoff, D.D. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **1997**, *15*, 2403–2413.
56. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouché, O.; Guimbaud, R.; Bécouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J.-L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardière, C.; Bennouna, J.; Bachet, J.-B.; Khemissa-Akouz, F.; Péré-Vergé, D.; Delbaldo, C.; Assenat, E.; Chauffert, B.; Michel, P.; Montoto-Grillot, C.; Ducreux, M. FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1817–1825.
57. Von Hoff, D.D.; Ramanathan, R.K.; Borad, M.J.; Laheru, D.A.; Smith, L.S.; Wood, T.E.; Korn, R.L.; Desai, N.; Trieu, V.; Iglesias, J.L.; Zhang, H.; Soon-Shiong, P.; Shi, T.; Rajeshkumar, N. V.; Maitra, A.; Hidalgo, M. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: A phase I/II trial. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 4548–4554.
58. Neesse, A.; Krug, S.; Gress, T.M.; Tuveson, D.A.; Michl, P. Emerging concepts

- in pancreatic cancer medicine: Targeting the tumor stroma. *Onco. Targets. Ther.* 2013, 7, 33–43.
59. Kota, J.; Hancock, J.; Kwon, J.; Korc, M. Pancreatic cancer: Stroma and its current and emerging targeted therapies. *Cancer Lett.* 2017, 391, 38–49.
 60. Gupta, G.P.; Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* **2006**, 127, 679–695.
 61. Schroeder, A.; Heller, D.A.; Winslow, M.M.; Dahlman, J.E.; Pratt, G.W.; Langer, R.; Jacks, T.; Anderson, D.G. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12, 39–50.
 62. Valastyan, S.; Weinberg, R.A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **2011**, 147, 275–292.
 63. Valastyan, S.; Weinberg, R.A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **2011**, 147, 275–292.
 64. Luzzi, K.J.; MacDonald, I.C.; Schmidt, E.E.; Kerkvliet, N.; Morris, V.L.; Chambers, A.F.; Groom, A.C. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.* **1998**, 153, 865–873.
 65. Bardeesy, N.; Cheng, K.; Berger, J.H.; Chu, G.C.; Pahler, J.; Olson, P.; Hezel, A.F.; Horner, J.; Lauwers, G.Y.; Hanahan, D.; Depinho, R.A. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* **2006**, 3130–3146.
 66. Hingorani, S.R.; Wang, L.; Multani, A.S.; Combs, C.; Deramaudt, T.B.; Hruban, R.H.; Rustgi, A.K.; Chang, S.; Tuveson, D.A. Trp53 R172H and Kras G12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **2005**, 7, 469–483.
 67. Yachida, S.; White, C.M.; Naito, Y.; Zhong, Y.; Brosnan, J.A.; Macgregor-das, A.M.; Morgan, R.A.; Saunders, T.; Laheru, D.A.; Herman, J.M.; Velculescu, V.; Wolfgang, C.L. Clinical Significance of the Genetic Landscape of Pancreatic Cancer and Implications for Identification of Potential Long-term Survivors. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 6339–6348.
 68. Yachida, S.; Jones, S.; Bozic, I.; Antal, T.; Leary, R.; Fu, B.; Kamiyama, M.; Hruban, R.H.; Eshleman, J.R.; Nowak, M.A.; Velculescu, V.E.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; Iacobuzio-Donahue, C.A. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **2010**, 467, 1114–1117.

69. Das, S.; Batra, S.K. Pancreatic Cancer Metastasis: Are we being Pre-EMTed? *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 1249–1255.
70. Rhim, A.D.; Mirek, E.T.; Aiello, N.M.; Maitra, A.; Bailey, J.M.; McAllister, F.; Reichert, M.; Beatty, G.L.; Rustgi, A.K.; Vonderheide, R.H.; Leach, S.D.; Stanger, B.Z. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **2012**, *148*, 349–361.
71. Rhim, A.D.; Thege, F.I.; Santana, S.M.; Lannin, T.B.; Saha, T.N.; Tsai, S.; Maggs, L.R.; Kochman, M.L.; Ginsberg, G.G.; Lieb, J.G.; Chandrasekhara, V.; Drebin, J.A.; Ahmad, N.; Yang, Y.; Kirby, B.J.; Stanger, B.Z. Detection of Circulating Pancreas Epithelial Cells in Patients With Pancreatic Cystic Lesions. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 647–651.
72. Iacobuzio-Donahue, C.A.; Fu, B.; Yachida, S.; Luo, M.; Abe, H.; Henderson, C.M.; Vilardell, F.; Wang, Z.; Keller, J.W.; Banerjee, P.; Herman, J.M.; Cameron, J.L.; Yeo, C.J.; Halushka, M.K.; Eshleman, J.R.; Raben, M.; Klein, A.P.; Hruban, R.H.; Hidalgo, M.; Laheru, D. DPC4 Gene Status of the Primary Carcinoma Correlates With Patterns of Failure in Patients With Pancreatic Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1806–1813.
73. Abdel-Misih, S.R.Z.; Bloomston, M. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* **2010**, *90*, 643–653.
74. Bataller, R.; Brenner, D. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 209–218.
75. Weiskirchen, R.; Tacke, F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **2014**, *3*, 344–63.
76. Proell, V.; Mikula, M.; Fuchs, E.; Mikulits, W. The plasticity of p19 ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1744*, 76–87.
77. Kang, N.; Gores, G.; Shah, V. Hepatic Stellate Cells: Partners in Crime for Liver Metastases? *Hepatology* **2011**, *54*, 707–713.
78. Grünwald, B.; Harant, V.; Schaten, S.; Frühschütz, M.; Spallek, R.; Höchst, B.; Stutzer, K.; Berchtold, S.; Erkan, M.; Prokopchuk, O.; Martignoni, M.; Esposito, I.; Heikenwalder, M.; Gupta, A.; Siveke, J.; Saftig, P.; Knolle, P.; Wöhlleber, D.; Krüger, A. Pancreatic Premalignant Lesions Secrete Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1, Which Activates Hepatic Stellate Cells Via CD63 Signaling to Create a Premetastatic Niche in the Liver. *Gastroenterology* **2016**,

