

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Thomas Becker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS
TUMORASSOZIIERTER FIBROBLASTEN SOWIE PERINEURALSCHIEDEN
AUF PROLIFERATION UND MIGRATION
BEIM CHOLANGIOZELLULÄREN KARZINOM

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

vorgelegt von
JANNIK KERBER
aus Rendsburg

Kiel 2023

1. Berichterstatter:	<u>Prof. Dr. med. Thomas Becker</u>
2. Berichterstatter/in:	<u>Prof. Dr. med. Mark Ellrichmann</u>
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>20.01.2025</u>
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	<u>22.10.2024</u>
gez.:	<u>Prof. Dr. med. Thomas Becker</u>
	<i>(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)</i>

Inhaltsverzeichnis

I.	GLOSSARIUM	III
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS CHOLANGIOZELLULÄRE KARZINOM	1
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Klassifizierung</i>	<i>1</i>
1.1.3	<i>Ätiologie und Riskofaktoren</i>	<i>1</i>
1.1.4	<i>Prognose und Therapieoptionen</i>	<i>2</i>
1.1.5	<i>Behandlung mit Sorafenib</i>	<i>2</i>
1.1.6	<i>Entzündung und Karzinogenese</i>	<i>3</i>
1.1.7	<i>Genetik</i>	<i>4</i>
1.2	EINFLUSS DES TUMORSTROMAS	4
1.2.1	<i>Tumorassozierte Fibroblasten (CAFs)</i>	<i>5</i>
1.2.2	<i>Tumorassozierte Schwann-Zellen</i>	<i>7</i>
1.3	SIGNALWEGE	8
1.4	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	11
2	MATERIAL	12
2.1	GERÄTE	12
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	12
2.3	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	13
2.4	PUFFER.....	14
2.5	KITS	15
2.6	ANTIKÖRPER	15
2.7	ZELLKULTUR.....	16
3	METHODEN.....	17
3.1	IMMUNHISTOCHEMIE	17
3.1.1	<i>Gewebeschnitte aus Resektaten von Spendern mit CCC.....</i>	<i>17</i>
3.1.2	<i>Immunhistochemische Färbungen.....</i>	<i>17</i>
3.2	ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN CAFs	18
3.3	ZELLKULTUR.....	18
3.4	MYKOPLASMEN-PCR (POLYMERASE-KETTENREAKTION)	19
3.5	PROLIFERATIONS-ASSAY	20
3.6	PARAKRINES-INTERAKTIONS-MODELL ZUR UNTERSUCHUNG DER ZELLMIGRATION	20
3.7	WESTERN BLOT-ANALYSE.....	22
3.7.1	<i>Prinzip.....</i>	<i>22</i>
3.7.2	<i>Herstellung des konditionierten Mediums.....</i>	<i>23</i>
3.7.3	<i>Zellbehandlung und Stimulation.....</i>	<i>23</i>
3.7.4	<i>Lyse und Proteinextraktion.....</i>	<i>23</i>
3.7.5	<i>Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay (Bio-Rad) und Konzentrationseinstellung.....</i>	<i>24</i>
3.7.6	<i>SDS-PAGE.....</i>	<i>24</i>
3.7.7	<i>Western Blot.....</i>	<i>24</i>
3.7.8	<i>Immunnachweis der Proteine.....</i>	<i>25</i>
3.8	HUMAN CYTOKINE ARRAY-KIT	25
3.8.1	<i>Prinzip.....</i>	<i>25</i>

3.8.2	Herstellung der Zellkulturüberstände	26
3.8.3	Durchführung	26
3.9	β-NERVE-GROWTH-FACTOR-ELISA -KIT	26
3.10	STATISTISCHE AUSWERTUNG	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	DIE PRÄSENZ ASMA- UND FSP-1- POSITIVER CAFs IM TUMORSTROMA KORRELIERT MIT SCHLECHTEREM TUMORFREIEN ÜBERLEBEN	28
4.2	EINFLUSS VON TUMORASSOZIIERTEN FIBROBLASTEN (CAFs) AUF DIE MIGRATION INTRA- UND EXTRAHEPATISCHER CCC-ZELLINIEN	29
4.2.1	Erhöhte Migration der intra- und extrahepatischen CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 in Cokultivierung mit den CAFs	29
4.2.2	Inhibierung des Zellwachstums durch Sorafenib in beiden CCC-Zelllinien, marginale Hemmung in den CAFs.....	32
4.2.3	Sorafenib hemmt erhöhte Migration beider CCC-Zelllinien in Cokultur mit CAFs.....	34
4.2.4	Erhöhte Zytokinsekretion in Cokultur mit CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 und CAFmH sowie Reduktion dieser durch Sorafenib	35
4.2.5	Einfluss von konditioniertem CAFmH-Medium auf die Signaltransduktion in der intra-und extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1	37
4.3	DIE PRÄSENZ S100-POSITIVER SCHWANN´SCHER ZELLEN IM TUMORSTROMA BEI CCC-PATIENTEN KORRELIERT MIT SCHLECHTEREM TUMORFREIEN ÜBERLEBEN	39
4.4	EINFLUSS VON PERINEURALSCHIEDEN (HSC) AUF DIE MIGRATION INTRA- UND EXTRAHEPATISCHER CCC-ZELLINIEN	40
4.4.1	Erhöhte Migration der HSC in Cokultivierung mit intra- und extrahepatischer CCC-Zelllinie HuCCT-1 bzw. TFK-1.....	40
4.4.2	Inhibierung des Zellwachstums durch Sorafenib in den Schwann´schen Zellen (HSC).....	43
4.4.3	Erhöhte Zytokinsekretion in Cokultur mit CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 und HSC sowie keine Hemmung durch Sorafenib.	44
4.4.4	Einfluss von konditioniertem HSC-Medium auf die Signaltransduktion in der intra- und extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1	45
4.5	EINFLUSS VON CAFs UND PERINEURALSCHIEDEN AUF DIE MIGRATION DER INTRA- UND EXTRAHEPATISCHER CCC-ZELLINIEN HUCCT-1 UND TFK-1	47
4.5.1	Kein synergistischer Effekt auf die Migration der mit beiden Stromazelllinien kokultivierten intra- bzw. extrahepatischen CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1.....	47
4.5.2	Reduzierte Sorafenibempfindlichkeit der mit beiden Stromazelllinien kokultivierten extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1, kein veränderter Effekt in der Cokultur mit der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1	49
4.5.3	Kein synergistischer Effekt der mit beiden Stromazelllinien CAFmH und HSC kokultivierten intra- bzw. extrahepatischen CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 auf die Zytokinfreisetzung.....	50
4.5.4	Kein synergistischer Effekt auf die Signaltransduktion in der intra- bzw. extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1 nach Stimulation mit konditioniertem CAFmH- und HSC-Kulturmedium detektierbar	52
5	DISKUSSION	54
6	ZUSAMMENFASSUNG	65
III.	LITERATURVERZEICHNIS.....	VIII
IV.	ANHANG	XVII

I. Glossarium

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BF	Brightfield (Hellfeld)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAFs	cancer-associated fibroblasts (Tumorassoziierte Fibroblasten)
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CM	Konditioniertes Medium
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL-1	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1
CXCL-8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAB	3, 3 -diaminobenzidine
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
Eppi	Mikroreaktionsgefäß
Erk	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
et al.	und andere (et alia)
FAP	fibroblast-activation-protein
FCS	Fetales Kälberserum
FSP-1	fibroblast-specific protein 1
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81\text{m/s}^2$)
g	Gramm
GFAP	saures Gliafaserprotein
h	Stunden
HCC	hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Humane Schwann-Zellen
IGEPAL CA 630	Octylphenoxypolyethoxyethanol
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Inkl.	inklusive
JAK	Januskinasen
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
k-ras	K-rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Liter
M	molar [mol/l]

mA	Milliampere
mAb	monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1/CCL-2	Human monocyte chemoattractant protein-1
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mg	Milligramm
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
min	Minuten
mL	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Nonylphenolethoxylate
p	p-Wert
pAkt	phosphorylierte Proteinkinase B
PBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGFR- β	Platelet-derived growth factor receptor beta
pERK	phosphorylierte Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase
PI3-K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
pJNK	phosphorylierte c-Jun N-terminale Kinase
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
pSTAT-3	phosphorylierter Signal Transducers and Activators of Transcription 3
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf-Kinasen)
RAS	Rat sarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SAPK	stress-activated phospho-kinases
SCM	Schwann Cell Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunden
Serpin E1/PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
SMAD-4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SOX-10	SRY-related HMG-Box 10
β NGF	β Nerve Growth Factors
STAT-3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
t	Zeitpunkt
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline + Tween
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TP53	tumor protein p53
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)aminomethan

UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Rezeptoren des Vascular Endothelial Growth Factors
α SMA	α -smooth muscle actin
μ G	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromol

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1:	Untersuchung der Zellmigration mittels ibidi-Platte	21
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung des Vorgehens [modifiziert nach ibidi®]	21
Abb. 4.1:	Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung mit α SMA (a) bzw. FSP-1 (b) im Tumorstroma beim CCC mit tumorfreiem Überleben	28
Abb. 4.2:	Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1 und CAFmH nach 18h	29
Abb. 4.3:	Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1, CAFmH sowie deren Cokultur nach 18 h - Quantifizierung	30
Abb. 4.4:	Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1 und CAFmH nach 68h	31
Abb. 4.5:	Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1, CAFmH sowie deren Cokultur nach 68 h - Quantifizierung	31
Abb. 4.6:	Dosis-Wirkungs-Kurven mit Sorafenib für beide CCC-Zelllinien und CAFs	33
Abb. 4.7:	Parakrines-Interaktions-Modell - Behandlung mit 1 μ M Sorafenib	34
Abb. 4.8:	Unterschiede in der Zytokinfreisetzung durch CAFmH, beide CCC-Zelllinien bzw. während der Cokultur sowie inhibierende Auswirkungen durch Applikation von 1 μ M Sorafenib	36
Abb. 4.9:	Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des MAPK-, PI3K-Akt sowie JAK-STAT-Signalweges	38
Abb. 4.10:	Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges	39
Abb. 4.11:	Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung mit S100 im Tumorstroma beim CCC mit tumorfreiem Überleben	40
Abb. 4.12:	Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1 und HSC nach 18h	41
Abb. 4.13:	Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1 und HSC nach 18h	41
Abb. 4.14:	Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1, HSC sowie deren Cokultur nach 18 h – Quantifizierung	42
Abb. 4.15:	Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1, HSC sowie deren Cokultur nach 18 h – Quantifizierung	42
Abb. 4.16:	Dosis-Wirkungs-Kurven mit Sorafenib für die HSC	43
Abb. 4.17:	Unterschiede in der Zytokinfreisetzung bei HSC, beiden CCC-Zelllinien und deren Cokultur sowie inhibierende Auswirkungen durch Applikation von 1 μ M Sorafenib	44

Abb. 4.18:	Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem HSC-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des MAPK-, und des PI3K-Akt-Signalweges	46
Abb. 4.19:	Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem HSC-Medium führt zu keiner verstärkten Aktivierung in den getesteten Signalwegen	47
Abb. 4.20:	Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1 bzw. TFK-1 in Cokultur mit beiden Stromazelllinien CAFmH und HSC	48
Abb. 4.21:	Parakrines-Interaktions-Modell - Behandlung mit 1µM Sorafenib	49
Abb. 4.22:	Vergleich der Zytokinfreisetzung zwischen mit HuCCT-1 bzw. TFK-1 kokultivierten CAFmH, HSC und beiden Stromazelllinien sowie inhibierende Auswirkungen durch Applikation von 1µM Sorafenib	51
Abb. 4.23:	Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Medium führt zu einer verstärkten Aktivierung des JAK-STAT-, des MAPK- und des PI3K-Akt-Signalweges	52
Abb. 4.24:	Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Medium führt zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges	53

1 Einleitung

1.1 Das cholangiozelluläre Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Beim cholangiozellulären Karzinom (CCC) handelt es sich um einen seltenen, primär malignen Tumor der Gallenwege. Die jährliche Erkrankungsrate beträgt 0,4-1,8/100 000 Einwohner in Europa, die Inzidenz ist jedoch seit Dekaden steigend (Khan, Thomas, Davidson, & Taylor-Robinson, 2005). Insbesondere beim intrahepatischen CCC ist die Mortalitätsrate um 9 % auf 0,75-1,1/ 100 000 Europäer gestiegen und entspricht somit nahezu der Inzidenz (Bertuccio et al., 2013; Tyson & El-Serag, 2011). Dabei sind Männer etwas häufiger betroffen als Frauen. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters mit einem Höhepunkt/ Manifestation in der 7. Lebensdekade, wohingegen eine Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr eine Rarität darstellt (Tyson & El-Serag, 2011).

1.1.2 Klassifizierung

Das CCC wird nach anatomischer Lokalisation in intrahepatisch und extrahepatisch klassifiziert, wobei das extrahepatische CCC weiterhin in einen perihilären und distalen Subtyp unterteilt werden kann (Blechacz, Komuta, Roskams, & Gores, 2012). Der perihiläre Subtyp umfasst den Bereich des linken sowie rechten Ductus hepaticus, die Hepaticusgabel und den Ductus choledochus bis zum Abgang des Ductus cysticus (Blechacz, 2017; Rizvi & Gores, 2013). Ein CCC an der Hepaticusgabel wird als Klatskin Tumor bezeichnet, die Klassifizierung dieses Tumors erfolgt nach einer erweiterten Klassifizierung nach Bismuth und Corlette (Bismuth & Corlette, 1975; Deoliveira et al., 2011). Ein Gallengangskarzinom im Bereich des Ductus cysticus bis zur Ampulla Vateri wird als distales CCC bezeichnet (Blechacz, 2017; Rizvi & Gores, 2013).

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Das cholangiozelluläre Karzinom entstammt entarteten Gallengangsepithelien, dessen Entstehung womöglich durch eine chronische Entzündung begünstigt wird. Jedoch entstehen die meisten CCC eher sporadisch und sind nicht definitiv auf einen Risikofaktor zurückzuführen (Bridgewater et al., 2014; Razumilava & Gores, 2013; Tyson & El-Serag, 2011). Neben dem bereits erwähnten fortgeschrittenen Alter als Risikofaktor für die Ausbildung eines CCC sind vor allem Erkrankungen, die mit einer chronischen Inflammation der Gallengänge einhergehen, relevant. Diese variieren jedoch je nach geografischer Lage aufgrund der unterschiedlichen Prävalenzen.

So stellt in Südostasien eine Infektion mit den Parasiten *Opisthorchis viverrini* oder *Clonorchis sinensis* den größten Risikofaktor dar, gefolgt von Hepatolithiasis, kongenitalen Gallengangszysten sowie dem Caroli Syndrom (Tyson & El-Serag, 2011). In der westlichen Welt hingegen ist die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) der bedeutendste Risikofaktor (Rizvi, Eaton, & Gores, 2015). 5-10% der an PSC Erkrankten entwickeln im Verlauf ein CCC (Lutz, Trautwein, & Tischendorf, 2013; Razumilava & Gores, 2013).

Weitere Risikofaktoren, die insbesondere verstärkt mit der Ausbildung eines intrahepatischen CCC assoziiert sind, sind Infektionen mit Hepatitis B und C sowie der daraus resultierenden Zirrhose. Zudem können Diabetes mellitus, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Gallensteine sowie exzessiver Alkoholkonsum, Rauchen oder andere Toxine die Entstehung eines CCC begünstigen (Palmer & Patel, 2012; Tyson & El-Serag, 2011).

1.1.4 Prognose und Therapieoptionen

Die chirurgische Resektion des Tumors stellt bislang die einzige kurative Therapie dar. Leider wird bei der Mehrheit der Patienten die Erkrankung erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, weshalb eine Operation oftmals nicht mehr möglich ist (Bridgewater et al., 2014; Squadroni et al., 2017). Die Prognose ist äußerst schlecht. Bei *in sano* resezierten Tumoren beträgt die 5 Jahres-Überlebensrate im Mittel lediglich ca. 40% (Blechacz, 2017; DeOliveira et al., 2007). Zudem bilden ca. 50 % dieser Patienten in den darauffolgenden Jahren ein Rezidiv aus (Squadroni et al., 2017).

Vor diesem Hintergrund ist oftmals lediglich eine palliative Therapie indiziert, deren Standard eine Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin und Cisplatin darstellt (Bridgewater et al., 2014). Partikular kann durch eine Radiochemotherapie die Lebensqualität sowie Überlebensrate bei diesen Patienten verbessert werden. Eine Lebertransplantation beim intrahepatischen CCC wird aufgrund der hohen Rezidivrate nur in seltenen Fällen empfohlen. Weitere mögliche Alternativen sind die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die intraarterielle Chemotherapie sowie die Radiofrequenzablation (RFA), bei denen jedoch zusätzliche Studien notwendig sind, um einen möglichen Benefit zu bekräftigen (Blechacz, 2017; Squadroni et al., 2017).

1.1.5 Behandlung mit Sorafenib

Bei Sorafenib handelt es sich um einen Multityrosinkinaseinhibitor, der durch Hemmung intrazellulärer rapidly accelerated fibrosarcoma-Kinasen (Raf-Kinasen) und des Platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR-β) gezielt die Proliferation von Tumorzellen hemmen kann.

Durch Inhibierung der Tyrosinkinase der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Rezeptoren kann zudem die Tumorangiogenese reduziert werden. Überdies ist Sorafenib in der Lage, die Apoptoserate der Tumorzellen zu erhöhen (Llovet et al., 2008; Wilhelm et al., 2004). Der Multityrosinkinaseinhibitor wird bereits seit Jahren erfolgreich beim fortgeschrittenen HCC sowie beim renalen Karzinom eingesetzt. Sorafenib war dabei die erste palliative Therapieoption beim hepatozellulären Karzinom (HCC), die das Gesamtüberleben der Patienten signifikant verbessern konnte (Pang & Poon, 2007; Szczylik et al., 2007).

Analog zum HCC konnte beim CCC ebenfalls eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalweges, welcher die Raf-Kinasen beinhaltet, nachgewiesen werden. Weitere Forschungen ergaben, dass das Wachstum von CCC-Zellen nach Applikation von Sorafenib deutlich reduziert werden konnte (Baradari, Höpfner, Huether, Schuppan, & Scherübl, 2007; Huether, Hopfner, Baradari, Schuppan, & Scherubl, 2007; Wang et al., 2009). Aktuelle klinische Studien zeigten jedoch, dass das Gesamtüberleben von CCC-Patienten durch Sorafenib nicht signifikant verbessert werden konnte (Moehler et al., 2014).

1.1.6 Entzündung und Karzinogenese

Die chronische Entzündung scheint nach aktuellem Kenntnisstand eine wichtige Funktion in der Entstehung des CCC einzunehmen. Wie bereits im Abschnitt 1.1.3 erwähnt, stellt die PSC als chronische Entzündung der Gallengänge die häufigste Prädisposition für die Ausbildung eines CCC in den westlichen Ländern dar. Dieses inflammatorische Milieu führt schließlich zur vermehrten Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Proliferation, Apoptose sowie Zellzyklus-Regulation beeinflussen und somit zur Krebsentstehung beitragen können (Rizvi & Gores, 2013). Zusätzlich trägt die vermehrte Zytokinexpression durch Induktion von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NO-Synthasen) zur Ausbildung von oxidativen Stress bei, wodurch wiederum DNA-Schäden und eine Hemmung der DNA-Reparatur-Enzymen resultieren (Jaiswal, Larusso, & Burgart, 2000; Jaiswal, LaRusso, Shapiro, Billiar, & Gores, 2001). Eine Cholestase kann ebenfalls die Entstehung eines CCC begünstigen. Das vermehrte Vorkommen von Gallensäuren, insbesondere oxidierten Gallensäuren, führt zur verstärkten Expression der Cyclooxygenase 2, die mit der Karzinogenese des CCC assoziiert wird (Rizvi, Borad, Patel, & Gores, 2014).

Des Weiteren sind Gallensäuren via Rezeptor-Tyrosinkinasen in der Lage, Einfluss auf die Proliferation zu nehmen, was ebenfalls zur Bildung einer Neoplasie beitragen kann (Rizvi et al., 2014; Rizvi & Gores, 2013).