- 151, 1011-1024.e7.
79. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; Xiang, J.; Zhang, T.; Theilen, T.-M.; García-Santos, G.; Williams, C.; Ararso, Y.; Huang, Y.; Rodrigues, G.; Shen, T.-L.; Labori, K.J.; Lothe, I.M.B.; Kure, E.H.; Hernandez, J.; Doussot, A.; Ebbesen, S.H.; Grandgenett, P.M.; Hollingsworth, M.; Jain, M.; Mallya, K.; Batra, S.K.; Jarnagin, W.R.; Schwartz, R.E.; Matei, I.; Peinado, H.; Stanger, B.Z.; Bromberg, J.; Lyden, D. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1–7.
80. Nielsen, S.R.; Quaranta, V.; Linford, A.; Emeagi, P.; Rainer, C.; Santos, A.; Ireland, L.; Sakai, T.; Sakai, K.; Kim, Y.-S.; Engle, D.; Campbell, F.; Palmer, D.; Ko, J.H.; Tuveson, D.A.; Hirsch, E.; Mielgo, A.; Schmid, M.C. Macrophage-secreted granulin supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 549.
81. Whatcott, C.J.; Diep, C.H.; Jiang, P.; Watanabe, A.; Lobello, J.; Sima, C.; Hostetter, G.; Shepard, H.M.; Von Hoff, D.D.; Han, H. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3561–3568.
82. Aiello, N.M.; Bajor, D.L.; Norgard, R.J.; Sahmoud, A.; Bhagwat, N.; Pham, M.N.; Cornish, T.C.; Iacobuzio-Donahue, C.A.; Vonderheide, R.H.; Stanger, B.Z. Metastatic progression is associated with dynamic changes in the local microenvironment. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12819.
83. Falschlehner, C.; Emmerich, C.H.; Gerlach, B.; Walczak, H. TRAIL signalling: Decisions between life and death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1462–1475.
84. Mariani, S.M.; Krammer, P.H. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 973–982.
85. Walczak, H.; Miller, R.E.; Ariail, K.; Gliniak, B.; Griffith, T.S.; Kubin, M.; Chin, W.; Jones, J.; Woodward, A.; Le, T.; Smith, C.; Smolak, P.; Goodwin, R.G.; Rauch, C.T.; Schuh, J.C.L.; Lynch, D.H. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor–related apoptosis–inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 157.
86. Ganten, T.M.; Koschny, R.; Sykora, J.; Schulze-Bergkamen, H.; Büchler, P.; Haas, T.L.; Schader, M.B.; Untergasser, A.; Stremmel, W.; Walczak, H.

- Preclinical Differentiation between Apparently Safe and Potentially Hepatotoxic Applications of TRAIL Either Alone or in Combination with Chemotherapeutic Drugs. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 2640 LP – 2646.
87. Lawrence, D.; Shahrokh, Z.; Marsters, S.; Achilles, K.; Shih, D.; Mounho, B.; Hillan, K.; Totpal, K.; DeForge, L.; Schow, P.; Hooley, J.; Sherwood, S.; Pai, R.; Leung, S.; Khan, L.; Gliniak, B.; Bussiere, J.; Smith, C.A.; Strom, S.S.; Kelley, S.; Fox, J.A.; Thomas, D.; Ashkenazi, A. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* **2001**, 7, 383.
88. Pan, G.; Rourke, K.; Chinnaiyan, A.M.; Gentz, R.; Ebner, R.; Ni, J.; Dixit, V.M. The Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *Science* **1997**, 276, 111 LP – 113.
89. Walczak, H.; Degli-Esposti, M.A.; Johnson, R.S.; Smolak, P.J.; Waugh, J.Y.; Boiani, N.; Timour, M.S.; Gerhart, M.J.; Schooley, K.A.; Smith, C.A.; Goodwin, R.G.; Rauch, C.T. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* **1997**, 16, 5386 LP – 5397.
90. Degli-Esposti, M.A.; Smolak, P.J.; Walczak, H.; Waugh, J.; Huang, C.-P.; DuBose, R.F.; Goodwin, R.G.; Smith, C.A. Cloning and Characterization of TRAIL-R3, a Novel Member of the Emerging TRAIL Receptor Family. *J. Exp. Med.* **1997**, 186, 1165 LP – 1170.
91. Degli-Esposti, M.A.; Dougall, W.C.; Smolak, P.J.; Waugh, J.Y.; Smith, C.A.; Goodwin, R.G. The Novel Receptor TRAIL-R4 Induces NF- κ B and Protects against TRAIL-Mediated Apoptosis, yet Retains an Incomplete Death Domain. *Immunity* **1997**, 7, 813–820.
92. Merino, D.; Lalaoui, N.; Morizot, A.; Schneider, P.; Solary, E.; Micheau, O. Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, 26, 7046–7055.
93. Emery, J.G.; McDonnell, P.; Burke, M.B.; Deen, K.C.; Lyn, S.; Silverman, C.; Dul, E.; Appelbaum, E.R.; Eichman, C.; DiPrinzio, R.; Dodds, R.A.; James, I.E.; Rosenberg, M.; Lee, J.C.; Young, P.R. Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 14363–14367.
94. Truneh, A.; Sharma, S.; Silverman, C.; Khandekar, S.; Reddy, M.P.; Deen, K.C.; Mclaughlin, M.M.; Srinivasula, S.M.; Livi, G.P.; Marshall, L.A.; Alnemri, E.S.; Williams, W. V; Doyle, M.L. Temperature-sensitive Differential Affinity of TRAIL for Its Receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 23319–23325.
95. Bertsch, U.; Röder, C.; Kalthoff, H.; Trauzold, A. Compartmentalization of TNF-

- related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death Dis.* **2014**, 5, e1390.
96. Gonzalez, F.; Ashkenazi, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **2010**, 29, 4752–65.
97. Sprick, M.R.; Weigand, M.A.; Rieser, E.; Rauch, C.T.; Juo, P.; Blenis, J.; Krammer, P.H.; Walczak, H. FADD / MORT1 and Caspase-8 Are Recruited to TRAIL Receptors 1 and 2 and Are Essential for Apoptosis Mediated by TRAIL Receptor 2. *Immunity* **2000**, 12, 599–609.
98. Kischkel, F.C.; Lawrence, D.A.; Chuntharapai, A.; Schow, P.; Kim, K.J.; Ashkenazi, A.; Way, D.N.A.; Francisco, S.S. Apo2L / TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity* **2000**, 12, 611–620.
99. Scaffidi, C.; Fulda, S.; Srinivasan, A.; Friesen, C.; Li, F.; Tomaselli, K.J.; Debatin, K.; Krammer, P.H.; Peter, M.E. Two CD95 (APO-1 / Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **1998**, 17, 1675–1687.
100. Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. Bid , a Bcl2 Interacting Protein , Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* **1998**, 94, 481–490.
101. Schug, Z.T.; Gonzalez, F.; Houtkooper, R.H.; Vaz, F.M.; Gottlieb, E. BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell Death Differ.* **2010**, 18, 538–548.
102. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1 / Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **1997**, 91, 479–489.
103. Pan, G.; Rourke, K.O.; Dixit, V.M. Caspase-9 , Bcl-X L , and Apaf-1 Form a Ternary Complex *. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5841–5845.
104. Azijli, K.; Weyhenmeyer, B.; Peters, G.J.; de Jong, S.; Kruyt, F. a E. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family. *Cell Death Differ.* **2013**, 20, 858–68.
105. Varfolomeev, E.; Maecker, H.; Sharp, D.; Lawrence, D.; Renz, M.; Vucic, D.; Ashkenazi, A. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 40599–40608.
106. Ehrhardt, H.; Fulda, S.; Schmid, I.; Hiscott, J.; Debatin, K.M.; Jeremias, I. TRAIL

- induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF- κ B. *Oncogene* **2003**, 22, 3842–3852.
107. Trauzold, A.; Wermann, H.; Arlt, A.; Schütze, S.; Schäfer, H.; Oestern, S.; Röder, C.; Ungefroren, H.; Lampe, E.; Heinrich, M.; Walczak, H.; Kalthoff, H. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* **2001**, 20, 4258–4269.
108. Braeuer, S.J.; Büneker, C.; Mohr, A.; Zwacka, R.M. Constitutively activated nuclear factor- κ B, but not induced NF- κ B, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **2006**, 4, 715–728.
109. Azijli, K.; Yuvaraj, S.; Peppelenbosch, M.P.; Wurdinger, T.; Dekker, H.; Joore, J.; van Dijk, E.; Quax, W.J.; Peters, G.J.; de Jong, S.; Kruijt, F. a. E. Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3 dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells. *J. Cell Sci.* **2012**, 4651–4661.
110. Mucha, S.R.; Rizzani, A.; Gerbes, A.L.; Camaj, P.; Thasler, W.E.; Bruns, C.J.; Eichhorst, S.T.; Gallmeier, E.; Kolligs, F.T.; Göke, B.; De Toni, E.N. JNK inhibition sensitises hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to the TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Gut* **2009**, 58, 688–698.
111. Weldon, C.B.; Parker, A.P.; Patten, D.; Elliott, S.; Tang, Y.; Frigo, D.E.; Dugan, C.M.; Coakley, E.L.; Butler, N.N.; Clayton, J.L.; Alam, J.; Curiel, T.J.; Beckman, B.S.; Jaffe, B.M.; Burow, M.E. Sensitization of apoptotically-resistant breast carcinoma cells to TNF and TRAIL by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase signaling. *Int. J. Oncol.* **2004**, 24, 1473–1480.
112. Ishimura, N.; Isomoto, H.; Bronk, S.F.; Gores, G.J. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, 290, G129-36.
113. Hoogwater, F.J.H.; Nijkamp, M.W.; Smakman, N.; Steller, E.J.A.; Emmink, B.L.; Westendorp, B.F.; Raats, D.A.E.; Sprick, M.R.; Schaefer, U.; Van Houdt, W.J.; De Bruijn, M.T.; Schackmann, R.C.J.; Derksen, P.W.B.; Medema, J.P.; Walczak, H.; Borel Rinkes, I.H.M.; Kranenburg, O. Oncogenic K-Ras Turns Death Receptors Into Metastasis-Promoting Receptors in Human and Mouse Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* **2010**, 138, 2357–2367.

114. Trauzold, A.; Siegmund, D.; Schniewind, B.; Sipos, B.; Egberts, J.; Zorenkov, D.; Emme, D.; Röder, C.; Kalthoff, H.; Wajant, H. TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **2006**, *25*, 7434–7439.
115. von Karstedt, S.; Conti, A.; Nobis, M.; Montinaro, A.; Hartwig, T.; Lemke, J.; Legler, K.; Annewanter, F.; Campbell, A.D.; Taraborrelli, L.; Grosse-Wilde, A.; Coy, J.F.; El-Bahrawy, M.A.; Bergmann, F.; Koschny, R.; Werner, J.; Ganten, T.M.; Schweiger, T.; Hoetzenecker, K.; Kenessey, I.; Hegedüs, B.; Bergmann, M.; Hauser, C.; Egberts, J.H.; Becker, T.; Röcken, C.; Kalthoff, H.; Trauzold, A.; Anderson, K.I.; Sansom, O.J.; Walczak, H. Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-Driven cancer progression, invasion, and metastasis. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 561–573.
116. Haselmann, V.; Kurz, A.; Bertsch, U.; Hübner, S.; Olempska-Müller, M.; Fritsch, J.; Häslar, R.; Pickl, A.; Fritsche, H.; Annewanter, F.; Engler, C.; Fleig, B.; Bernt, A.; Röder, C.; Schmidt, H.; Gelhaus, C.; Hauser, C.; Egberts, J.H.; Heneweer, C.; Rohde, A.M.; Böger, C.; Knippschild, U.; Röcken, C.; Adam, D.; Walczak, H.; Schütze, S.; Janssen, O.; Wulczyn, F.G.; Wajant, H.; Kalthoff, H.; Trauzold, A. Nuclear death receptor trail-r2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 278–290.
117. Ganten, T.M.; Sykora, J.; Koschny, R.; Batke, E. Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J. Mol. Med.* **2009**, 995–1007.
118. Gallmeier, E.; Bader, D.C.; Kriegel, L.; Berezowska, S.; Seeliger, H.; Göke, B.; Kirchner, T.; Bruns, C.; de Toni, E.N. Loss of TRAIL-Receptors Is a Recurrent Feature in Pancreatic Cancer and Determines the Prognosis of Patients with No Nodal Metastasis after Surgery. *PLoS One* **2013**, *8*.
119. Kuijlen, J.M.A.; Mooij, J.J.A.; Platteel, I.; Hoving, E.W.; Graaf, W.T.A. Van Der TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **2006**, 161–171.
120. Sträter, J.; Hinz, U.; Walczak, H.; Mechtersheimer, G.; Koretz, K.; Herfarth, C.; Mo, P.; Lehnert, T. Expression of TRAIL and TRAIL Receptors in Colon Carcinoma : TRAIL-R1 Is an Independent Prognostic Parameter. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3734–3740.
121. Macher-Goeppinger, S.; Aulmann, S.; Tagscherer, K.E.; Wagener, N.;