1.1.7 Genetik

Wie auch bei vielen anderen Tumorerkrankungen bedarf es auch zur Ausbildung eines cholangiozellulären Karzinoms mehrerer genetischer Mutationen. Diese aufeinanderfolgenden genetischen Veränderungen führen zur Dysregulation in Wachstum, Zellzyklus, Apoptose sowie Angiogenese und somit schrittweise zur Transformation des physiologischen Gallengangepithels in ein Adenokarzinom (Serafini & Radvinsky, 2016; Squadroni et al., 2017). Es wurde eine Vielzahl an Genen identifiziert, die mit der Entstehung eines CCC assoziiert sind. Die häufigsten Vertreter sind das Onkogen K-Rat sarcoma (K-RAS), die Tumorsuppressorgene tumor protein p53 (TP53) und Mothers against decapentaplegic homolog 4 (SMAD-4), Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) sowie Chromatin-modifizierende Gene (Squadroni et al., 2017).

Das K-RAS-Genprodukt ist in Proliferation, Differenzierung sowie Überleben einer Zelle involviert. Es stellt insbesondere beim perihilären Gallengangskarzinom eine der häufigsten Mutationen dar, die folglich mit einer verschlechterten Prognose assoziiert ist. Der Verlust des Tumorsuppressors TP53 infolge von Mutationen tritt zumeist im fortgeschrittenem Tumorstadium auf und ist ebenfalls mit einem verringerten Überleben assoziiert. Eine geringe Expression des Tumorsuppressors SMAD4 konnte hauptsächlich im fortgeschrittenen intrahepatischen CCC detektiert werden. Dies führt zu einer fehlenden Transforming Growth Factor β (TGF- β) vermittelten Wachstumsinhibierung der Cholangiozyten, wodurch die Prognose ähnlich zu Mutationen in K-RAS und TP53 deutlich verschlechtert wird. Eine Überexpression von Mitgliedern der Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie (EGFR-Familie) führte einerseits im Tiermodell zur Ausbildung eines Gallengangtumors, konnte andererseits jedoch auch in kleinen klinischen Studien bei Patienten mit CCC nachgewiesen werden (Rizvi et al., 2014; Rizvi & Gores, 2013; Serafini & Radvinsky, 2016; Squadroni et al., 2017).

1.2 Einfluss des Tumorstromas

Das Tumorstroma ist ein wichtiger Bestandteil solider Tumoren und spielt eine essentielle Rolle bei der Entstehung und Progression von Krebserkrankungen. Das gesunde Stroma besteht physiologisch aus vereinzelt Fibroblasten, Blutgefäßen, Nerven sowie der extrazellulären Matrix (EZM) und ist durch eine Basalmembran von der oberhalb gelegenen Epithelschicht räumlich getrennt (Santi, Kugeratski, & Zanivan, 2018). Eine Entartung in der Epithelzellschicht führt anfangs zu einem sogenannten *Carcinoma in situ*, welches sich lediglich auf diese Zellschicht beschränkt und folglich die Basalmembran noch nicht durchbrochen hat.

Die fortschreitende maligne Transformation führt unter Ausbildung invasiver Eigenschaften schließlich zum Durchbruch der Basalmembran-Barriere und zur Einwanderung der Tumorzellen ins Stroma. Der daraus ermöglichte direkte Kontakt zwischen Tumor- und Stromazellen sowie parakrine Interaktionen untereinander begünstigen eine Veränderung des ursprünglichen Stromas hin zu einem entzündlichen Tumorstroma, welches auch als *Tumor Microenvironment* bezeichnet wird (Hanahan & Weinberg, 2000; Santi et al., 2018). Einige Studien konnten zudem sogar zeigen, dass unter anderem ein durch Stress induziertes entzündliches Stroma die maligne Transformation eines *Carcinoma in situ* ebenfalls fördern und schließlich eine Nische für den Tumor darstellen kann (Gascard & Tlsty, 2016). Charakteristisch für dieses entzündliche Tumorstroma sind die erhöhte Anzahl an aktivierten Myofibroblasten, Blut- und Lymphgefäße, Perizyten, Immunzellen wie unter anderem Makrophagen und Lymphozyten sowie eine veränderte Zusammensetzung in der EZM, die verstärkt an einen physiologischen Wundheilungsprozess erinnern (Quail & Joyce, 2013).

Die Bildung neuer Blutgefäße, auch als Angiogenese bezeichnet, ist ein essentieller Prozess, der eine ausreichende Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Im Vergleich zum physiologischen Stroma sind die Blutgefäße im Tumorstroma strukturell instabil und oftmals dysfunktional. Durch ihre erhöhte Permeabilität wird zudem ein invasives Wachstum des Tumors begünstigt (Comen, Bowman, & Kleppe, 2018). Die erhöhte Anzahl an aktivierten Fibroblasten führt wiederum zu einer verstärkten Produktion an EZM-Proteinen, vor allem Kollagen, Fibronectin und Proteoglycanen, weshalb dieses Tumorstroma auch als desmoplastisches Stroma bezeichnet wird. Insbesondere das CCC besitzt einen hohen Anteil an desmoplastischem Stroma (Kalluri & Zeisberg, 2006; Rizvi & Gores, 2013). Des Weiteren können mithilfe von sezernierten Enzymen an der EZM gebundene Substanzen wie VEGF proteolytisch abgespalten werden und somit zur Tumorprogression beitragen (Santi et al., 2018).

1.2.1 Tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs)

Bei Fibroblasten handelt es sich um spindelförmige Zellen, die im Bindegewebe der meisten Organe anzutreffen sind. Sie proliferieren langsam und tragen durch Produktion von Komponenten der EZM sowie spezifischer Enzyme maßgeblich zur Homöostase des physiologischen Stromas bei. Infolge einer Gewebsverletzung kommt es aufgrund der Sekretion mehrerer Wachstumsfaktoren zur Aktivierung der Fibroblasten zu sogenannten Myofibroblasten, die maßgeblich am Wundheilungsprozess beteiligt sind (Cirri & Chiarugi, 2012; Gabbiani, Ryan, & Majne, 1971). Diese aktivierten Fibroblasten weisen nun neben einer verstärkten Proliferation zudem durch eine erhöhte Expression von alpha-smooth-muscle-actin (α SMA) sogenannte kontraktile Fasern und dadurch eine erhöhte Motilität auf (Tomasek, Gabbiani, Hinz, Chaponnier, & Brown, 2002).

Auch das Tumorstroma kann Myofibroblasten aufweisen. Im Gegensatz zur physiologischen Wundheilung ist die Aktivierung der Fibroblasten im Tumorstroma jedoch nicht transient, sondern dauerhaft, wodurch die Theorie vom Krebs als niemals heilende Wunde nach Dvorak et al. zusätzlich bekräftigt wird (Dvorak, Flier, & Underhill, 1986; Shiga et al., 2015).

Anders als im Wundheilungsprozess werden die Myofibroblasten im Tumorstroma als tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs) bezeichnet (Dvorak et al., 1986; Shiga et al., 2015). Der Ursprung dieser Zellen ist sehr vielfältig und beinhaltet unter anderem residente Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, hämatopoetische Stammzellen, epitheliale Zellen via Epithelialer-Mesenchymaler-Transition (EMT) sowie endotheliale Zellen via Endothelialer-Mesenchymaler-Transition (Shiga et al., 2015). Die Stimulation der CAFs erfolgt durch zahlreiche Zytokine wie beispielsweise Interleukin 6 (IL-6), TGF- β sowie via Proteinen der Matrix-Metalloproteinasen oder der EMT (Ungefroren, Sebens, Seidl, Lehnert, & Hass, 2011). Die Vielzahl an Stimuli und Abstammungsmöglichkeiten führen zu einer heterogenen Population an CAFs, die je nach Tumor variieren kann, wodurch eine Charakterisierung deutlich erschwert wird. Erhöhte Expressionen von α SMA, Vimentin, Fibroblast-Specific Protein 1 (FSP-1) und/oder Fibroblast-Activation-Protein (FAP) sowie eine Repression von CD36 stellen zurzeit die geeignetsten Marker dar, um CAFs von nicht aktivierten Fibroblasten zu differenzieren (Santi et al., 2018).

CAFs können durch Sekretion von Zytokinen und Veränderungen der EZM ein inflammatorisches Milieu kreieren und sind somit in der Lage, die Entstehung, Proliferation, Migration, Angiogenese sowie Metastasierung von Tumoren zu beeinflussen. So konnten Olumi et al. bereits 1999 im Mausmodell zeigen, dass humane CAFs Tumorwachstum in der Prostata förderten, während normale Fibroblasten keinen Einfluss hatten. Auch beim intrahepatischen CCC konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Präsenz α SMA-positiver Fibroblasten mit einer verschlechterten Prognose korreliert (Sirica, 2011). Die vermehrte Sekretion von Zytokinen durch tumorassoziierten Fibroblasten ermöglicht die parakrine Interaktion mit den Tumorzellen und anderen Zellen des Tumorstromas und ist mit einer verstärkten Tumorprogression assoziiert.

Dieser Effekt konnte bereits mithilfe von Tiermodellen beim Brustkrebs, Gebärmutterkrebs sowie beim Melanom beobachtet werden (Alkasalias, Moyano-Galceran, Arsenian-Henriksson, & Lehti, 2018). Zudem können parakrine Interaktionen zwischen CAFs und Krebszellen in vielen Tumoren zu einer erhöhten Sekretion an VEGF führen und somit zu einer gesteigerten Angiogenese beitragen (Quail & Joyce, 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten bereits sogar noch vor der Krebsentstehung mit Krebsvorstufen über Zytokine interagieren können, wodurch die maligne Transformation zum Brustkrebs gefördert wird (Osuala et al., 2015).

Als Hauptproduzent von Komponenten der EZM sowie zahlreicher regulierender Enzyme sind die CAFs wesentlich für deren gravierende Veränderungen verantwortlich. Die daraus resultierende Bildung eines desmoplastischen Stromas – wie es auch beim CCC zu beobachten ist – ist dabei in mehreren Tumorentitäten mit einer verschlechterten Prognose assoziiert. So konnte in Tiermodellen gezeigt werden, dass sich die veränderte EZM ebenfalls stimulierend auf das Wachstum des Bronchialkarzinoms sowie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas auswirkt, was mit einem verschlechtertem Überleben korreliert (Navab et al., 2016; Sato, Kohi, Hirata, & Goggins, 2016). Die erhöhte Steifigkeit des Tumorstromas kann zudem zu einem erhöhten interstitiellen hydrostatischen Druck führen, wodurch die Konzentration an Chemotherapeutika im Tumorgewebe reduziert wird. Begleitet von Veränderungen in Zell-Matrix-Verbindungen durch die CAFs, die zu einer verminderten Apoptoseempfindlichkeit beitragen, resultiert dies in einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika oder sogar in einer Resistenz. Es konnte beobachtet werden, dass durch Präsenz tumorassoziierter Fibroblasten bei Krebszellen des Pankreas die Sensibilität gegenüber Gemcitabin deutlich verringert war (Cirri & Chiarugi, 2012; Gascard & Tlsty, 2016; X.-Y. Li, Hu, & Xiao, 2015). Überdies scheinen tumorassozierte Fibroblasten eine immunsuppressive Wirkung auszuüben, indem sie mit unterschiedlichen tumorassozierten Immunzellen, insbesondere den immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen, interagieren (D. Liao, Luo, Markowitz, Xiang, & Reisfeld, 2009; Z. Liao, Tan, Zhu, & Tan, 2018).

Zusammen mit der immunsuppressiven Wirkung sowie Förderung von EMT begünstigen CAFs die Ausbildung von Metastasen. Dieser Effekt konnte bereits in einer mit CAFs kokultivierten Prostatakrebs- sowie einer Brustkrebszelllinie beobachtet werden (Giannoni et al., 2010; Soon et al., 2013).

1.2.2 Tumorassozierte Schwann-Zellen

Eine weitere, bislang jedoch noch wenig untersuchte Komponente des Tumorstromas sind die sogenannten tumorassozierten oder aktivierten Schwann-Zellen.

Sie leiten sich von den physiologischen Schwann-Zellen ab, die nach ihrem Entdecker Theodor Schwann (1810-1882) benannt sind und als Neuroglia den Hauptbestandteil der peripheren Nerven ausmachen. Schwann'sche Zellen sind für die Entwicklung sowie Versorgung von Neuronen essentiell und ermöglichen durch Ausbildung von Myelinscheiden um die Axone eine optimale Reizweiterleitung sowie Schutz vor Beschädigung (Bunimovich, Keskinov, Shurin, & Shurin, 2017). Zudem sind diese Zellen ein wichtiger Bestandteil bei der Neuroregeneration nach einem traumatischen Ereignis. Im Rahmen einer Nervenschädigung kommt es infolge von Veränderungen in der Genexpression der Schwann'schen Zellen zu einer Reprogrammierung (hin) zu einem differenzierten bzw. aktivierten Phänotyp.

Die Schwann-Zellen proliferieren, werden motiler und bilden die sogenannten Büngner-Bänder aus, die als Leitschienen von einem Ende des verletzten Axons zum anderen dienen (Deborde & Wong, 2017; Jessen, R, & Lloyd, 2015). Die tumorassoziierten Schwann-Zellen weisen dabei eine große Ähnlichkeit zu den während der Neuroregeneration aktivierten Formen auf. Durch Interaktion mit den Tumorzellen sowie durch das Schaffen eines entzündlichen Milieus infolge verstärkter Zytokinexpression scheinen die tumorassoziierten Schwann-Zellen einen maßgeblichen Einfluss auf die Tumorprogression zu haben (Bunimovich et al., 2017). Diese aktivierten Schwann-Zellen konnten bereits bei Pankreas-, Kolon-, Schilddrüsen- sowie Speicheldrüsenkarzinomen vermehrt nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass durch die Präsenz von aktivierten Schwann-Zellen im Tumor die perineurale Invasion begünstigt wird, was wiederum mit einer deutlich verschlechterten Prognose korreliert (Bakst & Wong, 2016; Deborde & Wong, 2017). Bei der perineuralen Invasion handelt es sich um eine erworbene Fähigkeit von Krebszellen, Nerven zu infiltrieren, was zusätzlich mit einer schlechteren Prognose und einer erhöhten Rezidivrate assoziiert ist (Batsakis, 1985; Deborde & Wong, 2017).

So konnten Demir et al. bereits an Pankreas- sowie Kolonkarzinomzelllinien zeigen, dass aktivierte Schwann-Zellen eine verstärkte Affinität zu diesen malignen Zellen aufweisen und bereits vor Beginn der perineuralen Invasion in Richtung Krebszellen migrieren. Der direkte Kontakt mit den Tumorzellen führt über verschiedene zelluläre Mechanismen schließlich zu einer erhöhten perineuralen Invasion (Sylvie Deborde, Tatiana Omelchenko, Anna Lyubchik, Yi Zhou et al., 2016).

Beim CCC wird ebenfalls eine Invasion von Nerven bereits im frühen Tumorstadium sehr häufig beobachtet, die auch hier mit einer erhöhten Rezidivrate sowie verschlechterter Prognose korreliert (Murakami et al., 2013; Shirai et al., 2008).

1.3 Signalwege

Mit Entwicklung der Genomsequenzierung wurde eine neue Dimension in der Tumorforschung kreiert. Mehrere Studien konnten bereits die molekulare Komplexität und Diversität verschiedener Tumorentitäten entschlüsseln, wodurch die Entwicklung einer personalisierten, auf den jeweiligen Tumor abgestimmten Therapie ermöglicht werden konnte (Ciriello, Miller, Aksoy, Senbabaoglu, & Sander, 2015). Insbesondere Mutationen in sogenannten Proto-Onkogenen, die Wachstum, Teilung sowie Differenzierung in jeder Zelle kontrollieren, können zu Dysregulation in Signalwegen und somit zu einem ungehemmten Wachstum führen (Hanahan & Weinberg, 2011).

Einer der am besten charakterisierten Signalkaskaden ist der Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg. Er übernimmt eine wichtige Funktion in der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose.

Dabei binden meistens extrazelluläre Wachstumsfaktoren an sogenannte Rezeptor-Tyrosinkinasen an der Zellmembran, wodurch diese aktiviert werden (Chen, Nelson, Ávila, & Cubero, 2019; Wilhelm et al., 2004). Dies führt anschließend zu einer stufenweisen Weiterleitung des Signals über mehrere Signalproteine mittels Phosphorylierung bis zum Zellkern. Im Zellkern werden daraufhin Wachstumsgene transkribiert, deren Proteine die genannten Zellfunktionen regulieren (Burotto, Chiou, Lee, & Kohn, 2015). Der MAPK-Signalweg stellt dabei nur eine Komponente eines komplexen Netzwerks an Signalkaskaden dar, die sie stimulatorisch oder inhibitorisch untereinander beeinflussen können. Die abnormale Aktivierung des MAPK-Signalweges ist in einer Vielzahl an Tumoren zu finden. Es liegen dabei häufig Mutationen in den Rezeptoren oder in den Signalproteinen RAS und RAF der MAPK-Signalkaskade vor, die somit zu einem uneingeschränkten Wachstum beitragen. RAS-Mutationen sind in circa 25% aller Tumoren zu finden, insbesondere beim Pankreas-, Bronchial- und kolorektalem Karzinom sowie in bis zu 40% aller CCC-Patienten. RAF-Mutationen konnten hingegen sowohl beim kolorektalen Karzinom und Melanom als auch beim papillären Schilddrüsen- und Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. (Hobbs, Der, & Rossman, 2016; Holderfield, Deuker, McCormick, & McMahon, 2014; Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, 2018). Veränderungen in einem der beiden Gene resultiert schließlich in einer verstärkten Aktivierung der nachfolgenden Signalproteine Mitogen-activated protein kinase (MEK) und Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase (ERK).

Neben diesem klassischen MAPK-Signalweg existiert unter anderem die C-Jun-N-terminale Kinasen (JNK)-Signalkaskade als eine weitere Subgruppe des MAPK-Signalweges, deren Aktivierung meist durch intra- oder extrazelluläre Stimuli, insbesondere Stresssignale, erfolgt. Eine persistierende JNK-Aktivierung kann je nach Tumorentität entweder suppressiv oder tumorfördernd wirken. Beim hepatozellulärem Karzinom ist eine verstärkte JNK-Aktivierung mit einer verschlechterten Prognose assoziiert (Bubici & Papa, 2014; Chang et al., 2009). Beim Brustkrebs konnte in Tiermodellen hingegen gezeigt werden, dass eine verstärkte JNK-Expression tumorsuppressive Eigenschaften aufweist (Bubici & Papa, 2014). Auch beim CCC scheint eine verstärkte JNK-Aktivierung Karzinogenese sowie Proliferation von Tumorzellen zu beeinflussen (Chen, Nelson, Ávila, & Cubero, 2019).

Eine weitere Signalkaskade, die bei der Krebsentstehung und -progression eine wichtige Funktion übernimmt, ist der Phosphatidylinositol-3 Kinase/Proteinkinase B-Signalweg (PI3K/AKT-Signalweg). Der PI3K/AKT-Signalweg wird über Rezeptor-Tyrosinkinasen oder auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die eine Vielzahl an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen binden können, aktiviert. Nach Bindung eines Liganden am Rezeptor mit Tyrosinkinasedomäne erfolgt eine Aktivierung durch Autophosphorylierung, dies führt zur Bindung weiterer Moleküle und schließlich zur Aktivierung von PI3K. Diese ermöglicht die Phosphorylierung von Membranlipiden, wodurch daraufhin die Aktivierung von AKT ermöglicht wird.

Aktiviertes AKT ist in der Lage, eine Vielzahl an Substraten zu phosphorylieren und somit Zellwachstum, Motilität, Überleben und Metabolismus zu regulieren (Zhao, Wang, & Tony To, 2015). Eine konstitutive Aktivierung von AKT führt zu einer Dysregulation und konnte bereits in Patienten mit Gallengangs- und Brustkrebs, mit kolorektalem Karzinom und Leukämie beobachtet werden (Kumar, Rajendran, Sethumadhavan, & Purohit, 2013). Zudem war eine persistierende Aktivierung des AKT-Substrats mTOR in verschiedenen *in vitro*- sowie *in vivo*-Experimenten mit verstärktem Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierungen assoziiert (Pópulo, Lopes, & Soares, 2012). Beim CCC scheint eine erhöhte Aktivierung von Akt einerseits einen antiapoptotischen Effekt auszulösen, andererseits möglicherweise Proliferation und ein invasives Wachstum zu fördern (Daya et al., 2018; Gentilini, Pastore, Marra, & Raggi, 2018).