- Haferkamp, A.; Penzel, R.; Brauckhoff, A.; Hohenfellner, M.; Sykora, J.; Walczak, H.; Teh, B.T.; Autschbach, F.; Herpel, E.; Schirmacher, P.; Roth, W. Prognostic Value of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) and TRAIL Receptors in Renal Cell Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 650–660.
122. Elrod, H.A.; Fan, S.; Muller, S.; Chen, G.Z.; Pan, L.; Tighiouart, M.; Dong, M.; Khuri, F.R.; Sun, S. Analysis of Death Receptor 5 and Caspase-8 Expression in Primary and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Prognostic Impact. *PLoS One* **2010**, *5*.
123. Groot, V.P.; Rezaee, N.; Wu, W.; Cameron, J.L.; Fishman, E.K.; Hruban, R.H.; Weiss, M.J.; Zheng, L.; Wolfgang, C.L.; He, J. Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg.* **2017**, *XX*, 1.
124. Lambert, A.W.; Pattabiraman, D.R.; Weinberg, R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **2017**, *168*, 670–691.
125. Blomberg, O.S.; Spagnuolo, L.; de Visser, K.E. Immune regulation of metastasis: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Dis. Model. Mech.* **2018**, *11*.
126. Chambers, A.F.; Groom, A.C.; MacDonald, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 563–72.
127. Mehlen, P.; Puisieux, A. Metastasis: a question of life or death. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 449–458.
128. Sosa, M.S.; Bragado, P.; Aguirre-Ghiso, J.A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 611.
129. Aguirre-Ghiso, J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 834–846.
130. Deylgat, B.; Van Rooy, F.; Vansteenkiste, F.; Devriendt, D.; George, C. Postsurgery activation of dormant liver micrometastasis: a case report and review of literature. *J. Gastrointest. Cancer* **2011**, *42*, 1–4.
131. Fidler, I.J.; Kripke, M.L. The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **2015**, *34*, 635–641.
132. Griffin, J.F.; Smalley, S.R.; Jewell, W.; Paradelo, J.C.; Raymond, R.D.; Hassanein, R.E.; Evans, R.G. Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* **1990**, *66*, 56–61.
133. Lee, J.W.; Stone, M.L.; Porrett, P.M.; Thomas, S.K.; Komar, C.A.; Li, J.H.;

- Delman, D.; Graham, K.; Gladney, W.L.; Hua, X.; Black, T.A.; Chien, A.L.; Majmundar, K.S.; Thompson, J.C.; Yee, S.S.; Hara, M.H.O.; Aggarwal, C.; Xin, D.; Shaked, A.; Gao, M.; Liu, D.; Borad, M.J.; Ramanathan, R.K.; Carpenter, E.L.; Ji, A.; Beer, M.C. De; Beer, F.C. De; Webb, N.R.; Beatty, G.L. Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver. *Nature* **2019**.
134. Nielsen, S.R.; Quaranta, V.; Linford, A.; Emeagi, P.; Rainer, C.; Santos, A.; Ireland, L.; Sakai, T.; Sakai, K.; Kim, Y.-S.; Engle, D.; Campbell, F.; Palmer, D.; Ko, J.H.; Tuveson, D.A.; Hirsch, E.; Mielgo, A.; Schmid, M.C. Macrophage-secreted granulin supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 549.
135. Kenkel, J.A.; Tseng, W.W.; Davidson, M.G.; Tolentino, L.L.; Choi, O.; Bhattacharya, N.; Seeley, E.S.; Winer, D.A.; Reticker-Flynn, N.E.; Engleman, E.G. An immunosuppressive dendritic cell subset accumulates at secondary sites and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 4158–4170.
136. Tohme, S.; Yazdani, H.O.; Al-Khafaji, A.B.; Chidi, A.P.; Loughran, P.; Mowen, K.; Wang, Y.; Simmons, R.L.; Huang, H.; Tsung, A. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 1367–1380.
137. Knaack, H.; Lenk, L.; Philipp, L.-M.; Miarka, L.; Rahn, S.; Viol, F.; Hauser, C.; Egberts, J.-H.; Gundlach, J.-P.; Will, O.; Tiwari, S.; Mikulits, W.; Schumacher, U.; Hengstler, J.G.; Sebens, S. Liver metastasis of pancreatic cancer: the hepatic microenvironment impacts differentiation and self-renewal capacity of pancreatic ductal epithelial cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 31771–31786.
138. Fabian, A.; Stegner, S.; Miarka, L.; Zimmermann, J.; Lenk, L.; Rahn, S.; Buttlar, J.; Viol, F.; Knaack, H.; Esser, D.; Schäuble, S.; Großmann, P.; Marinos, G.; Häslar, R.; Mikulits, W.; Saur, D.; Kaleta, C.; Schäfer, H.; Sebens, S. Metastasis of pancreatic cancer: An uninflamed liver micromilieu controls cell growth and cancer stem cell properties by oxidative phosphorylation in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Lett.* **2019**, *453*, 95–106.
139. Lenk, L.; Pein, M.; Will, O.; Gomez, B.; Viol, F.; Hauser, C.; Egberts, J.H.; Gundlach, J.P.; Helm, O.; Tiwari, S.; Weiskirchen, R.; Rose-John, S.; Röcken, C.; Mikulits, W.; Wenzel, P.; Schneider, G.; Saur, D.; Schäfer, H.; Sebens, S. The hepatic microenvironment essentially determines tumor cell dormancy and