Der sogenannte Januskinasen/ Signal Transducers and Activators of Transcription-Signalweg (JAK/STAT-Signalweg) ist neben der Regulation von Proliferation und Überleben zusätzlich in der Lage, durch Induktion von Faktoren wie VEGF die Angiogenese zu fördern (Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, 2018). Die Bindung verschiedener Zytokine wie IL-6, Wachstumsfaktoren und Interferone am spezifischen Zytokinrezeptor führt zur Dimerisierung zweier JAKs und schließlich zu deren Aktivierung. Daraufhin folgt die Anlagerung zweier STAT-Signalproteine sowie deren Aktivierung via Phosphorylierung.

Aus beiden STAT-Proteinen bildet sich ein Dimer, das in den Zellkern wandert und die Transkription spezifischer Gene einleitet (Pencik, Thi, Pham, Schmoellerl, & Javaheri, 2016; Quintás-Cardama & Verstovsek, 2013). Eine persistierende STAT-Aktivierung infolge von Mutationen im Signalweg oder einem Überangebot an Zytokinen konnte bereits beim Lungen-, Brust- und Prostatakarzinom sowie bei myeloproliferativen Neoplasien beobachtet werden. Dies ging mit einer verstärkten Expression an Zytokinen und deren Rezeptoren einher (Quintás-Cardama & Verstovsek, 2013; Smirnova, Ostroukhova, & Bogorad, 2007). In Mausmodellen führte eine konstitutive STAT-Aktivierung in der Lunge zur Ausbildung einer chronischen Entzündung und Krebsentstehung (Y. Li et al., 2007). Durch Kreieren eines inflammatorischen Milieus scheint eine Überaktivierung von STAT-Protein die Ausbildung eines CCCs zu begünstigen und zudem einen stimulierenden Effekt auf Proliferation und Invasion der Tumorzellen auszuüben (Chen et al., 2018; Dokduang et al., 2014).

Zudem wird dem Tumorstroma ein großer Einfluss in der Tumorprogression via JAK/STAT-Signalweg zugeschrieben. So konnte bereits gezeigt werden, dass von tumorassoziierten Fibroblasten sezerniertes IL-6 einerseits die Metastasierungsrate bei Magenkrebs im Mausmodell, andererseits die Angiogenese beim Kolonkarzinom im Mausmodell fördert (Nagasaki et al., 2014; Wu et al., 2017).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das CCC ist weltweit der häufigste primär maligne Gallengangstumor mit aktuell steigender Inzidenz. Der bisher einzige kurative Therapieansatz ist die frühzeitige chirurgische Resektion, welche jedoch bei Diagnosestellung aufgrund des meist fortgeschrittenen Tumorstadiums nicht mehr möglich ist, sodass nur die Option einer palliativen Therapie mit schlechten Überlebensraten bleibt. Das Tumorstroma hat sich in der letzten Zeit als wesentliche Struktur für die Progression solider Tumoren herausgestellt und bietet einen vielversprechenden Angriffspunkt für den Einsatz zielgerichteter Therapien.

Auch beim CCC, das einen hohen Anteil an desmoplastischem Stroma aufweist, hat die Interaktion des Tumorstromas einen maßgeblichen Einfluss auf die Tumorprogression sowie auch auf die Invasivität. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Präsenz von CAFs in OP-Resektaten von CCC-Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit korreliert. Weiterhin charakteristisch für das CCC ist das frühzeitige Auftreten von perineuraler Invasion, die mit einer erhöhten Rezidivrate sowie verschlechterter Prognose assoziiert ist. Aktivierte Schwann-Zellen, eine noch wenig untersuchte Komponente des Tumorstromas, weisen eine hohe Affinität zu malignen Zellen auf und scheinen bei der perineuralen Invasion mehrerer Tumorentitäten eine Schlüsselfunktion zu übernehmen.

Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, den parakrinen Einfluss von CAFs und Schwann-Zellen auf die Migration von CCC-Zellen zu untersuchen.

Dazu wurde eine immunhistochemische Färbung einer kleinen Kohorte an resezierten CCC-Gewebeschnitten durchgeführt. Hier sollte die Dichte der angefärbten Schwann'schen Zellen und CAFs mit klinischen Daten zum Gesamtüberleben und tumorfreien Überleben korreliert und analysiert werden. Überdies wurde das Wachstumsverhalten einer intrahepatischen und einer extrahepatischen CCC-Zelllinie in Kokultur mit CAFs, Schwann-Zellen oder beiden Stromazellen in einem neu etablierten, fluoreszenzbasierten Parakrinen-Interaktions-Modell untersucht. Eine mögliche Inhibierung der Migration sollte durch Behandlung mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Sorafenib, der bereits erfolgreich zur palliativen Therapie des hepatozellulären Karzinoms eingesetzt wird, erfasst werden, um möglicherweise Einflüsse des Medikaments auf die parakrinen Prozesse zwischen CAFs, Schwann'schen Zellen und Tumorzellen aufzuzeigen. Daraufgehend sollte einerseits ein potentieller parakriner Einfluss der CAFs und Schwann'schen Zellen auf beide CCC-Zelllinien, andererseits der Effekt von Sorafenib auf diese parakrinen Interaktionen mittels Zytokinscreening sowie Western Blots mit Fokus auf den Signalwegen JAK/STAT, MAPK und PI3K/AKT näher ergründet werden.

2 Material

Im Folgenden tabellarisch aufgeführt sind die Geräte und Verbrauchsmaterialien, deren Verwendung im Methodenteil näher erläutert wird.

2.1 Geräte

Gerätename	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer Sub cell GT	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Centrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Consort EV 243 Electrophoresis power supply	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
CURIX 60 Entwickler	AGFA (Mortsel, Belgien)
FORMA Scientific CO ₂ water Jacketed Inkubator	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Heraeus Minifuge T	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Inkubationsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)
Leica DM 1000-Mikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikropipetten (10 µL, 100 µL, 1000 µL)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop Olympus CK2	Olympus (Tokio, Japan)
Neubauer Zählkammer	Laboroptik (Lancing, UK)
NyONE	SYNENTEC (Elmshorn, Deutschland)
Odyssey Infrared Imager	LI-COR (Lincoln, USA)
PAP Pen	Abcam (Cambridge, UK)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, Deutschland)
Power supply PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
SPECTRAFluor Plus Reader	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Sterilbank Biological Safety Cabinets Class II	NUAIRE (Plymouth, USA)
STUART Rollenmixer SRT9	Bibby Scientific Ltd (Stone, UK)
TECAN infinite M200 pro	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
TECAN Sunrise Reader	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Thermocycler T Gradient	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Waage Sartorius BL 3100	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Waage Sartorius BP310S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
XCell II Blot Module	Invitrogen (Novex) (NY, USA)
XCell Mini-Cell SureLock Electrophoresis Cell	Invitrogen (Novex) (NY, USA)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
6-Well-Platte	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
96-Well-Platte	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Biosphere Filter Tips (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Culture-Insert 4 Well in µ-Dish	ibidi (München, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien	Firma
Deckgläser 24x60 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Eppendorf Gefäße 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Immobilon FL Transfer Membrane	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Nunc Polycarbonat-Membraneinsätze in Multischalen (6-Well)	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Objektträger 25x75 mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Primaria Zellkultur-Schalen 100x20mm	Corning (Corning, USA)
Röhre 50 ml, 15 mL	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
TC Flasche T25, T75, T175 Stand. Bel. Ka.	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)
Wedge Well 4-20% Tris Glycin Gel	Invitrogen (Novex) (NY, USA)
Whatman-Papier	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Zellschaber 25 cm	Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland)

2.3 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller
AlamarBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen (NY, USA)
Aquatex Eindeckmittel	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, Deutschland)
BSA, Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
CellTracker Blue CMAC	Molecular Probes by Life Technologies (Kalifornien, USA)
CellTracker deep red	Molecular Probes by Life Technologies (Kalifornien, USA)
Complete Ultra protease inhibitor cocktail	ROCHE (Penzberg, Deutschland)
DAB Chromogen (3,3'-Diaminobenzidine)	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	Gibco Invitrogen (NY, USA)
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) low glucose	Gibco Invitrogen (NY, USA)
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DNA Ladders	Invitrogen (NY, USA)
DTT	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Eosin	Waldeck (Münster, Deutschland)
FCS Premium	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
FLuoroBrite DMEM	Gibco Invitrogen (NY, USA)
GelRed Nucleic acid stain (10.000x)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
GlutaMAX 100x	Gibco Invitrogen (NY, USA)
Glycerol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Hämalaun (Mayer)	Waldeck (Münster, Deutschland)
Hematoxylin	Dako Denmark, A/S (Glostrup, Dänemark)
IGEPAL CA 630	Sigma Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Deutschland)
Isopropanol	Fischar (Sarbrücken, Deutschland)

Chemikalien	Hersteller
Methanol 99,9%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver Blotting-Grade, fettarm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Mitomycin C (M0503-2MG)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
NaCl	Avantor (Center Valley, USA)
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco Invitrogen (NY, USA)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Peroxidase Blocking Solution S2023	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
PhosSTOP EASY pack	ROCHE (Penzberg, Deutschland)
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
SCM (Schwann Cell Medium)	ScienCell Research Laboratories (San Diego, Kalifornien, USA)
SDS	Biomol (Hamburg, Deutschland)
SDS 20%	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Sodium Pyruvate 100 mM	Gibco Invitrogen (NY, USA)
Sorafenib (Nexavar 200 mg) (gelöst in DMSO)	BAYER (Leverkusen, Deutschland)
StemPro Accutase	Gibco Invitrogen (NY, USA)
Substrate Buffer (B)	Dako Denmark A/S (Glostrup, Dänemark)
Tris-Base ULTROL Grade	Calbiochem (Bad Soden, Deutschland)
Tris-HCL	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	MERCK (Darmstadt, Deutschland)

2.4 Puffer

Lösung	Zusammensetzung
Blotting Puffer	14,26 g Glycin 12,114 g Tris-Base ad 1 L mit aqua dest
Lämmli Puffer 4x	10 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8) 16 mL Glycerol 100% 3,2 g SDS 1,23 g DTT Bromphenolblau ad 1 L mit aqua dest
Laufpuffer	3,029 g Tris-Base 14,41 g Glycin 50 mL 20% SDS ad 1 L mit aqua dest
RIPA Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1% NP40 0,5% NaDesoxycholat 0,2% SDS
Sammelgelpuffer	6,0725 g Tris-Base 20 mL 20% SDS ad 1 L aqua dest (pH 6,8)
TBS	8 g NaCl 2,42 g Tris-Base ad 1 L aqua dest (pH 7,6)

Lösung	Zusammensetzung
TBS-T	8 g NaCl 2,42 g Tris-Base ad 1 L aqua dest (pH 7,6) + 0,1% Tween20

2.5 Kits

Kits	Hersteller
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)
VenorGeM Mycoplasma Detection Kit	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit Panel A	R&D SYSTEMS (Minnesota, USA)
Human beta-NGF DuoSet ELISA	R&D SYSTEMS (Minnesota, USA)
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	R&D SYSTEMS (Minnesota, USA)

2.6 Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Solvens	Hersteller (ID)
Akt (pan) mAb	Maus	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#2920)
FSP-1	Maus	1:200	Verdünnungspuffer	abcam ab93283 (Cambridge, UK)
p44/42 MAPK (Erk1/2) mAb	Kaninchen	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#9102)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (E10) mAb	Maus	1:500	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#9106)
Phospho SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) mAb	Kaninchen	1:500	0,5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#4668)
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) mAb	Kaninchen	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#4058)
Phospho-Stat3 (Tyr705) mAb	Kaninchen	1:300	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#9131)
SAPK/JNK mAb	Kaninchen	1:500	0,5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#9252)

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Solvens	Hersteller (ID)
β-Actin mAb	Maus	1:10.000	0,5% Milch in TBS-T	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) (#A5441)

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Solvens	Hersteller (ID)
Stat3 (124H6) mAb	Maus	1:1000	5% BSA in TBS-T	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande) (#9139)

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Solvens	Hersteller
Anti Maus Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer	Ziege	gebrauchsfertig	keins	DAKO North America, Inc. (Carpinteria, CA, USA)
anti Maus IRDye 680 IgG	Ziege	1:10000	0,5% Milch TBS-T 0,01% SDS	LI-COR (Lincoln, USA)
anti Kaninchen IRDye 800CW IgG	Ziege	1:10000	0,5% Milch TBS-T 0,01% SDS	LI-COR (Lincoln, USA)

2.7 Zellkultur

Zelllinie	Medium	Herkunft	Referenz
HuCCT-1	DMEM low glucose, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% NaPyruvat	Humanes Intrahepatisches CCC	Cell Bank RIKEN Bio Resource Centre (Koyadai Tsukuba, Japan)
TFK-1	DMEM low glucose, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% NaPyruvat	Humanes Extrahepatisches CCC	Cell Bank RIKEN Bio Resource Centre (Koyadai Tsukuba, Japan)
HSC	Schwann cell Medium (ScienCell Research Laboratories)	Humane Schwann'sche Zellen, humaner Spinalnerv	ScienCell Research Laboratories (San Diego, USA)
CAFmH	DMEM low glucose, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% NaPyruvat	Leberresektate von CCC-Patienten	Chirurgie, UKSH Campus Kiel

3 Methoden

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Gewebeschnitte aus Resektaten von Spendern mit CCC

Es wurden 14 (5 intrahepatische und 9 extrahepatische) in Paraffin eingebettete 5 µM-dicke Gewebeschnitte vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt, um CAFs und HSC anzufärben und deren Präsenz mit dem Tumorfreen-Überleben der Patienten zu korrelieren. Die Asservierung erfolgte in Einverständnis der Patienten sowie des Ethik-Komitees der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (A 110/99).

3.1.2 Immunhistochemische Färbungen

An den Gewebeschnitten wurde eine immunhistochemische Färbung für FSP1 (Fibroblast specific protein 1) durchgeführt. Parallel erfolgte zusätzlich die Färbung eines Tonsillenpräparates als Positivkontrolle, einer Negativ- sowie der IgG2-Isotypkontrolle. Zuerst wurden die Gewebeschnitte zweimal für je 10 min in Xylol entparaffiniert, gefolgt von einer Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst zweimal für je 10 min in 100% Ethanol, für 5 min in 95% Ethanol sowie jeweils für 2 min in 70% und 50% Ethanol inkubiert. Den Abschluss der Rehydrierung stellte die 30 min Inkubation in destilliertem Wasser dar.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte kurz im Waschpuffer gewaschen und das Gewebe mit einem PAP Pen umrandet, um durch die erschaffene hydrophobe Barriere eine optimale Inkubation der unterschiedlichen Reagenzien auf dem Gewebe zu ermöglichen. Eine Antigendemaskierung war nicht erforderlich. Im Anschluss wurde für 5 min in Peroxidase-Blocking-Lösung (DakoReal) blockiert und zweimal für je 2 min mit Waschpuffer gewaschen. Der Primärantikörper wurde 1:200 in Antikörper-Verdünnungspuffer angesetzt und für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 2 min erfolgte die 30 min Inkubation im Sekundärantikörper EnVision+System-HRP anti Maus in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde in drei weiteren Waschschritten à 2 min entfernt. Das Substrat DAB Chromogen wurde 1:50 in Substratpuffer verdünnt und für 5 min bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser erfolgte eine 7 min Gegenfärbung mit Hämalaun, das zuvor 1:4 in Wasser verdünnt wurde und zur Visualisierung der Zellkerne diente.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte für 10 min in fließendes Leitungswasser gestellt, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und vorsichtig abgetrocknet. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mithilfe des Eindeckmediums Aquatex sowie Deckgläschen versiegelt.

Die immunhistochemischen Färbungen von α SMA und S-100 wurden im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel unter Verwendung automatisierter Standardmethoden durchgeführt. Die Evaluation der Färbungen wurde mithilfe eines Leica DM 1000-Mikroskops durchgeführt. Dabei wurde die Intensität der Färbungen separat von zwei Pathologen anhand eines Scoringsystems auf einer Skala von 0-3 bewertet (0: keine Färbung; 1: Schwache Färbung; 2: Moderate Färbung; 3: Starke Färbung).

3.2 Isolierung und Kultivierung von primären CAFs

Die Isolierung und Kultivierung der CAFs wurde nach dem Protokoll von Herrn Dr. Bernsmeier aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dazu wurden die CAFs aus Resektaten von CCC-Patienten isoliert, deren Asservierung im Einverständnis des Patienten sowie des Ethik-Komitees der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel erfolgte (A 110/99).

Unmittelbar nach der Resektion wurde das Lebergewebe in DMEM inklusive 10% FCS, 1% GlutaMAX, 1% Natrium-Pyruvat sowie 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert und unter sterilen Bedingungen in 1 mm³ große Tumorteile geschnitten. Im Anschluss wurden je 3-5 Tumorstücke pro Well in 6-Well-Platten überführt und für ca. 3 h in 700 μ L Kulturmedium inklusive 1% Penicillin/Streptomycin im Brutschrank inkubiert, bis das zerschnittene Gewebe adhärent angewachsen war. Danach wurde 1 mL des Kulturmediums pro Well hinzugegeben. Nach 2 Tagen wurden die Tumorteile in neue 6-Well-Platten umgesetzt, um die abgestorbenen Zellreste nahezu vollständig zu entfernen. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Nach ungefähr zwei Wochen waren genügend CAFs aus den Gewebestücken migriert, sodass das Gewebe aus den 6-Well-Platten entfernt werden konnte. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die CAFs nach kurzem Waschen mit PBS mithilfe von Accutase abgelöst, bei 540xg für 10 min zentrifugiert und das resuspendierte Pellet in T25-Kulturflaschen passagiert. Für die weitere Kultivierung sowie für Experimente wurde Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin verwendet. Die immunzytochemische Charakterisierung der Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Bernsmeier und Herrn Dr. Heinze durchgeführt (Heits et al., 2016).

3.3 Zellkultur

Die adhärenenten Zelllinien HuCCT-1, TFK-1, humane Schwann-Zellen (HSC) sowie die primären CAFmH wurden in FCS mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert (Ethikvotum: A 110/99).

Zur Kultivierung wurden die Aliquots vorsichtig bei 37°C aufgetaut und sofort in 5 mL des entsprechenden vorgewärmten Kulturmediums resuspendiert, um die Konzentration des zytotoxischen DMSO zu minimieren.

Nach anschließender Zentrifugation bei 540xg für 5 min wurden die Pellets jeweils in 12 mL Kulturmedium aufgenommen, in eine T75 cm²-Kulturflasche überführt und bei 37°C und 5% CO₂-Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter Verwendung von Accutase abgelöst. Nach darauffolgender Zentrifugation bei 540xg für 5 min sowie anschließender Resuspendierung wurde die Zellsuspension in neue Kulturflaschen passagiert. Die CAFs wurden maximal im Verhältnis 1:2, die übrigen Zelllinien je nach Konfluenz 1:3 bis 1:5 gesplittet.

Zellzählungen wurden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

3.4 Mykoplasmen-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Mykoplasmen sind kleine parasitierende Bakterien, die die Funktionstüchtigkeit, den Metabolismus sowie biochemische Eigenschaften der verwendeten Zellkulturen beeinträchtigen. Mithilfe des PCR-basierten Mycoplasma Detection Kits (VenorGeM), das die 16S RNA kodierte Region im Mykoplasmen genom nachweist, wurden die Zellkulturen TFK-1, HuCCT-1, HSC sowie CAFmH auf eine Mykoplasmeninfektion untersucht.

Dazu wurde bei einer Konfluenz von 90% jeweils 500 µL Zellkulturüberstand entnommen, für 10 min bei 95°C gekocht und bei 16100xg für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in neue Eppendorfgefäße überführt. 23 µL Mastermix und 2 µL Probe bzw. 2 µL aqua dest. als Negativkontrolle und 2 µL Positivkontrolle wurden als PCR-Ansatz pipettiert, gevortext und kurz zentrifugiert. Danach wurde die qualitative PCR im ThermoCycler durchgeführt. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese auf mögliche Kontaminationen untersucht. Dazu wurden 1,5% Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, anschließend GelRed dem noch heißen Gel hinzugegeben, in eine Gelvorrichtung inklusive des Kamms gegossen und nach 20 min das nun auspolymerisierte Gel in die Gelkammer überführt. Nach Entfernen des Kamms erfolgte das Beladen der Taschen mit jeweils 10µL PCR-Ansatz inklusive Lämmli-Puffer sowie eines Größenmarkers (Invitrogen DNA Ladders).

Die Auftrennung der in den PCR-Ansätzen vorhandenen DNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese für 1 h bei 120 Volt. Anschließend wurden unter UV-Licht die Resultate analysiert.

<u>Mastermix je Probe</u>		<u>PCR-Zyklus-Programm</u>	
Aqua dest	15,3 µL	1. Zyklus	94°C 2 min
10xReaktionspuffer	2,5 µL	39 Zyklen	94°C 30 sek
Internal control	2,5 µL		55°C 1 min
Primer und Nukleotide-Mix	2,5 µL		72°C 30 sek
Taq-Polymerase (5U/µL)	0,2 µL	Kühlung	4-8°C

3.5 Proliferations-Assay

Um einen möglichen Einfluss des Medikaments Sorafenib auf die Proliferation der HuCCT-1, TFK-1, HSC sowie CAFmH zu untersuchen, wurde ein Proliferations-Assay mit AlamarBlue durchgeführt.

Dafür wurden 5×10^3 Zellen in 100 μL Medium pro Well in 96-well-Platten ausgesät, die am darauffolgenden Tag in 5-fach-Bestimmungen mit Sorafenib in Konzentrationen von 0-50 μM behandelt wurden. Nach 21 h, 45 h sowie 93 h wurden 10 μL AlamarBlue-Reagenz pro Well hinzugegeben und die Fluoreszenz, welche linear mit der metabolischen Aktivität korreliert nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre mittels SPECTRAFluor Plus Reader (TECAN) detektiert. Anhand dieser Rohdaten konnte für die jeweilige Zelllinie eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt und der IC50-Wert bestimmt werden.

3.6 Parakrines-Interaktions-Modell zur Untersuchung der Zellmigration

Ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen Stromazelllinien (HSC und CAFmH) auf das Wachstumsverhalten der beiden CCC-Zelllinien (HuCCT-1 und TFK-1) sollte mit dem von mir etablierten Parakrinen-Interaktions-Modell analysiert werden.

Dazu wurde nach dem Ablösen der Zellen durch Accutase sowie anschließender Zentrifugation und Resuspendierung die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, sodass Zellsuspensionen mit definierter Zellzahl erstellt werden konnten.

Diese Zellsuspensionen wurden erneut zentrifugiert, das Pellet in 0% FCS-haltigem Medium inkl. 25 μM CellTracker *deep red* für HuCCT-1 und TFK-1, bzw. in 0%FCS-haltigem Medium inkl. CellTracker CMAC blue für HSC resuspendiert und für 45 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Die rote sowie die blaue Fluoreszenzmarkierung durch die beiden CellTracker ist über mehrere Generationen in den Zellen detektierbar, wodurch eine präzise Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Zelltypen ermöglicht wird. Anschließend wurden die nun fluoreszenz-markierten Zellen erneut bei 540xg für 5 min zentrifugiert, um den Überschuss an CellTracker aus der Lösung zu entfernen. Das Pellet wurde nun in 10%-haltigem Medium resuspendiert. Es wurden $0,35 \times 10^5$ Zellen/Well in 75 μL Medium in ibidi-Platten ausgesät.

Bei der ibidi-Platte handelt es sich um eine runde Kulturplatte mit integriertem 4-Kammersystem (Wells), welches die simultane Kultivierung von 4 verschiedenen Zellkonditionen pro ibidi-Platte erlaubt (s.Abb.3.1).

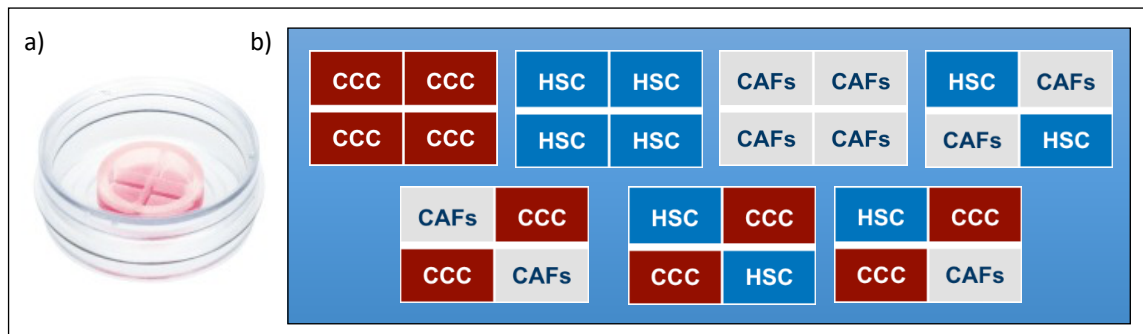


Abb. 3.1: Untersuchung der Zellmigration mittels ibidi-Platte

a) ibidi-Platte (ibidi.com)

b) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Konditionen

Bei ausreichender Adhärenz und Konfluenz der Zellen in den jeweiligen 4 wells (Zellkompartimenten) einer ibidi-Platte kann das 4-Kammersystem mit einer Pinzette steril entfernt werden. Mithilfe des dadurch zwischen den 4 wells (Zellkompartimenten) entstandenen Spalts wurde die Migration der unterschiedlichen Zellpopulationen untersucht, indem die Zellkonfluenz im Spalt zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen wurde. Um die identische Ausrichtung der ibidi-Platten zwischen den unterschiedlichen Messpunkten zu garantieren und somit im Anschluss eine optimale Auswertung mittel des NyONE-Imagers zu gewährleisten, wurden die ibidi-Platten in einer von der Firma Synentec angefertigten Halterung fixiert.

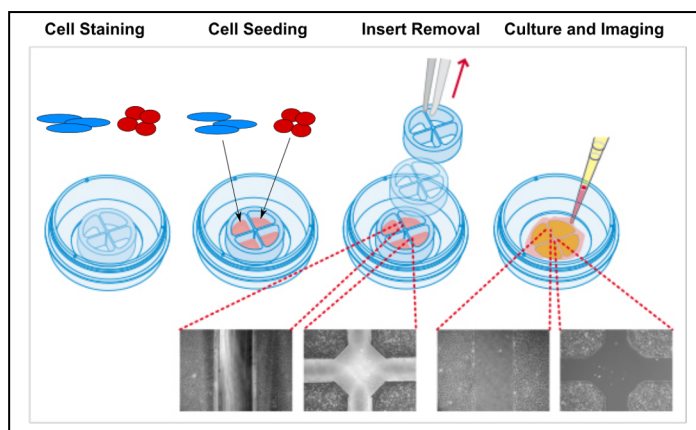


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Vorgehens (modifiziert nach ibidi.com)

Am darauffolgenden Tag wurden die jeweils 4 Wells (Zellkompartimente) einer ibidi-Platte mit 100 μ L 0% FCS DMEM FluoroBrite gewaschen und danach mit 75 μ L 0% FCS DMEM FluoroBrite für die Kontrollgruppe und 75 μ L 0% FCS DMEM FluoroBrite inklusive 1 μ M Sorafenib für die Behandlungsgruppe versehen. Nach 4 h Inkubation sowie 90% Konfluenz der Zellen erfolgte die sterile Entfernung des Stempels/4-Kammersystems, welcher zuvor die ibidi-Platte in die 4 Wells unterteilt hatte. Da der dadurch zwischen den 4 Zellkompartimenten entstandene Spalt überall die identische Größe aufweist, wird eine spätere Quantifizierung der Resultate deutlich vereinfacht.

Um Zellüberreste zu entfernen, wurden die Zellen in der ibidi-Platte 2x mit 2 mL 0% FCS-haltigem DMEM FluoroBrite gewaschen und danach in 2 mL 0% FCS-haltigem DMEM FluoroBrite inklusive 1 μ M Sorafenib (Behandlung) sowie exklusive 1 μ M Sorafenib (Kontrolle) kultiviert. Die anschließende Messung zum Zeitpunkt $t=0$ h erfolgte mithilfe des NyONE (SYNENTEC) in der für die ibidi-Platten angefertigten Vorrichtung. Weitere Messungen wurden nach 2 h, 18 h, 24 h, 44 h, 68 h, 72 h durchgeführt. Zudem wurde das Medium vor den Messpunkten $t=18$ h, $t=44$ h und $t=68$ h mit Sterilfiltern (0,45 μ m Porengröße) steril filtriert, um Zellreste zu entfernen.

Die nachfolgende Quantifizierung erfolgte durch eine Konfluenzmessung im Hellfeld. Dazu wurde unter Verwendung des „Wound healing beta 2F“-Operators von Syntec in jedem der 4 Spalträume einer ibidi-Platte die konfluente Fläche bestimmt.

3.7 Western Blot-Analyse

3.7.1 Prinzip

Ein potentieller parakriner Einfluss der unterschiedlichen Stromazelltypen auf die Signaltransduktion in den Tumorzelllinien TFK-1 und HuCCT-1 wurde mittels Western Blot-Analyse untersucht. Besonderer Fokus lag hierbei auf den Proteinkinasen Stat3, JNK, Akt und Erk, um mögliche durch Stromazellen bedingte Unterschiede in den MAPK-, PI3K- sowie JAK-STAT-Signalwegen zu detektieren.

Zuerst erfolgte die Produktion von konditionierten Medien der jeweiligen Zelltypen und Cokultur-Konditionen (s. Abschnitt 3.7.2), die 0% FCS-haltiges Medium inklusive die von den jeweiligen Zelllinien sezernierten Wachstumsfaktoren enthielten. Diese wurden im Anschluss zur Stimulation der Krebszelllinien HuCCT-1 und TFK-1 verwendet.

Die Proteine wurden aus Gesamtzelllysaten der unterschiedlich behandelten Tumorzelllinien isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die gewünschten Signalproteine nach dem Membrantransfer mithilfe des Immunoblot-Verfahrens detektiert.

3.7.2 Herstellung des konditionierten Mediums

a. Monokultur mit CAFmH bzw. HSC

Das konditionierte Medium der CAFmH bzw. der HSC wurde in T75 cm²-Kulturflaschen generiert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurde das Medium aus der T75 cm²-Kulturflasche entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 10 mL Kulturmedium ohne FCS inklusive 1 oder 10 µM Sorafenib (Behandlung) bzw. exklusive Sorafenib (Kontrolle) hinzugegeben. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zentrifugation des Mediums bei 540xg für 5 min. Der Überstand wurde als konditioniertes Medium in ein neues Falcon überführt und bei -20°C gelagert.

b. Co-Kultur aus der jeweiligen Tumorzelllinie mit CAFmH oder HSC und aus HSC und CAFmH

Zur Herstellung des konditionierten Mediums in Cokultur wurde ein indirektes Transwellsystem verwendet, bei dem beide Zelltypen lediglich über die sezernierten, gelösten Faktoren miteinander in Kontakt stehen. Es wurden 1,5x10⁵ Tumorzellen pro Transwell und 1,5x10⁵ CAFmH bzw. HSC pro 6-Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zuerst 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 mL Kulturmedium ohne FCS (1,5 mL pro 6-Well und 0,5 mL pro Transwell) versehen. Für die Behandlungsgruppe wurde analog zur Monokultur eine Konzentration von 1 µM bzw. 10 µM im 0% FCS-haltigem Kulturmedium verwendet. Das folgende Procedere ist mit dem Herstellungsverfahren in Monokultur identisch.

3.7.3 Zellbehandlung und Stimulation

Es wurden 3x10⁵ an TFK-1- bzw. HuCCT-1-Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach zweimaligem Waschen mit PBS am darauffolgenden Tag wurden 2 mL Kulturmedium ohne FCS pro Well hinzugegeben und die Zellen für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit PBS in 2 mL Kulturmedium ohne FCS pro Well für die Kontrollgruppe sowie in 2 mL Kulturmedium ohne FCS inklusive 1 µM und 10 µM Sorafenib für die Behandlungsgruppe aufgenommen. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation der Tumorzellen mit dem jeweiligen konditionierten Medium für 15 min bei 37°C, als Kontrollen wurden Kulturmedium inklusive und exklusive 10% FCS verwendet.

3.7.4 Lyse und Proteinextraktion

Nach der Stimulation der Tumorzellen mit konditioniertem Medium erfolgte die Lyse der Zellen auf Eis. Dazu wurde das Medium abgesaugt, 80 µL RIPA-Puffer inklusive PhosSTOP (ROCHE) und Complete Protease Inhibitor Cocktail (ROCHE) pro Well hinzugegeben und die jeweilige 6-Well-Platte für 2 h bei -20°C inkubiert.

Anschließend wurden die lysierten Zellen in den 6-Well-Platten für 10 min auf Eis aufgetaut, mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Es folgte eine Sonifizierung mittels Ultraschalls (10x1sek) bei einer Amplitude <16' und eine Zentrifugation bei 16.100 rcf und 4°C für 15 min. Die Überstände mit dem darin enthaltenen Gesamtprotein wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C gelagert. Der gesamte Vorgang wurde auf Eis durchgeführt, um die Auswirkungen einer Degradation durch Proteasen zu minimieren.

3.7.5 Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay (Bio-Rad) und Konzentrationseinstellung

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des DC Protein Assay-Kit (BioRad) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte durch photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 700 nm. Die Intensität der Absorption steht in direkter Korrelation mit der Proteinkonzentration, die anhand einer standardisierten Verdünnungsreihe bestimmt wird. Die Messung erfolgte mit dem Tecan Sunrise-Photometer.

Eine einheitliche Proteinkonzentration der Proben wurde durch Verdünnung mit RIPA-Puffer erreicht. Zusätzlich wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt, gefolgt von einer 5-minütigen Denaturierung bei 95°C und anschließender kurzen Abkühlung auf Eis sowie Zentrifugation.

3.7.6 SDS-PAGE

Um die isolierten Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt.

Die Geltaschen wurden nach dem Einspannen eines 4-20% Tris Glycin Fertiggels in die Elektrophoresekammer und dem Befüllen mit Laufpuffer mit jeweils 45 µg Protein in 20 µL RIPA-Puffer beladen. Zudem wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standards-Proteinstandard zur Größenbestimmung verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V für 2 h.

3.7.7 Western Blot

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine FL-Membran wurde ein Semidry-Blotverfahren angewandt. Dazu wurden 2 in Blotting-Puffer getränkte Western Blot-Schwämme auf der Anode positioniert, gefolgt von einem durchtränkten Whatman-Papier und dem Gel, welches die aufgetrennten Proteine enthielt. Anschließend wurde die zuvor in Methanol rehydratisierte FL-Membran auf dem Gel platziert und mit einem in Blotting-Puffer getränkten Whatman-Papier und 2 Western Blot-Schwämmen bedeckt. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und die Proteine in 1 h bei 10 V aus dem Gel auf die FL-Membran transferiert.

3.7.8 Immunnachweis der Proteine

Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte mittels spezifischer Antikörper.

Nach dem Blot wurde die Membran kurz in Methanol aktiviert und anschließend mit TBS gewaschen. Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte in 5% BSA in TBS auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 1 h, gefolgt von der Primärantikörper-Inkubation auf einem Rollenmischer über Nacht bei 4°C - mit Ausnahme von β -Actin, dessen Detektion mit dem Primärantikörper für 1h bei Raumtemperatur erfolgte.

Aufgrund der unterschiedlichen Spezies der Antikörper für die phosphorylierte und unphosphorylierte Variante des jeweiligen Zielproteins (pStat3/Stat3, pAKT/Akt sowie pErk/Erk) war hier somit eine simultane Inkubation der Primärantikörper beider Varianten möglich.

Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für jeweils 10min in TBS-T auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation im Sekundärantikörper auf dem Schüttler bei Raumtemperatur für 1 h, die zum Schutz des Fluorochroms im Dunkeln durchgeführt wurde. Um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran danach für 10 min in TBS-T und anschließend zweimal jeweils für 10 min in TBS ohne Tween im Dunkeln gewaschen. Nach erneuter, kurzer Inkubation in Methanol wurde die Membran getrocknet und das Fluoreszenzsignal der Zielproteine mittels Odyssey Infrared Imager (Li-COR) detektiert und mit der Software Image Studio lite analysiert.

Angeichts der gleichen Spezies des phosphorylierten und unphosphorylierten JNK-Primärantikörpers musste nach der Detektion des pJNK-Signals ein sogenanntes „Stripping“ der Membran durchgeführt werden, um die bisherigen Antikörperbindungen zu entfernen und somit die Bindung des JNK-Antikörpers zu ermöglichen.

Dazu wurde die Membran nach der Rehydratisierung in Methanol kurz mit TBS-T gewaschen, und anschließend in aufgekochtem Stripping-Puffer für 20 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Waschvorgang in TBS-T für 10 min folgten analog zum vorherigen Procedere die Blockierung der Membran sowie die verbleibenden Schritte bis zu Detektion.

3.8 Human Cytokine Array-Kit

3.8.1 Prinzip

Zur genaueren Analyse eines potentiellen parakrinen Einflusses der Schwann'schen Zellen und CAFs auf die beiden Tumorzelllinien wurden die Überstände der verschiedenen Konditionen aus dem Parakrinen-Interaktions-Modell nach 72 h auf Unterschiede im Zytokinexpressionsmuster untersucht. Bei dem verwendeten *Proteome Profiler Human Cytokine Array-Kit* handelt es sich um einen Membran-basierten Immunnachweis, der die simultane Detektion von 36 Zytokinen in den Proben ermöglicht.

3.8.2 Herstellung der Zellkulturüberstände

Nach der letzten Messdurchführung bei 72 h im Parakrinen-Interaktions-Modell (s. Abschnitt 3.6) wurde das Kulturmedium der ibidi-Platten in 15 mL-Falcons pipettiert und für 5 min bei 540xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in neue 15 mL-Falcons überführt und bei -20°C gelagert.

3.8.3 Durchführung

Nach dem Auftauen der Zellkulturüberstände auf Eis erfolgte die Durchführung des *Proteome Profiler Humane Cytokine Array-Kits* nach Herstellerangaben.

Dazu wurden die bereits mit den 36 Zytokin-spezifischen Antikörpern versehenen Membranen in jeweils 2 mL Puffer 4 für 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur blockiert. Parallel wurden jeweils 500 µL Probe mit 500 µL Puffer 4, 500 µL Puffer 5 sowie 15 µL Detektions-Antikörper-Cocktail versetzt, die ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach dem Entfernen des Blockierpuffers von den Membranen folgte die Inkubation in der hergestellten Proben-Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen dreimal für je 10min mit Waschpuffer gewaschen, gefolgt von einer 30min Inkubation in Streptavidin-HRP-Verdünnung bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut dreimal für je 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Membranen wurden dann auf einer Plastikfolie positioniert und für 1 min in ECL-Lösung inkubiert, bei der es sich um ein Substrat für die Peroxidase (HRP) handelt. Die Peroxidase katalysiert dabei die Umsetzung dieses Substrats in ein lumineszierendes Produkt und ermöglicht somit die Visualisierung der in den Proben vorhandenen Zytokine. Die Membranen wurden daraufhin von überschüssiger ECL-Lösung befreit und in eine Filmkassette eingespannt. Die Detektion des Lumineszenzsignals erfolgte mit X-Ray-Filmen in einem Curix 60-Entwickler. Mittels Scanner wurden die Resultate digitalisiert.

3.9 β -Nerve-Growth-Factor-ELISA -Kit

Um die Expression des β Nerve Growth Factors (β NGF) in den verschiedenen Konditionen des Parakrinen-Interaktions-Modells (s. Abschnitt 3.6) – insbesondere in Cokultur mit Schwann'schen Zellen- zu analysieren, wurde ein β NGF-ELISA von R&D Systems nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die bereits für das Human Cytokine Array-Kit hergestellten Zellkulturüberstände der Experimente des Parakrinen-Interaktions-Modells nach 72 h verwendet (s. Abschnitt 3.8.2).

Zuerst wurden 96-Well-Platten mit 100 µL des in PBS verdünnten β NGF-Primärantikörpers pro Well über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet.

Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit jeweils 400 µL Waschpuffer pro Well gewaschen und anschließend mit 300 µL *Reagent Diluent* pro Well für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach Wiederholung der drei Waschvorgänge wurden die Platten mit jeweils 100 µL Zellkulturüberstand pro Well befüllt. Zusätzlich wurde pro 96-Well-Platte eine Verdünnungsreihe des β NGF-Standards angefertigt, um die β NGF-Konzentrationen in den einzelnen Proben später bestimmen zu können. Proben sowie β NGF-Standard wurden als Duplikate pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit 100 µL Detektions-Antikörper pro Well für 2 h bei Raumtemperatur.