- metastatic outgrowth of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* **2018**, 7, e1368603.
140. Krall, J.A.; Reinhardt, F.; Mercury, O.A.; Pattabiraman, D.R.; Brooks, M.W.; Dougan, M.; Lambert, A.W.; Bierie, B.; Ploegh, H.L.; Dougan, S.K.; Weinberg, R.A. The systemic response to surgery triggers the outgrowth of distant immune-controlled tumors in mouse models of dormancy. *Sci. Transl. Med.* **2018**, 10, eaan3464.
141. Grzelak, C.A.; Ghajar, C.M. Metastasis 'systems' biology: how are macro-environmental signals transmitted into microenvironmental cues for disseminated tumor cells? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2017**, 48, 79–86.
142. De Cock, J.M.; Shibue, T.; Dongre, A.; Keckesova, Z.; Reinhardt, F.; Weinberg, R.A. Inflammation triggers Zeb1-dependent escape from tumor latency. *Cancer Res.* **2016**, 76, 6778–6784.
143. Albregues, J.; Shields, M.A.; Ng, D.; Park, C.G.; Ambrico, A.; Poindexter, M.E.; Upadhyay, P.; Uyeminami, D.L.; Pommier, A.; Küttner, V.; Bružas, E.; Maiorino, L.; Bautista, C.; Carmona, E.M.; Gimotty, P.A.; Fearon, D.T.; Chang, K.; Lyons, S.K.; Pinkerton, K.E.; Trotman, L.C.; Goldberg, M.S.; Yeh, J.T.-H.; Egeblad, M. Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* **2018**, 361, eaao4227.
144. Hartwig, T.; Montinaro, A.; Karstedt, S. Von; El-bahrawy, M.A.; Quezada, S.A.; Walczak, H. The TRAIL-Induced Cancer Secretome Promotes a Tumor-Supportive Immune Microenvironment via CCR2. *Mol. Cell* **2017**, 65, 730-742.e5.
145. Fritsche, H.; Heilmann, T.; Tower, R.J.; Hauser, C.; von Au, A.; El-Sheikh, D.; Campbell, G.M.; Alp, G.; Schewe, D.; Hübner, S.; Tiwari, S.; Kownatzki, D.; Boretius, S.; Adam, D.; Jonat, W.; Becker, T.; Glüer, C.C.; Zöller, M.; Kalthoff, H.; Schem, C.; Trauzold, A. TRAIL-R2 promotes skeletal metastasis in a breast cancer xenograft mouse model. *Oncotarget* **2015**, 6, 9502–16.
146. Moore, P.S.; Sipos, B.; Orlandini, S.; Sorio, C.; Real, F.X.; Lemoine, N.R.; Gress, T.; Bassi, C.; Kloppel, G.; Kalthoff, H.; Ungefroren, H.; Lohr, M.; Scarpa, A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.* **2001**, 439, 798–802.
147. Egberts, J.H.; Cloosters, V.; Noack, A.; Schniewind, B.; Thon, L.; Klose, S.; Kettler, B.; von Forstner, C.; Kneitz, C.; Tepel, J.; Adam, D.; Wajant, H.; Kalthoff,

- H.; Trauzold, A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **2008**, 68, 1443–1450.
148. Goumas, F.A.; Holmer, R.; Egberts, J.H.; Gontarewicz, A.; Heneweer, C.; Geisen, U.; Hauser, C.; Mende, M.M.; Legler, K.; Röcken, C.; Becker, T.; Waetzig, G.H.; Rose-John, S.; Kalthoff, H. Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **2015**, 137, 1035–1046.
149. Lenk, L. Metastasis of Pancreatic Cancer: Influence of the hepatic microenvironment on the growth behavior of pancreatic ductal epithelial cells, Christian-Albrechts-Universität Kiel, 2017.
150. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–275.
151. Kötzsch, S.; Sinreich, M. Zellzahlen zum Grundwasser. Bestimmung mittels Durchflussszytometrie. *Aqua Gas* **2014**, 94, 14–21.
152. Bio-Legend GmbH, Koblenz, D. LEGENDplex: Principle of the Assay Available online: <https://www.biolegend.com/legendplex> (accessed on Apr 19, 2019).
153. Bilimoria, K.Y.; Bentrem, D.J.; Ko, C.Y.; Tomlinson, J.S.; Stewart, A.K.; Winchester, D.P.; Talamonti, M.S. Multimodality therapy for pancreatic cancer in the U.S.: Utilization, outcomes, and the effect of hospital volume. *Cancer* **2007**, 110, 1227–1234.
154. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* **2011**, 144, 646–674.
155. Bruno, S.; Crissman, H.A.; Bauer, K.D.; Darzynkiewicz, Z. Changes in cell nuclei during S phase: progressive chromatin condensation and altered expression of the proliferation-associated nuclear proteins Ki-67, cyclin (PCNA), p105, and p34. *Exp. Cell Res.* **1991**, 196, 99–106.
156. Bataller, R.; Brenner, D. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 209–218.
157. Friedman, S.L. Hepatic Stellate Cells: Protean, Multifunctional, and Enigmatic Cells of the Liver. *Physiol. Rev.* **2008**, 88, 125–172.
158. Lemke, J.; Noack, A.; Adam, D.; Tchikov, V.; Bertsch, U.; Röder, C.; Schütze, S.; Wajant, H.; Kalthoff, H.; Trauzold, A. TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *J. Mol. Med.* **2010**, 88, 729–740.
159. O’Leary, L.; van der Sloot, a M.; Reis, C.R.; Deegan, S.; Ryan, a E.; Dhami,

- S.P.S.; Murillo, L.S.; Cool, R.H.; de Sampaio, P.C.; Thompson, K.; Murphy, G.; Quax, W.J.; Serrano, L.; Samali, A.; Szegezdi, E. Decoy receptors block TRAIL sensitivity at a supracellular level: the role of stromal cells in controlling tumour TRAIL sensitivity. *Oncogene* **2015**, 1–10.
160. Hwang, I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol. Cells* **2013**, 36, 105–111.
161. Zhou, D.; Yang, L.; Röder, C.; Kalthoff, H.; Trauzold, A. TRAIL-induced expression of uPA and IL-8 strongly enhanced by overexpression of TRAF2 and Bcl-xL in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2013**, 12, 94–98.
162. Egberts, J.-H.; Cloosters, V.; Noack, A.; Schniewind, B.; Thon, L.; Klose, S.; Kettler, B.; von Forstner, C.; Kneitz, C.; Tepel, J.; Adam, D.; Wajant, H.; Kalthoff, H.; Trauzold, A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **2008**, 68, 1443–50.
163. Sethi, G.; Sung, B.; Aggarwal, B.B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front. Biosci.* **2008**, 13, 5094–5107.
164. Leonardi, C.L.; Powers, J.L.; Matheson, R.T.; Goffe, B.S.; Zitnik, R.; Wang, A.; Gottlieb, A.B. Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 349, 2014–2022.
165. Liu, R.; Bal, H.S.; Desta, T.; Behl, Y.; Graves, D.T. Tumor necrosis factor- α mediates diabetes-enhanced apoptosis of matrix-producing cells and impairs diabetic healing. *Am. J. Pathol.* **2006**, 168, 757–764.
166. Popivanova, B.K.; Kitamura, K.; Wu, Y.; Kondo, T.; Kagaya, T.; Kaneko, S.; Oshima, M.; Fujii, C.; Mukaida, N. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J. Clin. Invest.* **2008**, 118, 560–570.
167. Hurwitz, H.; Fehrenbacher, L.; Novotny, W.; Cartwright, T.; Hainsworth, J.; Heim, W.; Berlin, J.; Baron, A.; Griffing, S.; Holmgren, E.; Ferrara, N.; Fyfe, G.; Rogers, B.; Ross, R.; Kabbinavar, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 350, 2335–2342.
168. FDA approves aflibercept (Zaltrap) for metastatic colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*. **2012**, 26, 842,873.
169. Van Cutsem, E.; Tabernero, J.; Lakomy, R.; Prenen, H.; Prausova, J.; Macarulla,