Um überschüssigen Detektions-Antikörper zu entfernen, wurden 3 weitere Waschschritte mit 400 µL Waschpuffer pro Well durchgeführt, gefolgt von einer 20 min Inkubation in 100 µL Streptavidin-HRP-Verdünnung pro Well bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die 96-Well-Platten wieder dreimal gewaschen und 100 µL Substrat-Lösung pro Well für 20 min hinzugegeben. Die katalysierte Umsetzung des Substrats in ein lumineszierendes Produkt durch die Peroxidase (HRP) wurde nach Zugabe der Stop-Lösung unterbunden, um eine Sättigung zu verhindern und somit die quantitative Bestimmung der β NGF-Konzentrationen in den Proben anhand der Standard-Verdünnungsreihe zu ermöglichen. Die optische Densität wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm im TECAN sunrise-Photometer gemessen.

3.10 Statistische Auswertung

Die Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen sowie Signifikanzen erfolgte mithilfe von Microsoft Office 365 ProPlus sowie SPSS 23.0. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde zudem untersucht, ob die Daten normalverteilt sind. Zum Vergleich der Mittelwerte der unterschiedlichen Stichproben wurde ein H-Test nach Kruskal & Wallis als nichtparametrisches Verfahren durchgeführt.

p-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Für die Überlebenszeitanalysen wurde das Kaplan-Maier-Verfahren angewandt und mögliche Unterschiede mittels Log-Rank-Test ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Präsenz α SMA- und FSP-1- positiver CAFs im Tumorstroma korreliert mit schlechterem tumorfreiem Überleben

Um die Relevanz des Tumorstromas in Bezug auf die Prognose beim CCC näher zu ergründen, wurden Gewebeschnitte von CCC-Patienten immunhistochemisch auf die Anwesenheit von tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs) analysiert und deren Farbtintensität mit dem tumorfreien-Überleben korreliert. Dazu wurden 14 (5 intrahepatische und 9 extrahepatische) aus Resektaten gewonnene und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel zur Verfügung gestellt. Davon sind 3 Patienten im TNM-Stadium T1, 9 im Stadium T2, und 2 im Stadium T3 operiert worden. Hauptfokus für die immunhistochemische Analyse lag hierbei auf den Proteinen α SMA sowie FSP-1, die verstärkt in CAFs exprimiert werden (Chuaysri et al., 2009; Santi et al., 2018). In 10/14 Gewebeschnitten konnte eine mäßig starke bis starke Färbung von α SMA bzw. FSP-1 nachgewiesen werden. Eine hohe Intensität der Färbung mit FSP-1 ($p = 0,041$) und α SMA ($p = 0,05$) im CCC korrelierte hierbei mit einem deutlich reduzierten tumorfreien Überleben.

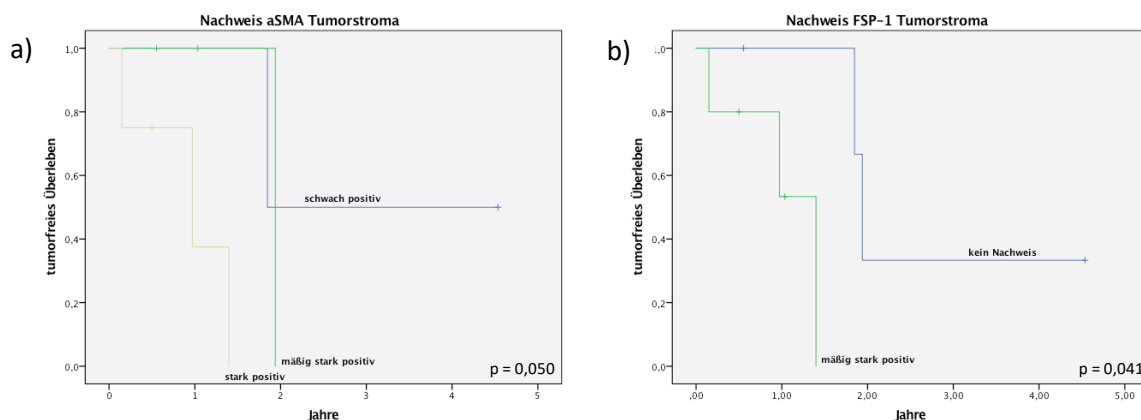


Abb. 4.1: Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung mit α SMA (a) bzw. FSP-1 (b) im Tumorstroma beim CCC mit tumorfreiem Überleben

Kaplan-Meier-Kurven für tumorfreies Überleben von CCC-Patienten in Abhängigkeit von der Farbtintensität von α SMA (a) und FSP-1 (b) im Tumorstroma. ($n = 14$ CCC-Patienten, davon 5 mit intrahepatischem und 9 mit extrahepatischem Tumor). Die statistischen Signifikanzen sind in der Grafik enthalten.

4.2 Einfluss von tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs) auf die Migration intra- und extrahepatischer CCC-Zelllinien

4.2.1 Erhöhte Migration der intra- und extrahepatischen CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 in Cokultivierung mit den CAFs

Um die Ursachen für eine potentiell niedrigere Überlebenserwartung bei Anwesenheit von α SMA- und FSP-1-positiven tumorassoziierten Fibroblasten (CAFmH)(vgl. Abb. 4.1) genauer zu ergründen, wurde der potentielle Einfluss parakriner Interaktionen von CAFmH auf die CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 untersucht. Dazu wurden die Krebszelllinien und tumorassoziierten Fibroblasten mithilfe eines „Parakrinen-Interaktions-Modells“ für 72h in 0%-FCS-haltigem Kulturmedium kokultiviert und die Migration der Zellen analysiert.

Insbesondere die intrahepatische CCC-Zelllinie HuCCT-1 zeigte hierbei in Cokultivierung mit CAFmH bereits nach 18 h eine deutliche Zunahme der Migration (s. Abb. 4.2). Die zur besseren Visualisierung rot angefärbten HuCCT-1 konnten bereits zu diesem Zeitpunkt in großen Mengen im kompletten Spalt detektiert werden. Die Zellkonfluenz im Spalt war zu diesem Zeitpunkt in Cokultur mit 66% gegenüber den Monokulturen (HuCCT-1 = 17%, CAFmH = 5%) deutlich erhöht (s. Abb. 4.3). Nach 2 h war noch kein signifikanter Unterschied zwischen Mono- und Cokultur zu verzeichnen.

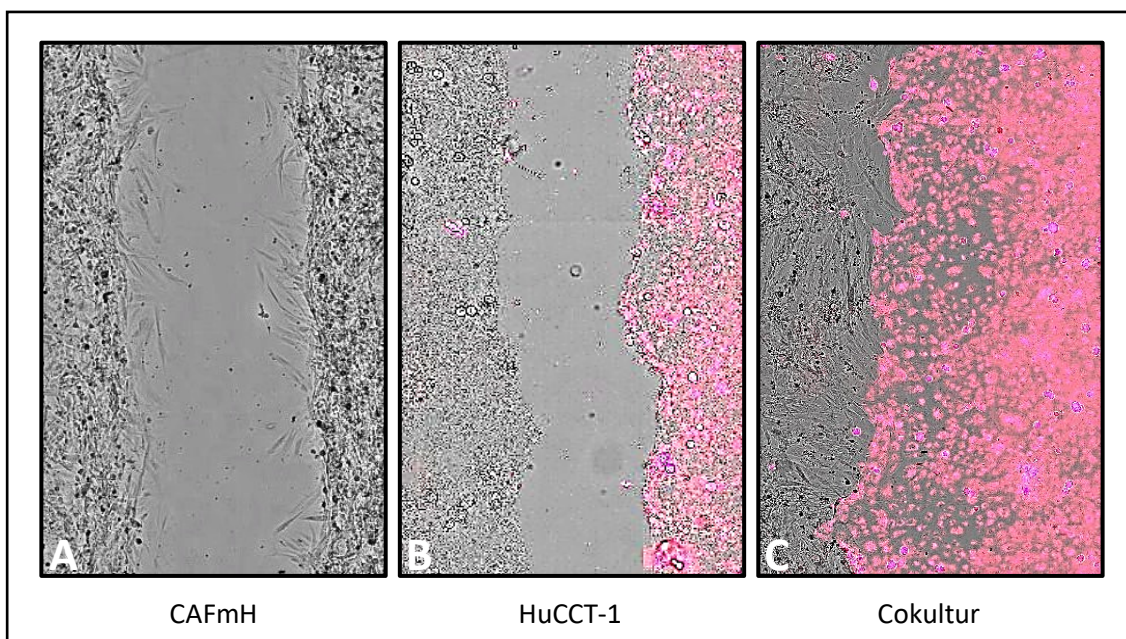


Abb. 4.2: Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1 und CAFmH nach 18h

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Konfluenz im Spalt der tumorassoziierten Fibroblasten (CAFmH) (A), der HuCCT-1 (B) sowie deren Cokultur (C) nach 18 h. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 10x-Vergrößerungsobjektivs des NYONE-Imagers generiert. Zur Unterscheidung beider Zelltypen wurden die HuCCT-1-Zellen mithilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs markiert (C). Zusätzlich wurde zur besseren Übersicht eine Zellfront der HuCCT-1 in Monokultur ebenfalls mittels roten Fluoreszenzfarbstoffs markiert (B). Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

Eine nahezu vollständige Konfluenz im Spalt erreichten die HuCCT-1-Monokultur nach 44 h, die der CAFs in Monokultur betrug zu diesem Zeitpunkt lediglich 9%. Mithilfe eines *wound healing*-Operators von SYNENTEC wurde die konfluente Fläche im Spalt im Hellfeld quantifiziert und auf diese Weise die Zellkonfluenz in den verschiedenen Cokultur-Konditionen bestimmt.

Somit beziehen sich die in Abbildung 4.3 dargestellte Zellkonfluenz von 66% in Cokultur sowohl auf die im Spalt vorhandenen HuCCT-1 als auch auf die dort angesiedelten CAFmH. Anhand der Abbildung 4.2 wird jedoch deutlich, dass hierbei die Anzahl an HuCCT-1 im Spalt deutlich überwiegt (vgl. Abb. 4.2).

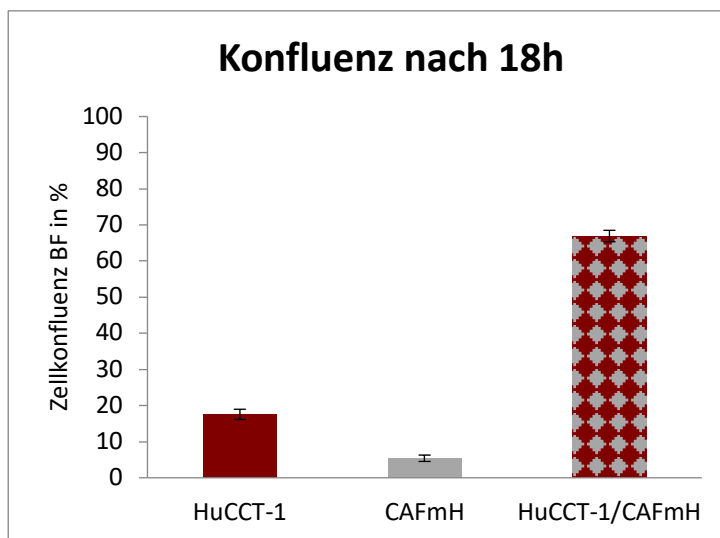


Abb. 4.3: Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1, CAFmH sowie deren Cokultur nach 18 h – Quantifizierung
Gezeigt ist der prozentuale Anteil an zellkonfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der HuCCT-1- bzw. CAFmH-Monokultur sowie deren Cokultur. Die Daten sind als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Die extrahepatische CCC-Zelllinie TFK-1 zeigte in Cokultur hingegen eine verspätete und geringer ausgeprägte Migration. Hier wurde erst nach 44 h eine marginal verstärkte Migration in Cokultur detektiert, die sich jedoch nach 68 h als deutlich signifikant herausstellte (s. Abb. 4.4). Auch hier wurde zur besseren Visualisierung die Tumorzelllinie rot angefärbt. Die Konfluenz im Spalt war zu diesem Zeitpunkt in Cokultur mit 44% gegenüber den Monokulturen (TFK-1 = 6%, CAFmH = 5%) signifikant erhöht (s. Abb. 4.5). Nach 2 h bis einschließlich 24 h Inkubation war noch kein signifikanter Unterschied zwischen Mono- und Cokultur zu verzeichnen.

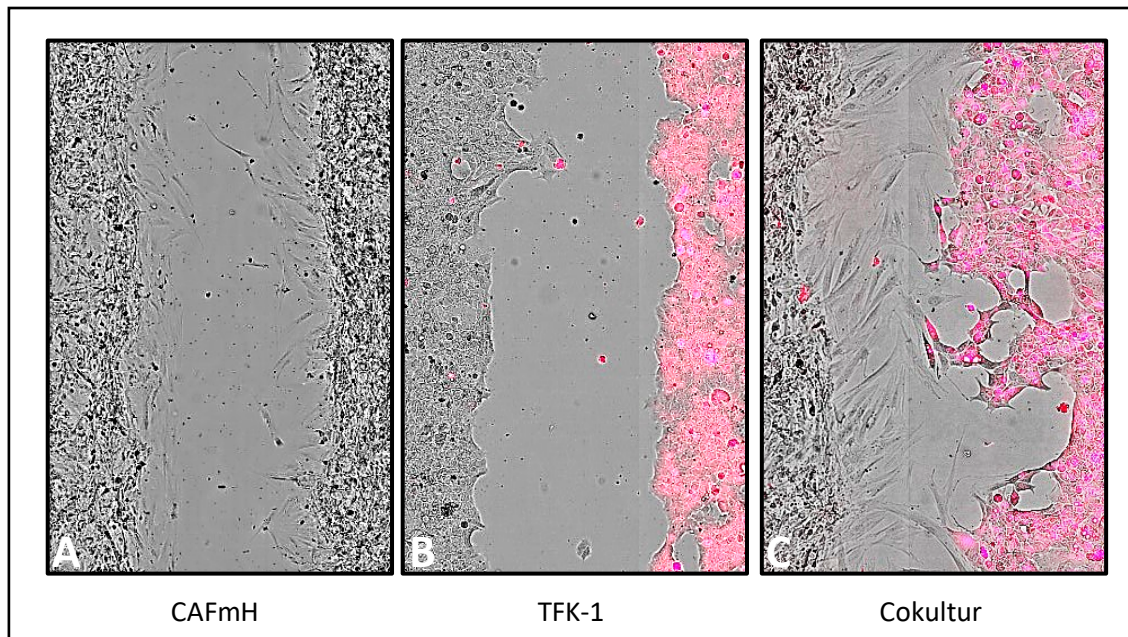


Abb. 4.4: Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1 und CAFmH nach 68h

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Konfluenz im Spalt von den tumorassoziierten Fibroblasten (CAFmH) (A), den TFK-1 (B) sowie deren Cokultur (C) nach 68h. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 10x-Vergrößerungsobjektivs des NYONE-Imagers generiert. Zur Unterscheidung beider Zelltypen wurden die TFK-1-Zellen mithilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs markiert (C). Zusätzlich wurde zur besseren Übersicht eine Zellfront der TFK-1 in Monokultur ebenfalls mittels roten Fluoreszenzfarbstoffs markiert (B). Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

Die Zellkonfluenz im Spalt wurde ebenfalls mithilfe des *wound healing*-Operators von SYNENTEC im Hellfeld detektiert und somit eine Quantifizierung der Migration in den unterschiedlichen Konditionen ermöglicht. Somit umfasst die in Abbildung 4.5 dargestellte Cokultur sowohl die Konfluenz an TFK-1 als auch CAFmH im Spalt, wobei auch hier die Anzahl der Krebszelllinie überwiegt (vgl. Abb.4.5).

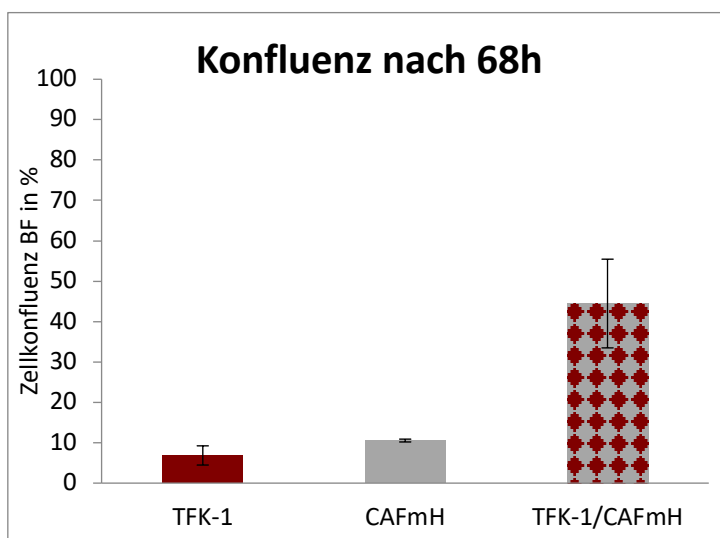


Abb. 4.5: Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1, CAFmH sowie deren Cokultur nach 68 h – Quantifizierung

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an zellkonfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der TFK-1- bzw. CAFmH-Monokultur sowie deren Cokultur. Die Daten sind als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Migration beider CCC-Zelllinien in Anwesenheit von CAFs signifikant erhöht war. Dieser Effekt war in Cokultivierung mit der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 deutlich höher als in der extrahepatischen (TFK-1). Diese Resultate lassen vermuten, dass parakrine Interaktionen zwischen tumorassoziierten Fibroblasten und der jeweiligen CCC-Zelllinie zum verstärkten Migrationsverhalten beigetragen haben könnten.

4.2.2 Inhibierung des Zellwachstums durch Sorafenib in beiden CCC-Zelllinien, marginale Hemmung in den CAFs

Aufgrund der bereits erfolgreichen Anwendung beim Leberzellkarzinom (HCC) wurde der Multityrosinkinase-Inhibitor Sorafenib auf ähnliche wachstumshemmende Effekte bei den CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 untersucht. Dazu wurden beide CCC-Zelllinien sowie die CAFmH über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 96 h entweder unbehandelt oder mit verschiedenen Konzentrationen an Sorafenib kultiviert. Nach Zugabe von AlamarBlue-Reagenz wurde die Fluoreszenz, welche linear mit der metabolischen Aktivität korreliert, nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre mittels SPECTRAFluor Plus Reader (TECAN) detektiert. Anhand dieser Rohdaten konnte für die jeweilige Zelllinie eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt werden.

Hierbei zeigte Sorafenib eine starke Hemmung des Zellwachstums beider CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 (s. Abb. 4.6 A + B). Dieser Effekt verstärkte sich mit zunehmender Behandlungsdauer. Die tumorassoziierten Fibroblasten (CAFmH) hingegen wurden nur marginal in ihrem Zellwachstum inhibiert (s. Abb. 4.6 C). Zusätzlich wurde anhand dieser Dosis-Wirkungskurven für Folgeexperimente der Cokultur zwischen CCC-Zelllinie und CAFmH im Parakrinen-Interaktions-Modell eine Sorafenibkonzentration von 1 µM ausgewählt. Somit wäre eine mögliche Reduktion der Migration in der behandelten Cokultur (s. Abschnitt 4.2.1) aufgrund der bei einer Sorafenibkonzentration von 1 µM lediglich marginalen Hemmung des Zellwachstums vermutlich mit anderen Mechanismen wie beispielsweise der Inhibierung parakriner Interaktionen zwischen beiden Zelllinien assoziiert.

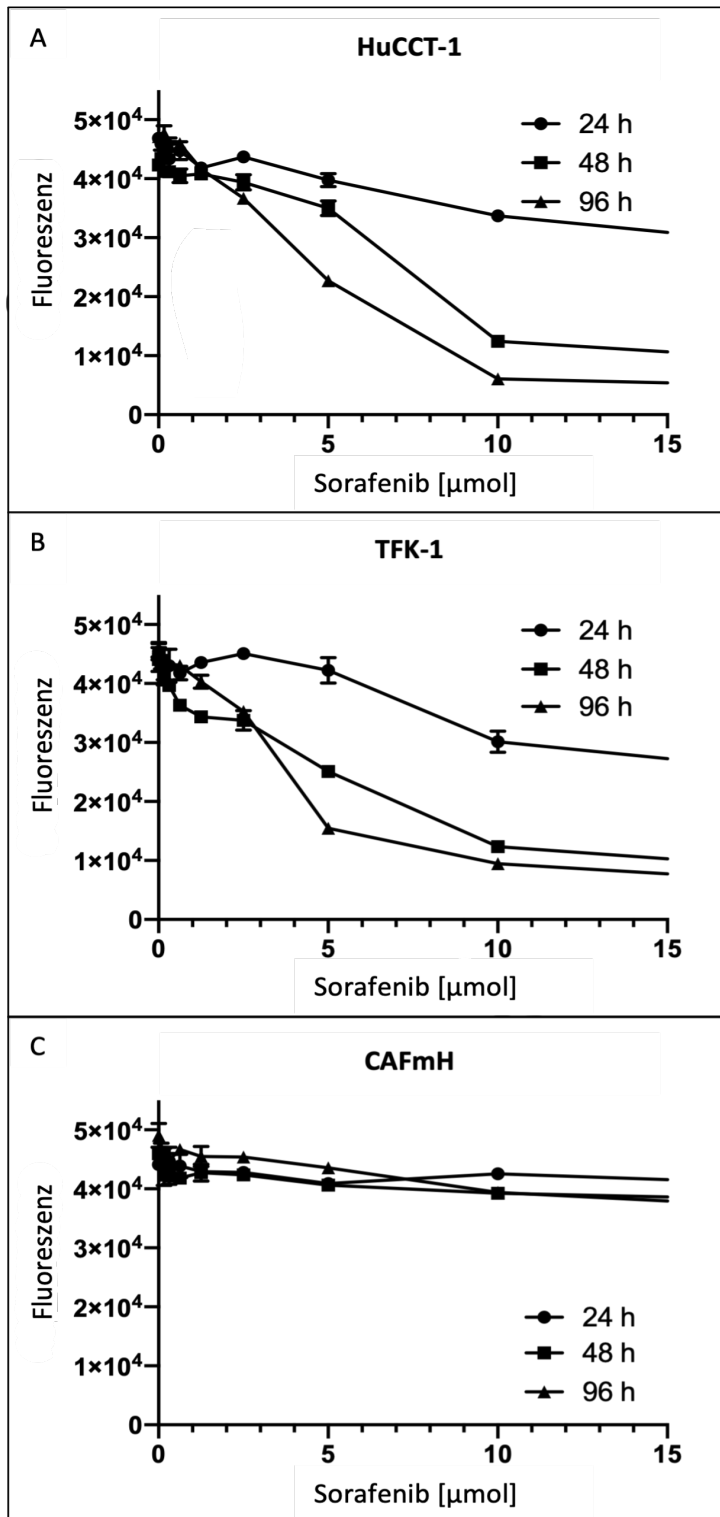


Abb. 4.6: Dosis-Wirkungs-Kurven mit Sorafenib für beide CCC-Zelllinien und CAFmH

Sorafenib hat einen inhibierenden Einfluss auf das Zellwachstum in beiden CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 (A + B). In den tumorassoziierten Fibroblasten (CAFmH) (C) sind lediglich marginale dosis-abhängige Effekte sichtbar. Die Daten sind als Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

4.2.3 Sorafenib hemmt erhöhte Migration beider CCC-Zelllinien in Cokultur mit CAFs

Angeichts der verstärkten Migration der Cokultur aus CCC-Zelllinie und CAFmH verglichen zu den jeweiligen Monokulturen sollte in einem wiederholten Parakrinen-Interaktions-Modell getestet werden, ob Sorafenib einen Einfluss auf die in Cokultur detektierte verstärkte Migration ausüben kann.

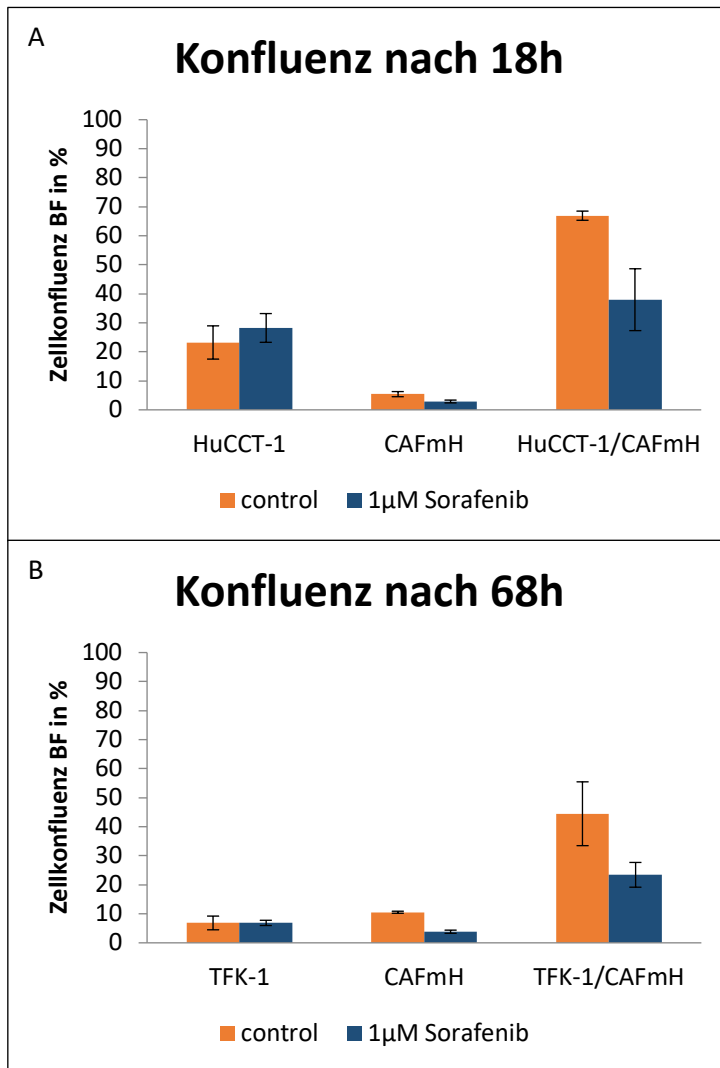


Abb. 4.7: Parakrines-Interaktions-Modell - Behandlung mit 1 µM Sorafenib

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an konfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der unbehandelten oder mit 1 µM Sorafenib behandelten Monokultur aus HuCCT-1, CAFmH und deren Cokultur (A), bzw. die der TFK-1, CAFmH sowie deren Cokultur (B). Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen.

Dazu wurde, wie in Abschnitt 4.2.2 dargestellt, eine Sorafenibkonzentration von 1 μ mol ausgewählt, um einer Verfälschung des Effekts einer möglichen Migrationsreduktion durch Sorafenib durch eine zu starke Hemmung des Zellwachstums entgegenzuwirken.

Bereits nach 18 h Behandlung konnte in der Cokultur aus intrahepatischer CCC-Zelllinie HuCCT-1 und CAFmH ein inhibierender Effekt im Vergleich zur unbehandelten Cokultur detektiert werden.

Die Zellkonfluenz war hier gegenüber der Kontrollgruppe um 29% reduziert (s. Abb.4.7), während in der HuCCT-1-Monokultur keine signifikante hemmende Wirkung eintrat. Die Migration der CAFmH in Monokultur konnte nach 18 h durch die Behandlung von 5,4 % auf 2,9% reduziert werden.

Auch die Cokultur aus extrahepatischer CCC-Zelllinie TFK-1 und CAFmH zeigte eine signifikante Hemmung der Migration nach Applikation von Sorafenib nach 68 h. Verglichen zur Kontrollgruppe war die Konfluenz hier um 21% reduziert. Auch hier konnte in der TFK-1-Monokultur keine signifikante Hemmung der Migration detektiert werden. Jedoch resultierte die Behandlung mit Sorafenib in einer abgeschwächten Konfluenz der CAFmH im Spalt von 10,5% auf 3,8%.

4.2.4 Erhöhte Zytokinsekretion in Cokultur mit CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 und CAFmH sowie Reduktion dieser durch Sorafenib

Mithilfe des *Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit Panel A*-Zytokinkits von R&D-Systems sollten mögliche Faktoren für die im Parakrinen-Interaktions-Modell observierten migrationsstimulierenden Wechselwirkungen zwischen CCC-Tumorzelllinien und CAFmH (s. Punkt 4.2.1) identifiziert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob die Behandlung mit Sorafenib die Freisetzung bestimmter Faktoren beeinflusst. Dazu wurden die Überstände aus den Parakrinen-Interaktions-Modellen nach 72 h auf die Anwesenheit von 36 unterschiedlichen Zytokinen analysiert. In der CAFmH-Monokultur konnten deutliche Mengen an MCP-1 und IL-8 detektiert werden sowie eine niedrige, aber detektierbare Menge an CXCL-1 und IL-6. In der HuCCT-1-Monokultur hingegen konnte lediglich eine marginale IL-8-Freisetzung, jedoch keine MCP-1-, CXCL-1- und IL-6-Sekretion nachgewiesen werden. In der Cokultur aus HuCCT-1 und CAFmH konnten ebenfalls starke Mengen an MCP-1- und IL-8- sowie geringere Mengen an CXCL-1- und IL-6-Sekretion detektiert werden.

Die Behandlung mit 1 μ M Sorafenib führte zu einer stark verminderten Freisetzung von IL-6 und IL-8 sowie zu einer leicht verminderten Sekretion von MCP-1 und CXCL-1 in der CAFmH-Monokultur.

In der HuCCT-1-Monokultur war kein ausgeprägter inhibierender Effekt durch Sorafenib auf die IL-8-Freisetzung zu verzeichnen. In Cokultur konnte eine Reduktion der Zytokinsekretion bei allen 4 Zytokinen beobachtet werden.

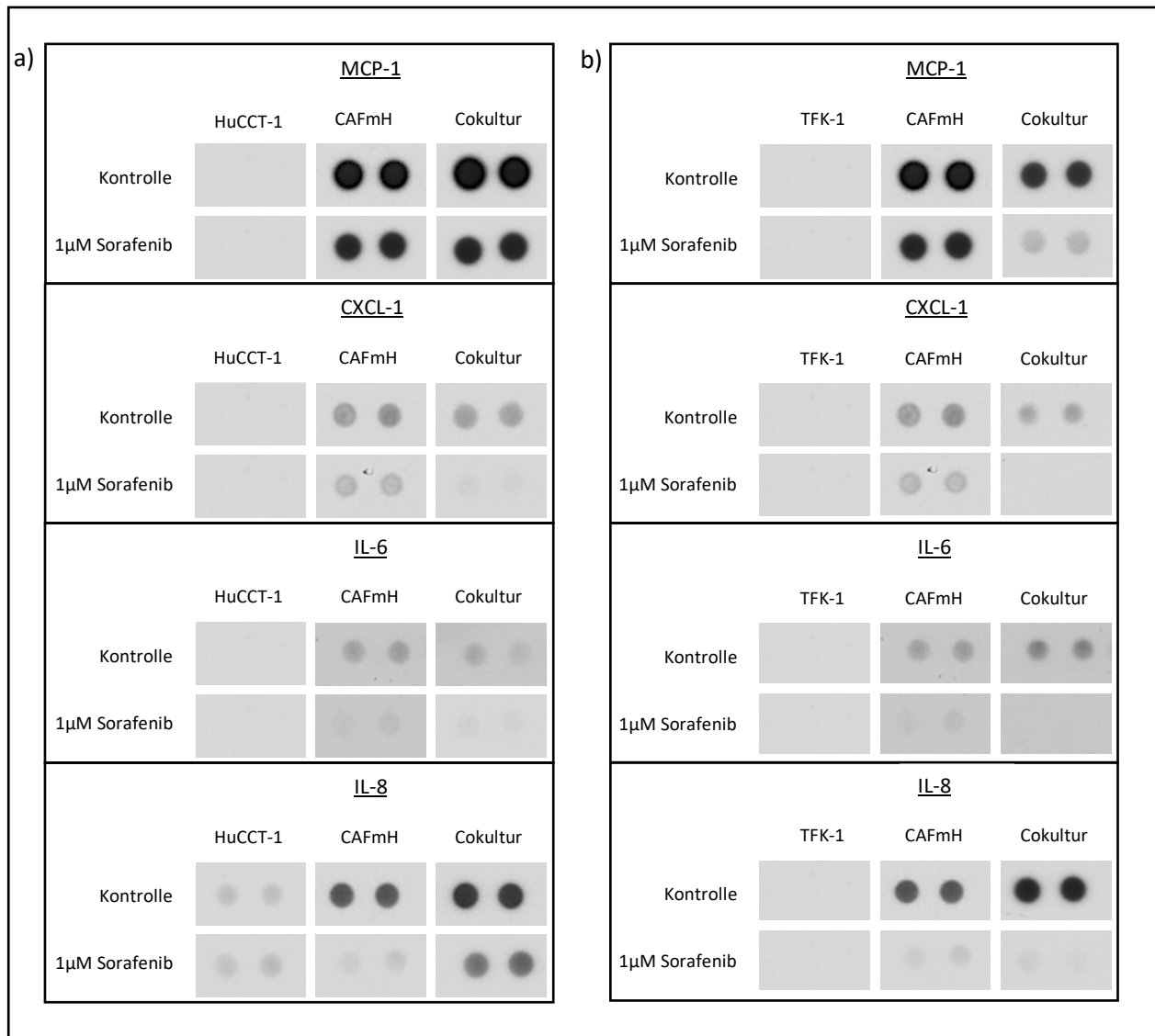


Abb. 4.8: Unterschiede in der Zytokinfreisetzung durch CAFmH, beide CCC-Zelllinien bzw. während der Cokultur sowie inhibierende Auswirkungen durch Applikation von 1 µM Sorafenib

a) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zytokinfreisetzung durch tumorassoziierte Fibroblasten (CAFmH), HUCCT-1-Zellen sowie der Cokultur (nach 72 h) inklusive und exklusive 1 µM Sorafenib. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

b) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zytokinfreisetzung durch tumorassoziierte Fibroblasten (CAFmH), TFK-1-Zellen sowie der Cokultur (nach 72 h) inklusive und exklusive 1 µM Sorafenib. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

Dabei glich das Ausmaß der MCP-1- und IL-6-Reduktion annähernd dem der CAFmH-Monokultur. Jedoch zeigte sich verglichen zur CAFmH-Monokultur einerseits eine verstärkte CXCL1-Reduktion durch Sorafenib in Cokultur, andererseits eine verminderte Reduktion von IL-8 unter Sorafenib verglichen zur CAFmH-Monokultur.

In der TFK-1-Monokultur konnte weder eine IL-8-Sekretion, noch eine IL-6-, MCP-1- oder CXCL1-Freisetzung festgestellt werden. In der Cokultur aus TFK-1 und CAFmH konnten – wie auch schon bei den HuCCT-1 in Cokultur – eine geringe, aber detektierbare Menge an CXCL-1 und IL-6 sowie eine erhöhte Menge an MCP-1 und IL-8 detektiert werden. Dabei entsprach das Ausmaß der Freisetzung an CXCL-1 und IL-6 weitestgehend dem der CAFmH-Monokultur.

Nach Applikation von 1 μ M Sorafenib zeigte sich in Cokultur eine ausgeprägte Reduktion der Freisetzung aller getesteten Zytokine. Verglichen zur Cokultivierung der HuCCT-1 mit CAFmH war hier der hemmende Effekt durch Sorafenib auf die Sekretion von MCP-1 und IL-8 deutlich ausgeprägter.

Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte Freisetzung von MIF und Serpin E1 in der HuCCT-1- sowie CAFmH-Monokultur, welche jedoch durch Sorafenib nicht ausreichend inhibiert werden konnte. In der Monokultur mit TFK-1 konnte lediglich eine erhöhte Freisetzung an MIF detektiert werden (Daten nicht dargestellt).

4.2.5 Einfluss von konditioniertem CAFmH-Medium auf die Signaltransduktion in der intra- und extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1

Um die parakrinen Interaktionen zwischen den CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 und den CAFmH näher zu ergründen, wurden die intra- sowie extrahepatische CCC-Zelllinie jeweils mit konditioniertem CAFmH-Medium stimuliert und mittels Western Blot eine mögliche Änderung in verschiedenen Signalwegen detektiert. Fokus lag hierbei auf den phosphorylierten sowie unphosphorylierten Signalproteinen Stat3, JNK, Akt und Erk, die bei Aktivierung mit verstärktem Wachstum assoziiert sind. Als Ladekontrolle diente β -Actin.

4.2.5.1 *Aktivierung der MAPK-, PI3K-Akt-, JAK-STAT-Signalwege in der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 nach Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Medium sowie Hemmung dieser Effekte durch Sorafenib*

Nach Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium war gegenüber der Kontrolle in allen aufgeführten Signalproteinen eine erhöhte Aktivierung zu verzeichnen (s. Abb.4.9). Die Applikation von 1 μ M Sorafenib führte zu einer Abnahme der Phosphorylierung der Signalproteine JNK, Akt und Erk. Bei einer Konzentration von 10 μ M Sorafenib konnte für Stat3 sowie JNK keine und für Erk lediglich eine marginale Aktivierung detektiert werden, jedoch resultierte paradoxerweise die Zugabe von 10 μ M Sorafenib in einer Hyperphosphorylierung von Akt.

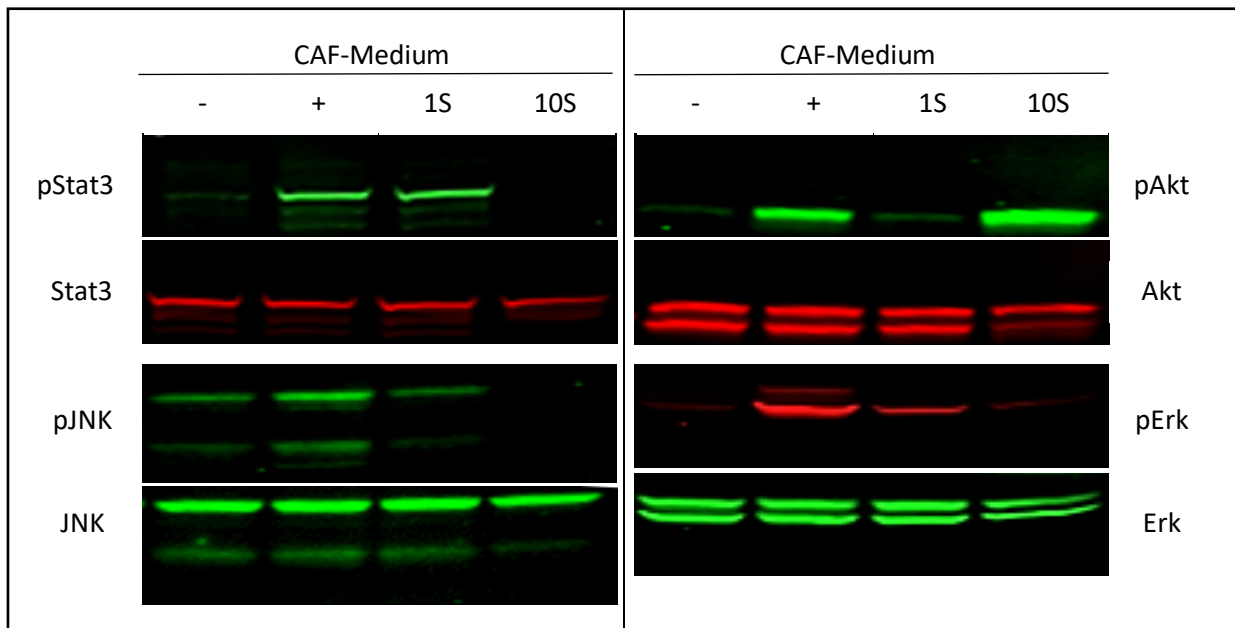


Abb. 4.9: Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des MAPK-, PI3K-Akt- sowie des JAK-STAT-Signalweges

Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus n=3 unabhängigen Versuchen, in denen die TFK-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium stimuliert wurden. Zur Behandlung wurde konditioniertes CAFmH-Medium inklusive 1 μ M Sorafenib (1S) bzw. 10 μ M Sorafenib (10S) verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus 0% FCS-haltigem Medium.

4.2.5.2 Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges in der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 nach Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Medium und kein inhibierender Effekt durch Sorafenib

Verglichen zur extrahepatischen CCC-Zelllinie resultierte die Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium lediglich in einer erhöhten Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges. Ein hemmender Effekt durch 1 μ M Sorafenib konnte mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte eine Sorafenibkonzentration von 10 μ M eine reduzierte Phosphorylierung von JNK. Paradoxerweise wurde auch in der intrahepatischen CCC-Zelllinie eine Hyperaktivierung von Akt beobachtet.