- T.; Ruff, P.; van Hazel, G.A.; Moiseyenko, V.; Ferry, D.; McKendrick, J.; Polikoff, J.; Tellier, A.; Castan, R.; Allegra, C. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3499–3506.
170. Wu, Y.; Zhong, Z.; Huber, J.; Bassi, R.; Finnerty, B.; Corcoran, E.; Li, H.; Navarro, E.; Balderes, P.; Jimenez, X.; Koo, H.; Mangalampalli, V.R.M.; Ludwig, D.L.; Tonra, J.R.; Hicklin, D.J. Anti-vascular endothelial growth factor receptor-1 antagonist antibody as a therapeutic agent for cancer. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6573–6584.
171. Holash, J.; Davis, S.; Papadopoulos, N.; Croll, S.D.; Ho, L.; Russell, M.; Boland, P.; Leidich, R.; Hylton, D.; Burova, E.; Ioffe, E.; Huang, T.; Radziejewski, C.; Bailey, K.; Fandl, J.P.; Daly, T.; Wiegand, S.J.; Yancopoulos, G.D.; Rudge, J.S. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11393–11398.
172. Rudge, J.S.; Holash, J.; Hylton, D.; Russell, M.; Jiang, S.; Leidich, R.; Papadopoulos, N.; Pyles, E.A.; Torri, A.; Wiegand, S.J.; Thurston, G.; Stahl, N.; Yancopoulos, G.D. VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 18363–18370.
173. Torimura, T.; Iwamoto, H.; Nakamura, T.; Abe, M.; Ikezono, Y.; Wada, F.; Sakaue, T.; Masuda, H.; Hashimoto, O.; Koga, H.; Ueno, T.; Yano, H. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Aflibercept, a Soluble VEGF Receptor-1 and -2, in a Mouse Model of Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasia* **2016**, *18*, 413–424.
174. Sosa, M.S.; Bragado, P.; Aguirre-Ghiso, J.A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 611–22.
175. Aguirre-Ghiso, J.A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 834.
176. Pantel, K.; Brakenhoff, R.H. Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 448–456.
177. Pantel, K.; Alix-Panabieres, C.; Riethdorf, S. Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2009**, *6*, 339–351.
178. Pommier, A.; Anaparthi, N.; Memos, N.; Kelley, Z.L.; Gouronnec, A.; Yan, R.;

- Auffray, C.; Albregues, J.; Egeblad, M.; Iacobuzio-Donahue, C.A.; Lyons, S.K.; Fearon, D.T. Unresolved endoplasmic reticulum stress engenders immune-resistant, latent pancreatic cancer metastases. *Science* **2018**, *360*, eaao4908.
179. Clever, D.; Roychoudhuri, R.; Constantinides, M.G.; Askenase, M.H.; Sukumar, M.; Klebanoff, C.A.; Eil, R.L.; Hickman, H.D.; Yu, Z.; Pan, J.H.; Palmer, D.C.; Phan, A.T.; Goulding, J.; Gattinoni, L.; Goldrath, A.W.; Belkaid, Y.; Restifo, N.P. Oxygen Sensing by T Cells Establishes an Immunologically Tolerant Metastatic Niche. *Cell* **2016**, *166*, 1117-1131.e14.
 180. Eyles, J.; Puaux, A.-L.; Wang, X.; Toh, B.; Prakash, C.; Hong, M.; Tan, T.G.; Zheng, L.; Ong, L.C.; Jin, Y.; Kato, M.; Prevost-Blondel, A.; Chow, P.; Yang, H.; Abastado, J.-P. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120*, 2030–2039.
 181. Croy, B.A.; Percy, D.H.; Smith, A.L. What are scid mice and why is it timely to devote a special topic issue to them? *Lab. Anim. Sci.* **1993**, *43*, 120–122.
 182. Wu, G.S.; Burns, T.F.; Zhan, Y.; Alnemri, E.S.; El-Deiry, W.S. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2770–2775.
 183. Steele, C.W.; Karim, S.A.; Leach, J.D.G.; Bailey, P.; Upstill-goddard, R.; Rishi, L.; Foth, M.; Bryson, S.; McDaid, K.; Wilson, Z.; Eberlein, C.; Candido, J.B.; Clarke, M.; Nixon, C.; Connelly, J.; Jamieson, N.; Carter, C.R.; Balkwill, F.; Chang, D.K.; Evans, T.R.J.; Strathdee, D.; Biankin, A. V.; Nibbs, R.J.B.; Barry, S.T.; Sansom, O.J.; Morton, J.P. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 832–845.
 184. Quaranta, V.; Rainer, C.; Nielsen, S.R.; Raymant, M.L.; Ahmed, M.S.; Engle, D.D.; Taylor, A.; Murray, T.; Campbell, F.; Palmer, D.H.; Tuveson, D.A.; Mielgo, A.; Schmid, M.C. Macrophage-derived granulins drives resistance to immune checkpoint inhibition in metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res.* **2018**, canres.3876.2017.
 185. Cheng, L.; Swartz, M.D.; Zhao, H.; Kapadia, A.S.; Lai, D.; Rowan, P.J.; Buchholz, T.A.; Giordano, S.H. Hazard of recurrence among women after primary breast cancer treatment--a 10-year follow-up using data from SEER-

- Medicare. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2012**, *21*, 800–809.
186. Colleoni, M.; Sun, Z.; Price, K.N.; Karlsson, P.; Forbes, J.F.; Thurlimann, B.; Gianni, L.; Castiglione, M.; Gelber, R.D.; Coates, A.S.; Goldhirsch, A. Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 927–935.
187. Tohme, S.; Simmons, R.L.; Tsung, A. Surgery for cancer: A trigger for metastases. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1548–1552.
188. Mantovani, A.; Barajon, I.; Garlanda, C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol. Rev.* **2018**, *281*, 57–61.
189. Aqbi, H.F.; Wallace, M.; Sappal, S.; Payne, K.K.; Manjili, M.H. IFN-gamma orchestrates tumor elimination, tumor dormancy, tumor escape, and progression. *J. Leukoc. Biol.* **2018**, *103*, 1219–1223.
190. Hong, I.-S. Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types. *Exp. Mol. Med.* **2016**, *48*, e242.
191. Forget, P.; Vandenhende, J.; Berliere, M.; Machiels, J.-P.; Nussbaum, B.; Legrand, C.; De Kock, M. Do Intraoperative Analgesics Influence Breast Cancer Recurrence After Mastectomy? A Retrospective Analysis. *Anesth. Analg.* **2010**, *110*.
192. Retsky, M.; Demicheli, R.; Hrushesky, W.J.M.; Forget, P.; De Kock, M.; Gukas, I.; Rogers, R.A.; Baum, M.; Sukhatme, V.; Vaidya, J.S. Reduction of breast cancer relapses with perioperative non-steroidal anti-inflammatory drugs: new findings and a review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 4163–4176.
193. Pierce, B.L.; Ballard-Barbash, R.; Bernstein, L.; Baumgartner, R.N.; Neuhaus, M.L.; Wener, M.H.; Baumgartner, K.B.; Gilliland, F.D.; Sorensen, B.E.; McTiernan, A.; Ulrich, C.M. Elevated Biomarkers of Inflammation Are Associated With Reduced Survival Among Breast Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 3437–3444.
194. Stevens, L.; Pathak, S.; Nunes, Q.M.; Pandanaboyana, S.; Macutkiewicz, C.; Smart, N.; Smith, A.M. Prognostic significance of pre-operative C-reactive protein and the neutrophil-lymphocyte ratio in resectable pancreatic cancer: a systematic review. *HPB (Oxford)*. **2015**, *17*, 285–291.
195. Kim, N.H.; Kim, H.J. Preoperative risk factors for early recurrence in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma after curative intent surgical

- resection. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int* **2018**, 17, 450–455.
196. Desborough, J.P. The stress response to trauma and surgery. *Br. J. Anaesth.* **2000**, 85, 109–117.
197. Krenkel, O.; Hundertmark, J.; Ritz, T.P.; Weiskirchen, R.; Tacke, F. Single Cell RNA Sequencing Identifies Subsets of Hepatic Stellate Cells and Myofibroblasts in Liver Fibrosis. *Cells* **2019**, 8.
198. Borgen, E.; Rypdal, M.C.; Sosa, M.S.; Renolen, A.; Schlichting, E.; Lonning, P.E.; Synnestvedt, M.; Aguirre-Ghiso, J.A.; Naume, B. NR2F1 stratifies dormant disseminated tumor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **2018**, 20, 120.
199. Sosa, M.S.; Parikh, F.; Maia, A.G.; Estrada, Y.; Bosch, A.; Bragado, P.; Ekpin, E.; George, A.; Zheng, Y.; Lam, H.-M.; Morrissey, C.; Chung, C.-Y.; Farias, E.F.; Bernstein, E.; Aguirre-Ghiso, J.A. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6170.
200. Zhuang, Y.; Gudas, L.J. Overexpression of COUP-TF1 in murine embryonic stem cells reduces retinoic acid-associated growth arrest and increases extraembryonic endoderm gene expression. *Differentiation.* **2008**, 76, 760–771.
201. Zhou, D.H.; Trauzold, A.; Röder, C.; Pan, G.; Zheng, C.; Kalthoff, H. The potential molecular mechanism of overexpression of uPA, IL-8 MMP-7 and MMP-9 induced by TRAIL in pancreatic cancer cell. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **2008**, 7, 201–209.
202. Gundlach, J.-P.; Hauser, C.; Schlegel, F.M.; Boger, C.; Roder, C.; Rocken, C.; Becker, T.; Egberts, J.-H.; Kalthoff, H.; Trauzold, A. Cytoplasmic TRAIL-R1 is a positive prognostic marker in PDAC. *BMC Cancer* **2018**, 18, 777.
203. Yang, C.; Bork, U.; Schölch, S.; Kulu, Y.; Kaderali, L.; Uta, L.; Kahlert, C.; Weitz, J.; Rahbari, N.N. Postoperative course and prognostic value of circulating angiogenic cytokines after pancreatic cancer resection. *Oncotarget* **2017**, 8, 72315–72323.
204. Yang, H.-R.; Hsieh, C.-C.; Wang, L.; Fung, J.J.; Lu, L.; Qian, S. A critical role of TRAIL expressed on cotransplanted hepatic stellate cells in prevention of islet allograft rejection. *Microsurgery* **2010**, 30, 332–337.
205. Bossen, C.; Ingold, K.; Tardivel, A.; Bodmer, J.-L.; Gaide, O.; Hertig, S.; Ambrose, C.; Tschopp, J.; Schneider, P. Interactions of tumor necrosis factor

- (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13964–13971.
206. ten Kate, M.; Hofland, L.J.; van Koetsveld, P.M.; Jeekel, J.; van Eijck, C.H.J. Pro-inflammatory cytokines affect pancreatic carcinoma cell. Endothelial cell interactions. *JOP* **2006**, *7*, 454–464.
207. Nozawa, F.; Hirota, M.; Okabe, A.; Shibata, M.; Iwamura, T.; Haga, Y.; Ogawa, M. Tumor necrosis factor alpha acts on cultured human vascular endothelial cells to increase the adhesion of pancreatic cancer cells. *Pancreas* **2000**, *21*, 392–398.
208. Hermann, P.C.; Huber, S.L.; Herrler, T.; Aicher, A.; Ellwart, J.W.; Guba, M.; Bruns, C.J.; Heeschen, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 313–23.
209. Matsuda, Y.; Yoshimura, H.; Ueda, J.; Naito, Z.; Korc, M.; Ishiwata, T. Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2Rgamma(null) (NOG) mice. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 674–685.
210. Burger, R.A.; Brady, M.F.; Bookman, M.A.; Fleming, G.F.; Monk, B.J.; Huang, H.; Mannel, R.S.; Homesley, H.D.; Fowler, J.; Greer, B.E.; Boente, M.; Birrer, M.J.; Liang, S.X. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2473–2483.
211. Van Cutsem, E.; Peeters, M.; Bridgewater, J.; Cunningham, D.; Rivera, F.; Berry, S.; Kretzschmar, A.; Michael, M.; DiBartolomeo, M.; Mazier, M.-A.; Canon, J.-L.; Georgoulas, V. Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann. Oncol.* **2009**, *20*, 1842–1847.
212. Dvorak, H.F. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 4368–4380.
213. Rougier, P.; Riess, H.; Manges, R.; Karasek, P.; Humblet, Y.; Barone, C.; Santoro, A.; Assadourian, S.; Hatteville, L.; Philip, P.A. Randomised, placebo-controlled, double-blind, parallel-group phase III study evaluating aflibercept in patients receiving first-line treatment with gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 2633–2642.
214. Kindler, H.L.; Niedzwiecki, D.; Hollis, D.; Sutherland, S.; Schrag, D.; Hurwitz, H.;