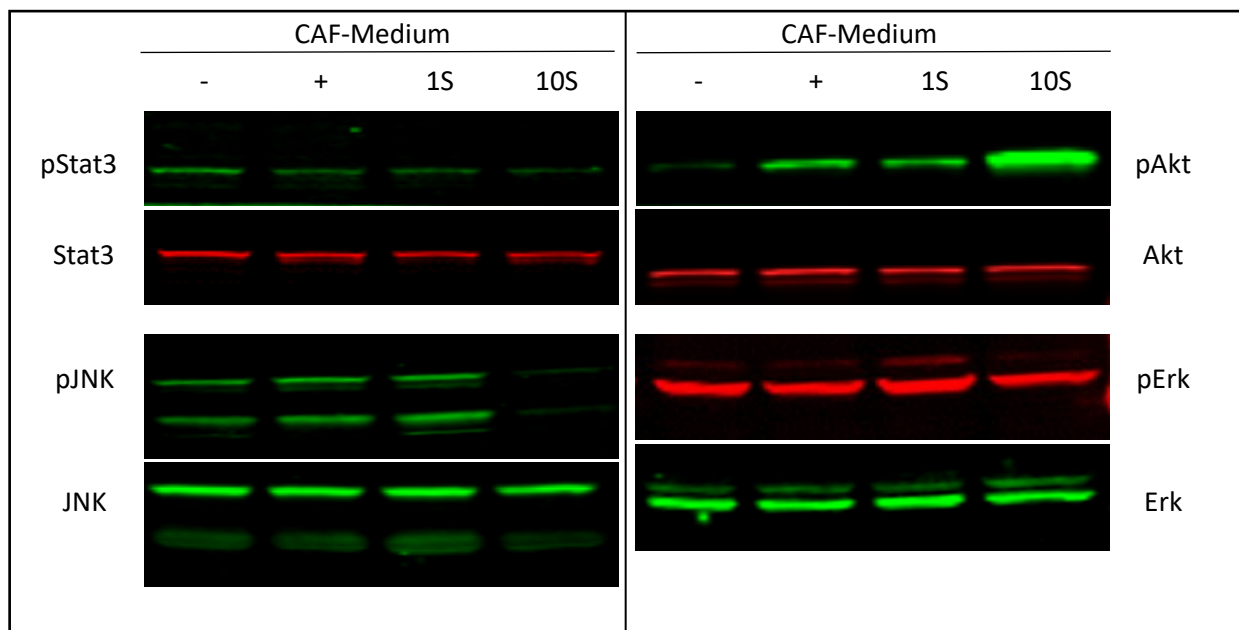


Abb. 4.10: Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem CAFmH-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges

Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus n=3 unabhängigen Versuchen, in denen die HuCCT-1 mit konditioniertem CAF-Medium stimuliert wurden. Zur Behandlung wurde konditioniertes CAFmH-Medium inklusive 1 µM Sorafenib (1S) bzw. 10 µM Sorafenib (10S) verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus 0% FCS-haltigem Medium.

4.3 Die Präsenz S100-positiver Schwann'scher Zellen im Tumorstroma bei CCC-Patienten korreliert mit schlechterem tumorfreiem Überleben

Um die Bedeutung des Tumorstromas in Bezug auf die Prognose beim CCC noch um einen Parameter zu erweitern, sollten nun Gewebeschnitte von CCC-Patienten immunhistochemisch auf die Anwesenheit von Schwann'sche Zellen als Bestandteil der Perineuralscheiden analysiert werden. Anschließend sollte erneut die Dichte mit dem tumorfreien Überleben korreliert werden. Dazu wurden vorläufig die bereits zur immunhistochemischen Analyse der CAFs verwendeten (s. Punkt 4.1) 14 (intrahepatisch: n=5, extrahepatisch: n=9) Gewebeschnitte vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt der Operation befanden sich 3 Patienten im TMN-Stadium T1, 9 im Stadium T2 sowie 2 im Stadium T3. Die Asservierung erfolgte im Einverständnis der Patienten sowie des Ethik-Komitees der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Es wurde eine immunhistochemische Färbung der für die Schwann'schen Zellen charakteristischen Proteine S100, SOX-10 und GFAP durchgeführt. In 5/14 Gewebeschnitten zeigte sich eine schwach bis mäßig starke Färbung von S100.

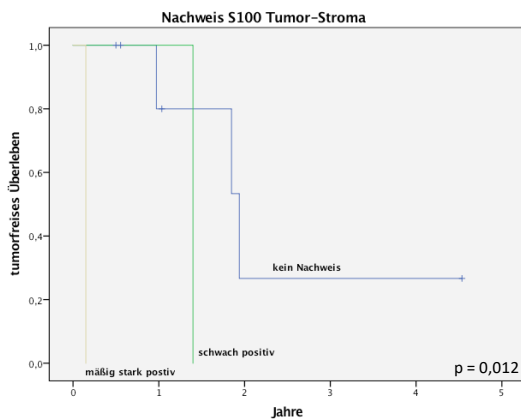


Abb. 4.11: Korrelation der Intensität der immunhistochemischen Färbung mit S100 im Tumorstroma beim CCC mit tumorfreiem Überleben

Kaplan-Meier-Kurven für tumorfreies Überleben von CCC-Patienten in Abhängigkeit von der Farbintensität von S100 im Tumorstroma. (n = 14 CCC-Patienten, davon 5 mit intrahepatischem und 9 mit extrahepatischem Tumor). Die statistischen Signifikanzen sind in der Grafik enthalten.

Eine erhöhte Farbintensität durch S100 ($p=0,012$) im Tumorstroma beim CCC korrelierte mit einem reduzierten tumorfreien Überleben der Patienten, ähnlich zu den Beobachtungen α SMA- sowie FSP-1-postiver CAFs (s. Punkt 4.1). Die Intensität an SOX-10- sowie GFAP-positiven Schwann'schen Zellen hatte keinen signifikanten Einfluss auf das tumorfreie Überleben.

4.4 Einfluss von Perineuralscheiden (HSC) auf die Migration intra- und extrahepatischer CCC-Zelllinien

4.4.1 Erhöhte Migration der HSC in Cokultivierung mit intra- und extrahepatischer CCC-Zelllinie HuCCT-1 bzw. TFK-1

Um einen möglichen Einfluss parakriner Interaktionen von Perineuralscheiden auf die Migration der CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 zu untersuchen, wurden die Tumorzellen nun mit der Schwann-Zelllinie HSC im „Parakrinen-Interaktions-Modell“ für 72h in 0%-FCS-haltigem Kulturmedium kokultiviert.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Cokultivierung mit den HSC nicht in einer erhöhten Migration der Tumorzellen, wie bei der Cokultivierung mit den CAFmH beobachtet, resultierte (vgl. Abb.4.12 + 4.13), jedoch aber in einer verstärkten Migration der HSC in Richtung HuCCT-1 bzw. TFK-1. Insbesondere in Cokultur mit der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 war bereits nach 18 h eine Erhöhung der Migration der Schwann'schen Zellen zu verzeichnen, die nach 44 h ihr Maximum erreichte (s. Abb. 4.13). Die kokultivierten HuCCT-1 zeigten hingegen lediglich einen geringeren Einfluss auf die Migration der Schwann'schen Zellen. Der größte Effekt wurde hier nach 18h detektiert (s. Abb. 4.12).

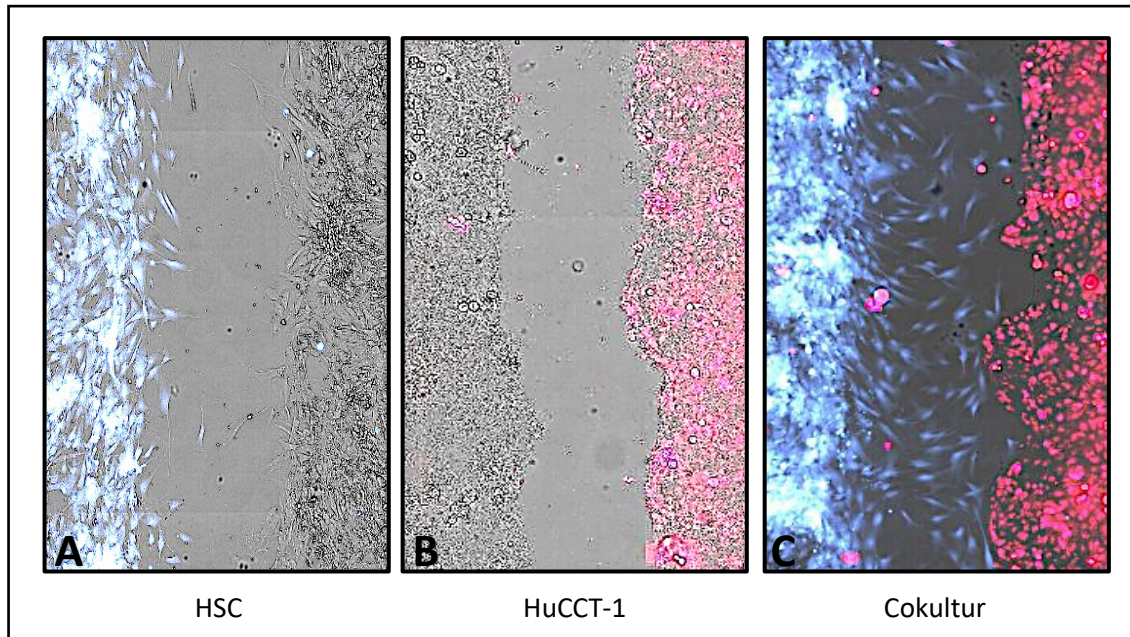


Abb. 4.12: Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1 und HSC nach 18h

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Konfluenz im Spalt der Schwann'schen Zellen (HSC) (A), der HuCCT-1 (B) sowie deren Cokultur (C) nach 18h. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 10x-Vergrößerungsobjektivs des NyONE-Imagers generiert. Zur Unterscheidung beider Zelltypen wurden die HuCCT-1 mithilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs und die HSC mithilfe eines blauen Fluoreszenzfarbstoffs markiert (C). Zudem wurde zur besseren Übersicht eine Zellfront der HuCCT-1 in Monokultur mittels roten Fluoreszenzfarbstoffs (B) sowie eine Zellfront der HSC in Monokultur mittels blauen Fluoreszenzfarbstoffs (A) markiert. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Experimenten.

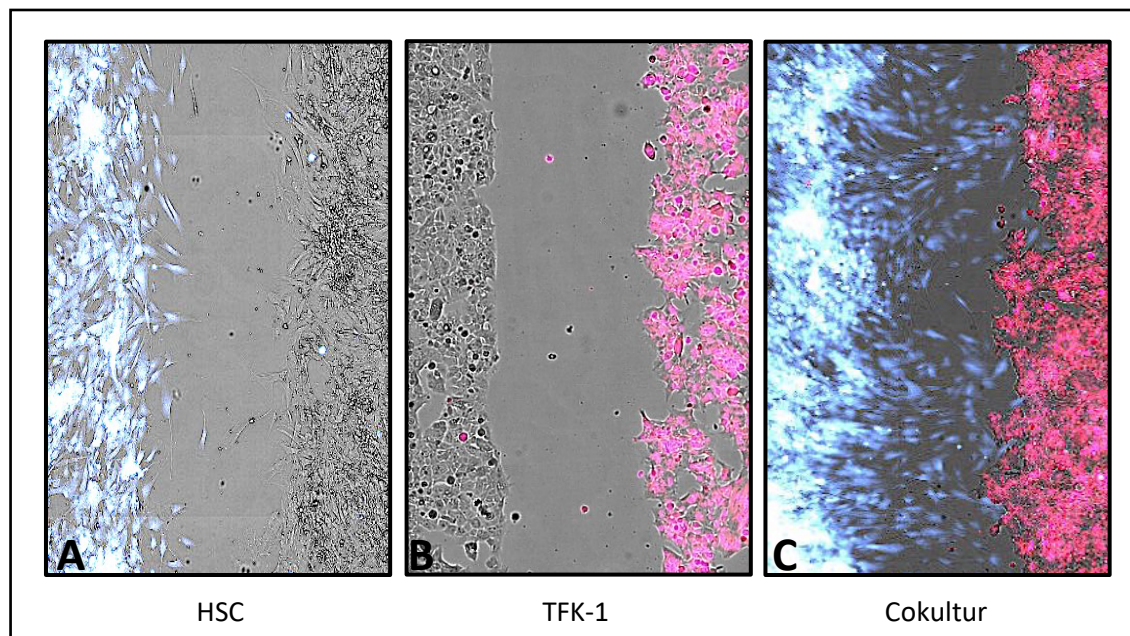


Abb. 4.13: Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1 und HSC nach 18h

Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Konfluenz im Spalt der Schwann'schen Zellen (HSC) (A), der TFK-1 (B) sowie deren Cokultur (C) nach 18h. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 10x-Vergrößerungsobjektivs des NyONE-Imagers generiert. Zur Unterscheidung beider Zelltypen wurden die TFK-1 mithilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs und die HSC mithilfe eines blauen Fluoreszenzfarbstoffs markiert (C). Zudem wurde zur besseren Übersicht eine Zellfront der TFK-1 in Monokultur mittels roten Fluoreszenzfarbstoffs (B) sowie eine Zellfront der HSC in Monokultur mittels blauen Fluoreszenzfarbstoffs (A) markiert. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Experimenten.

Mithilfe eines *wound healing*-Operators von SYNENTEC wurde die konfluente Fläche im Spalt im Hellfeld quantifiziert und somit die Zellkonfluenz in den unterschiedlichen Konditionen bestimmt. Somit beziehen sich die in den Abbildungen 4.14 und 4.15 dargestellten Zellkonfluenzen in Cokultur sowohl auf die im Spalt vorhandene jeweilige Tumor-Zelllinie als auch auf die HSC, wobei die Anzahl an HSC deutlich überwiegt (vgl. Abb. 4.12 + 4.13). Eine Reduktion des verstärkten HSC-Wachstums konnte nach Applikation von 1 μ M Sorafenib nicht beobachtet werden (Grafik siehe Anhang).

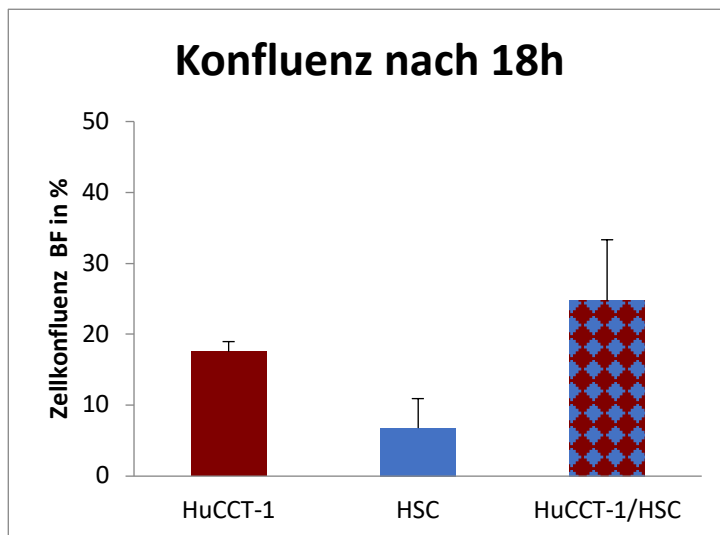


Abb. 4.14: Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1, HSC sowie deren Cokultur nach 18 h – Quantifizierung

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an zellkonfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der HuCCT-1- bzw. CAFmH-Monokultur sowie deren Cokultur. Die Daten sind als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

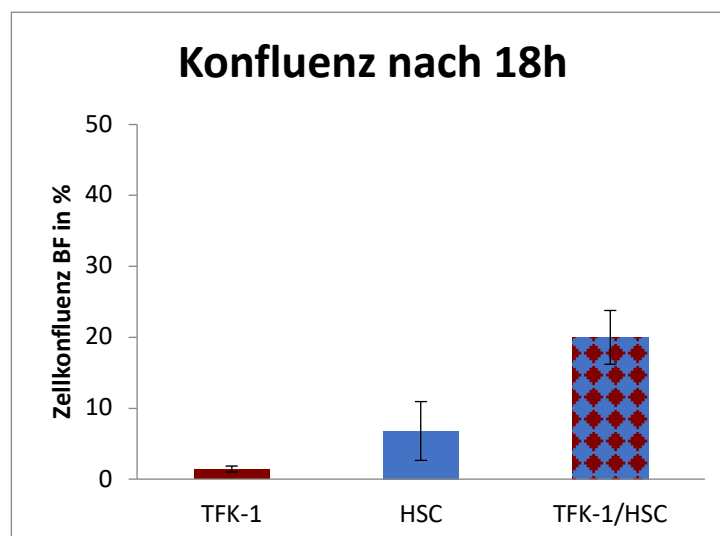


Abb. 4.15: Parakrines-Interaktions-Modell für TFK-1, HSC sowie deren Cokultur nach 18 h – Quantifizierung

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an zellkonfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der TFK-1- bzw. HSC-Monokultur sowie deren Cokultur. Die Daten sind als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Migration der HSC insbesondere in Anwesenheit der extrahepatischen CCC- Zelllinie TFK-1 signifikant erhöht war. Nach 18 h war die Konfluenz im Spalt in der Cokultur mit 20% verglichen zu der jeweiligen Monokultur (TFK-1 = 1%, HSC = 7%) deutlich erhöht (s. Abb. 4.15). Eine Cokultivierung der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 mit den HSC hatte jedoch nur marginalen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Schwann'schen Zellen. Hier betrug die Konfluenz des Spalts in Cokultur verglichen zu der jeweiligen Monokultur (HuCCT-1 = 18%, HSC = 7%) lediglich 25% (s. Abb. 4.14). Anhand der Abbildung 4.14 wird dennoch ersichtlich, dass auch die Cokultivierung mit den HuCCT-1 einen geringen stimulativen Einfluss auf das Migrationsverhalten der HSC auslöst.

4.4.2 Inhibierung des Zellwachstums durch Sorafenib in den Schwann'schen Zellen (HSC)

Nach der bereits beschriebenen wachstumshemmenden Wirkung von Sorafenib auf beide CCC-Zelllinien (s. Abb. 4.6) sollte nun ein möglicher inhibierender Effekt auf die Schwann'schen Zellen (HSC) untersucht werden. Dazu wurden die HSC ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 96 h einerseits unbehandelt, andererseits mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sorafenib kultiviert. Nach Zugabe von AlamarBlue-Reagenz konnte nach 3 h die Fluoreszenz, die linear mit der metabolischen Aktivität korreliert, detektiert werden. Anhand der Rohdaten konnte eine Dosis-Wirkungskurve der HSC mit Sorafenib erstellt werden. Hier offenbarte Sorafenib mit zunehmender Behandlungsdauer sowie Dosis ebenfalls eine verstärkte Hemmung des Zellwachstums (s. Abb. 4.16).

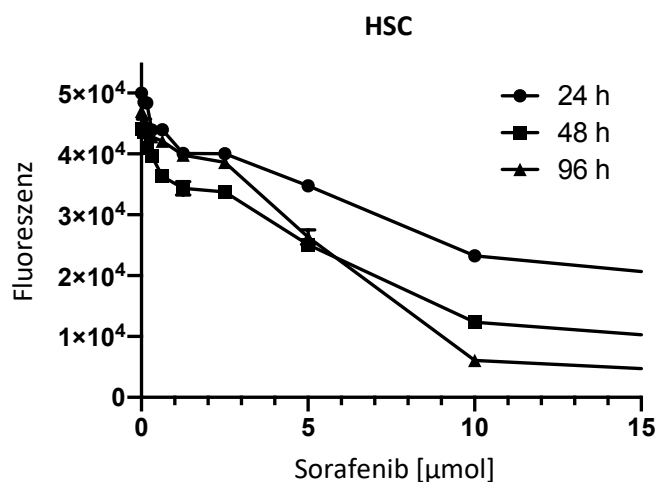


Abb. 4.16: Dosis-Wirkungs-Kurven mit Sorafenib für die HSC

Steigende Konzentrationen an Sorafenib zeigen einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum in den HSC. Die Daten sind als Mittelwerte inklusive Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

Zudem wurde anhand dieser Dosis-Wirkungskurven für weitere Experimente der Cokultur zwischen CCC-Zelllinie und HSC im Parakrinen-Interaktions-Modell eine Sorafenibkonzentration von 1 μ M ausgewählt. Somit wäre eine mögliche Reduktion der Migration in der behandelten Cokultur (s. Abschnitt 4.4.1) aufgrund der bei einer Sorafenibkonzentration von 1 μ M lediglich geringen Inhibierung des Zellwachstums eher mit anderen Mechanismen wie beispielsweise der Inhibierung parakriner Interaktionen zwischen beiden Zelllinien assoziiert.