Innocenti, F.; Mulcahy, M.F.; O'Reilly, E.; Wozniak, T.F.; Picus, J.; Bhargava, P.; Mayer, R.J.; Schilsky, R.L.; Goldberg, R.M. Gemcitabine Plus Bevacizumab Compared With Gemcitabine Plus Placebo in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: Phase III Trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3617–3622.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Progressionsmodell des PDAC.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Invasions-Metastasierungskaskade von Karzinomen.	7
Abbildung 3: Zelluläre Bestandteile der Mikroumgebung einer physiologischen oder entzündlichen Leber.	10
Abbildung 4: Das TRAIL-Rezeptorsystem und seine Funktionen.	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung des klinisch adaptierten Resektionsmodell.	30
Abbildung 6: Schematische Darstellung des verwendeten indirekten Kokultursystems.	36
Abbildung 7: Verlängerte indirekte Kokultur mit Wechsel der hepatischen Stroma-Bedingungen.	37
Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.	44
Abbildung 9: Schematische Erklärung des LEGENDplex™-Systems.	46
Abbildung 10: Unterdrückung der TRAIL-R2 Expression vermindert die post-operative Lebermetastasierung in einem klinisch-adaptierten Mausmodell des PDAC.	49
Abbildung 11: Nanometastasen aus Tieren, die mit shTRAIL-R2 PancTu-I Zellen inokuliert wurden, sind vermindert proliferativ aktiv.	51
Abbildung 12: Operation induziert lokale Zytokin-vermittelte Entzündungsreaktion in der Leber <i>in vivo</i> .	53
Abbildung 13: Charakterisierung der Genexpression von HSC- und HMF-assoziierten Markern in den Lebern nicht operierter und operierter Mäuse.	55
Abbildung 14: Kokultur mit HSC und HMF beeinflusst das Wachstumsverhalten von PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus.	57
Abbildung 15: Untersuchung der TRAIL-Rezeptor Expression in PancTu-I nach Kokultur mit HSC oder HMF.	58
Abbildung 16: Wechsel der Kokultur von HSC auf HMF kann die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation in PancTu-I shTR2 Zellen nur bedingt aufheben.	59
Abbildung 17: Bestimmung von Zytokinen, welche den Einfluss von HSC auf PDAC Zellen mit moduliertem TRAIL-Rezeptorstatus vermitteln.	61
Abbildung 18: Die HSC-vermittelte Unterdrückung der Proliferation von PancTu-I shTR2 Zellen ist IL-8 abhängig.	62
Abbildung 19: TNF- α erhöht nicht die Proliferation der PDAC Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung.	64
Abbildung 20: Die Steigerung der PDAC Zellproliferation nach HMF Kokultur wird unabhängig vom TRAIL-Rezeptorstatus durch VEGF vermittelt.	66
Abbildung 21: Vorgeschlagenes grafisches Modell der Interaktion von PDAC Zellen mit verschiedener TRAIL-R2 Expression und der physiologischen bzw. entzündlichen Lebermikroumgebung.	83

Veröffentlichungen

In peer-reviewed Journalen:

L. Miarka*, C. Hauser*, O. Helm, D. Holdhof, J.-H. Egberts, J.-P. Gundlach, L. Lenk, S. Rahn, W. Mikulits, A. Trauzold and S. Sebens. The hepatic microenvironment and TRAIL-R2 impact outgrowth of liver metastasis in pancreatic cancer after surgical resection. *Cancers*. 2019; 11, 745.

A. Fabian, S. Stegner, **L. Miarka**, J. Zimmermann, L. Lenk, S. Rahn, J. Buttlar, F. Viol, H. Knaack, D. Esser, S. Schäuble, P. Großmann, G. Marinos, R. Häsler, W. Mikulits, D. Saur, C. Kaleta, H. Schäfer and S. Sebens. Metastasis of pancreatic cancer: An uninflamed liver micromilieu controls cell growth and cancer stem cell properties by oxidative phosphorylation in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Letters*. 2019; 453:95-106.

H. Knaack, L. Lenk, L.-M. Philipp, **L. Miarka**, S. Rahn, F. Viol, C. Hauser, J.H. Egberts, J.-P. Gundlach, O. Will, S. Tiwari, W. Mikulits, U. Schumacher, J.G. Hengstler, S. Sebens. Liver metastasis of pancreatic cancer: the hepatic microenvironment impacts differentiation and self-renewal capacity of pancreatic ductal epithelial cells. *Oncotarget*. 2018; 9:31771-31786.

*Geteilte Erstautorenschaft

Kongressbeiträge

L. Miarka, C. Hauser, K. Legler, J.H. Egberts, O. Helm, W. Mikulits, A. Trauzold, S. Sebens. (2017). Role of TRAIL death receptor 5 in metastasis of pancreatic cancer. Posterbeitrag auf dem Pancreas Spring Meeting Göttingen 2017, Georg-August-Universität Göttingen

Danksagung

Susanne Sebens danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit in Ihrer Gruppe anzufertigen. Deine Positivität und Herangehensweise haben mich nachhaltig für die Forschung begeistert. Ich danke dir für die vielen gedankenanstoßenden Diskussion, das Schreiben unzähliger Empfehlungsschreiben und deine tatkräftige Unterstützung aller meiner Unternehmungen. Ich schätze mich sehr glücklich dich als (hoffentlich lebenslange) Mentorin zu haben!

Großen Dank bin ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe verpflichtet: Dagmar Leisner, unser aller Fels in der Brandung, danke ich für die stetige Geduld und Hilfsbereitschaft;

Ole Helm, Sascha Rahn und Lennart Lenk danke ich für die vielen unterhaltsamen Stunden innerhalb und außerhalb des Labores, aber auch für die großartige Betreuung in den Hoch und Tiefs dieser Arbeit. Auch ihr habt einen großen Teil zu meiner Begeisterung für die Wissenschaft beigetragen!

Allen restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die Heiterkeit und den Zusammenhalt über die Jahre.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Ko-Betreuerin Anna Trauzold bedanken, dass sie immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für Fragen und Ideen hatte. Auch die Mitglieder der Arbeitsgruppe Trauzold sowie unsere Chirurgin Charlotte Hauser haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, Vielen Dank!

Der medizinischen Fakultät sowie dem Ärzteverein Schleswig-Holstein danke ich für die Unterstützung mit einem Promotions- sowie einem Reisestipendium.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Stefanie Beese und Ralf Miarka, sowie meinem Stiefvater Stefan Beese. Ihr habt mich immer in jeglichen Lebenslagen und Unternehmungen selbstlos unterstützt, mir Mut zugeredet und mir in jeder Hinsicht ermöglicht mich zu dem entwickeln zu können, der ich jetzt bin. Dafür danke ich euch von ganzem Herzen. Auch Anne Lauw danke ich die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.