4.4.3 Erhöhte Zytokinsekretion in Cokultur mit CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 und HSC sowie keine Hemmung durch Sorafenib.

Um den im Parakrinen-Interaktions-Modell beobachteten Einfluss der Tumor-Stroma-Interaktionen auf das Migrationsverhalten der Schwann'schen Zellen näher zu analysieren, wurde auch hier ein Zytokinscreening mithilfe des *Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit Panel A*-Zytokinkits von R&D-Systems durchgeführt. Erneut wurden dafür die Überstände aus den Parakrinen-Interaktions-Modellen nach 72h verwendet.

Verglichen zum Zytokinscreening der Monokultur aus CAFmH konnten in der HSC-Monokultur lediglich deutliche Mengen an MIF und Serpin E1 nachgewiesen werden. In Monokultur mit HuCCT-1 konnte eine leicht erhöhte MIF- sowie eine stark erhöhte Serpin E1-Sekretion detektiert werden.

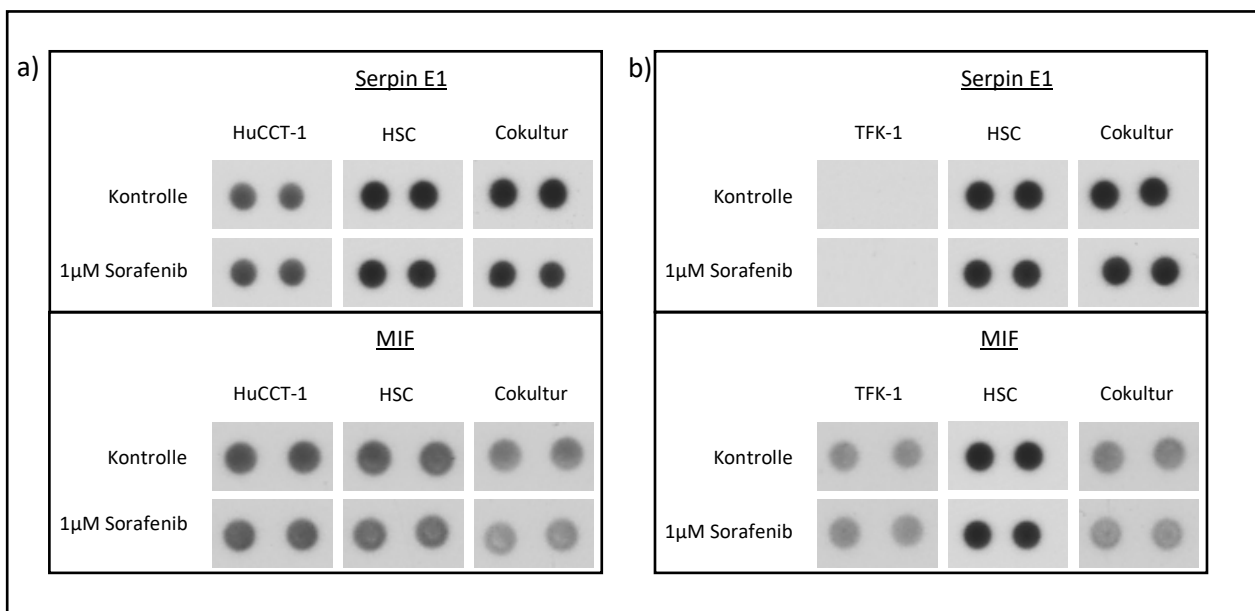


Abb. 4.17: Unterschiede in der Zytokinfreisetzung bei HSC, beiden CCC-Zelllinien und deren Cokultur sowie hemmende Auswirkungen durch Applikation von 1 μ M Sorafenib

a) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zytokinfreisetzung der Schwann'schen Zellen (HSC), der HUCCT-1 sowie deren Cokultur (nach 72 h) inklusive und exklusive 1 μ M Sorafenib. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

b) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zytokinfreisetzung der Schwann'schen Zellen (HSC), der TFK-1 sowie deren Cokultur (nach 72 h) inklusive und exklusive 1 μ M Sorafenib. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

In der Cokultur aus HuCCT-1 und HSC konnte ebenfalls eine starke Serpin E1- und eine leichte MIF-Sekretion nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Zytokinfreisetzung zwischen HSC-Monokultur und Cokultur stellten sich jedoch als nicht signifikant heraus (s. Abb. 4.17 a).

In der TFK-1-Monokultur konnte lediglich eine geringe Menge an MIF, jedoch kein Serpin E1 detektiert werden. Auch hier entsprach die Serpin E1-Freisetzung in der Cokultur weitestgehend dem der HSC-Monokultur, die MIF-Sekretion schien hingegen in Cokultur etwas schwächer ausgeprägt zu sein (s. Abb. 4.17 b). Analog zu den Ergebnissen aus dem Parakrinen-Interaktions Modell (s. Punkt 4.4.1) hatte die Applikation von 1 μ M Sorafenib in keinem der genannten Zellkonditionen einen ausgeprägten inhibierenden Effekt.

4.4.4 Einfluss von konditioniertem HSC-Medium auf die Signaltransduktion in der intra- und extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1

Analog zum bereits aufgezeigten stimulierenden Effekt der CAFmH auf die Tumorzellen auf Signaltransduktionsebene (s. Abschnitt 4.2.5) sollte nun ebenfalls ein möglicher Einfluss der Schwann'schen Zellen auf die intra- und extrahepatische CCC-Zelllinie mithilfe von Westernblots analysiert werden. Fokus lag wiederum auf den phosphorylierten sowie unphosphorylierten Signalproteinen Stat3, JNK, Akt und Erk. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

4.4.4.1 Aktivierung von MAPK- sowie PI3K-Akt-Signalweg nach Stimulation mit konditioniertem HSC-Medium in der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 und marginaler inhibierender Effekt durch Sorafenib

Es konnte eine verstärkte Aktivierung des MAPK- sowie PI3K-Akt-Signalweges nach Stimulation der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 mit konditioniertem HSC-Medium beobachtet werden (s. Abb. 4.18). Insbesondere für JNK, Erk und Akt war der Phosphorylierungsgrad verglichen zur Kontrolle aus 0%-FCS-haltigem Kulturmedium deutlich erhöht.

Im Gegensatz zur Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Medium konnte hier jedoch keine Phosphorylierung von Stat3 und somit keine Aktivierung des JAK-Stat-Signalweges detektiert werden. Die Zugabe von 1 μ M Sorafenib resultierte einerseits in einer marginalen Reduktion der Phosphorylierung von JNK und Akt, andererseits paradoxerweise in einer gesteigerten Erk-Aktivierung in den TFK-1, die nach Stimulation mit CAFmH-Medium nicht beobachtet werden konnte (s. Abb. 4.9). Nach Applikation von 10 μ M Sorafenib wurde einerseits erneut eine paradoxe Hyperphosphorylierung von AKT nachgewiesen, andererseits aber auch eine verstärkte Aktivierung von ERK, die nach Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Medium ebenfalls nicht detektiert wurde.

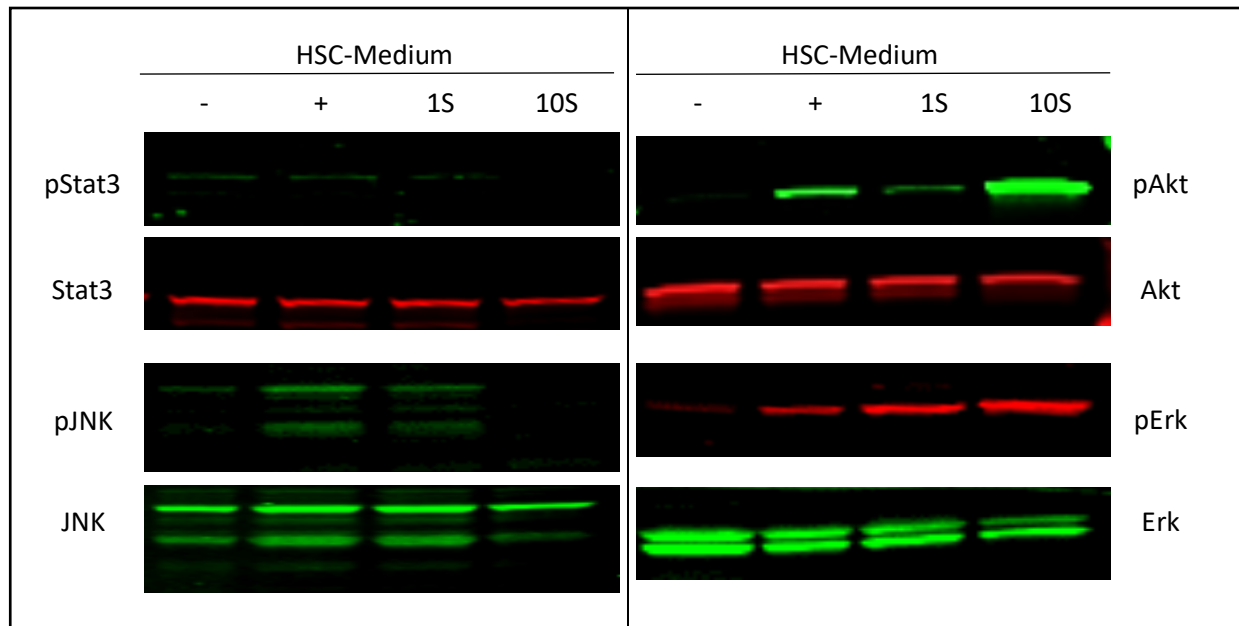


Abb. 4.18: Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem HSC-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Akt-Signalweges

Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus n=3 unabhängigen Versuchen, in denen die TFK-1 mit konditioniertem HSC-Medium stimuliert wurden. Für die Behandlung wurde konditioniertes HSC-Medium inklusive 1 μ M Sorafenib (1S) bzw. 10 μ M Sorafenib (10S) verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus 0% FCS-haltigem Medium.

4.4.4.2 *Konditioniertes HSC-Medium hat keinen Effekt auf MAPK-, PI3K-Akt- und JAK-Stat-Signalwege in der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1*

In den HuCCT-1 konnte hingegen bis auf eine marginal verstärkte Akt-Phosphorylierung unter 10 μ M Sorafenib keine weiteren signifikanten Änderungen im MAPK- sowie JAK-STAT-Signalweg detektiert werden. Dieses Resultat bekräftigt die These aus dem Parakrinen-Interaktions-Modell, dass die Interaktionen zwischen Schwann'schen Zellen und TFK-1 womöglich ausgeprägter sind als in der Cokultur mit den HuCCT-1.

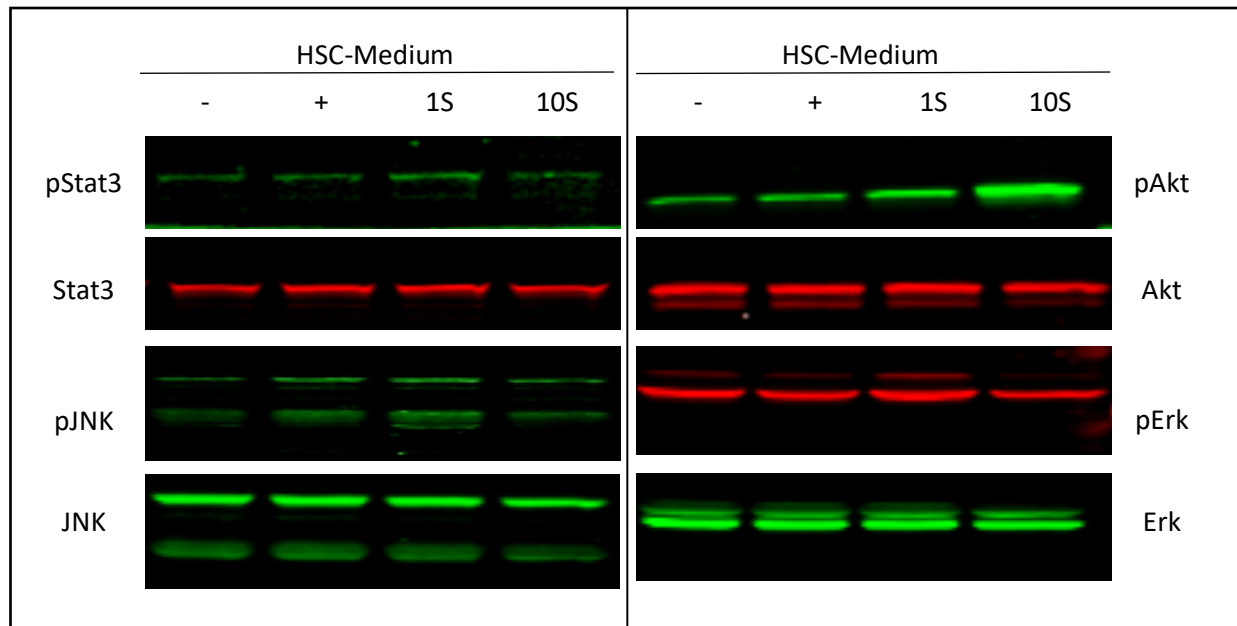


Abb. 4.19: Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem HSC-Medium führt zu keiner verstärkten Aktivierung in den getesteten Signalwegen

Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus n=3 unabhängigen Versuchen, in denen die HuCCT-1 mit konditioniertem HSC-Medium stimuliert wurden. Für die Behandlung wurde konditioniertes HSC-Medium inklusive 1 μ M Sorafenib (1S) bzw. 10 μ M Sorafenib (10S) verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus 0% FCS-haltigem Medium.

4.5 Einfluss von CAFs und Perineuralscheiden auf die Migration der intra- und extrahepatischer CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1

Um einen möglichen additiven oder sogar synergistischen Effekt der CAFmH und der Schwann'schen Zellen (HSC) auf die Migration der intra- und extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1 nachzuweisen, wurde das Migrationsverhalten in Cokultur mit den 3 Zellarten im Parakrinen-Interaktions-Modell, auf Zytokin- sowie Signaltransduktionsebene untersucht.

4.5.1 Kein synergistischer Effekt auf die Migration der mit beiden Stromazelllinien kokultivierten intra- bzw. extrahepatischen CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1

Mithilfe des Parakrinen Interaktions-Modells sollte nun das Migrationsverhalten der beiden CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 bei simultaner Cokultivierung mit HSC und CAFmH analysiert werden. Es zeigte sich insbesondere eine verstärkte Migration der HuCCT-1 nahe des CAFmH-Kompartiments nach 18 h, während das Migrationsverhalten dieser CCC-Zelllinie im Bereich des HSC-Kompartiments hingegen lediglich marginal erhöht war.

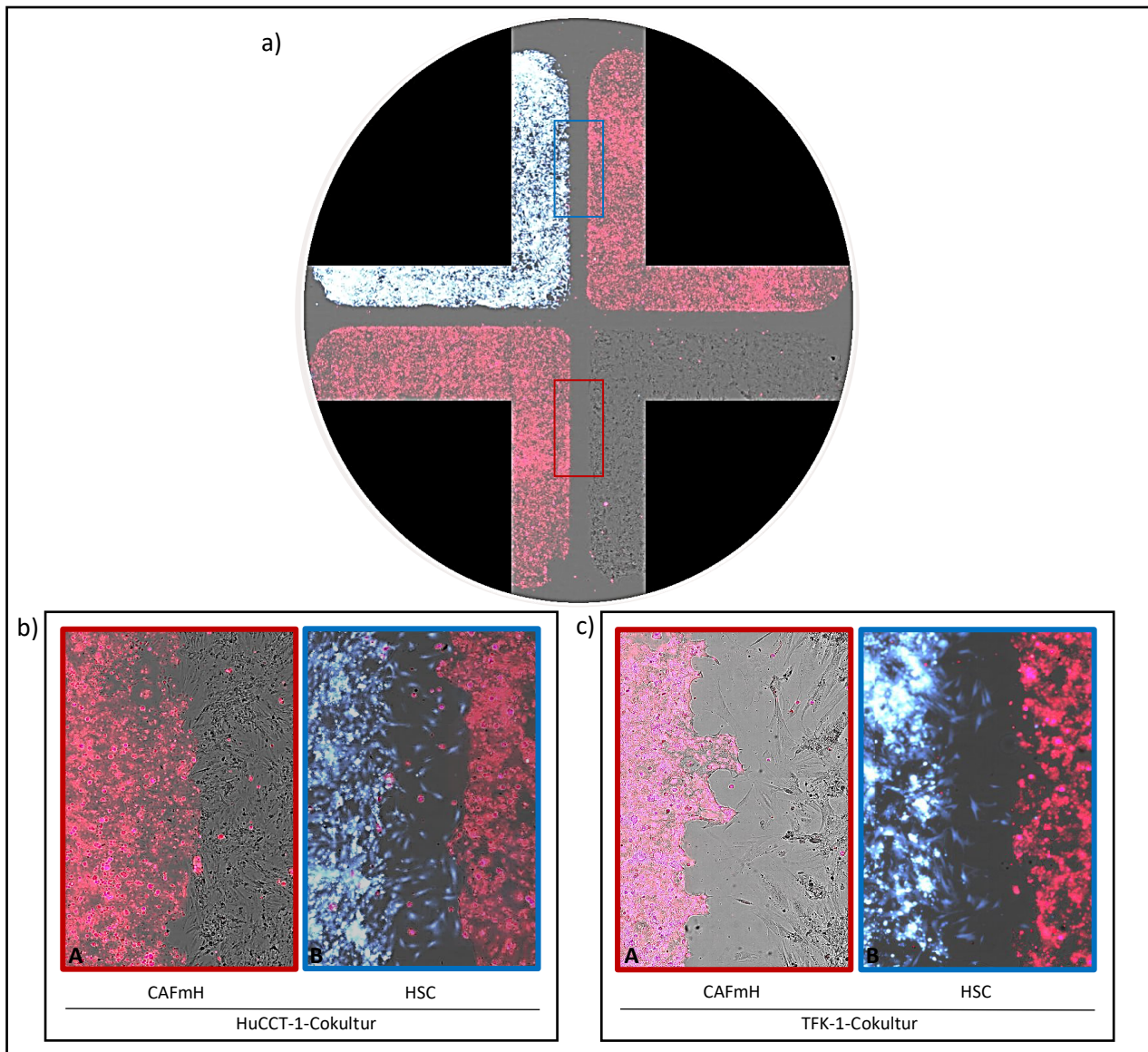


Abb. 4.20: Parakrines-Interaktions-Modell für HuCCT-1 bzw. TFK-1 in Cokultur mit beiden Stromazelllinien CAFmH und HSC

a) Übersichtsgrafik eines Experiments zum Zeitpunkt $t=0$ h (Rot=jeweilige CCC-Zelllinie, blau=HSC, ungefärbt=CAFmH).

b) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Konfluenz im Spalt bei Cokultivierung der HuCCT-1 mit CAFmH und HSC zum Zeitpunkt $t=18$ h. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 10x-Vergrößerungsobjektivs des NyONE-Imagers generiert. Die Bildausschnitte veranschaulichen die Konfluenz im Spalt im HuCCT-1- und CAFmH-Kompartiment (A) sowie die Konfluenz im Spalt im HuCCT-1- und HSC-Kompartiment (B). Zur Unterscheidung beider Zelltypen wurden die HuCCT-1 mithilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs markiert, und die HSC mithilfe eines blauen Fluoreszenzfarbstoffs markiert. Das Bildmaterial stammt aus einem von $n=3$ unabhängigen Experimenten.

c) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Konfluenz im Spalt bei Cokultivierung der TFK-1 mit CAFmH und HSC. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 10x-Vergrößerungsobjektivs des NyONE-Imagers generiert. Die Bildausschnitte veranschaulichen die Konfluenz im Spalt im TFK-1- und CAFmH-Kompartiment zum Zeitpunkt $t=68$ h (A) sowie die Konfluenz im Spalt im TFK-1- und HSC-Kompartiment zum Zeitpunkt $t=18$ h (B). Zur Unterscheidung beider Zelltypen wurden die TFK-1 mithilfe eines roten Fluoreszenzfarbstoffs markiert, und die HSC mithilfe eines blauen Fluoreszenzfarbstoffs markiert. Das Bildmaterial stammt aus einem von $n=3$ unabhängigen Experimenten.

Verglichen zu den Cokulturversuchen HuCCT-1/CAFmH (s. Abschnitt 4.2.1) und HuCCT-1/HSC (s. Abschnitt 4.4.1) war in diesem Experiment die Konfluenz im jeweiligen Spalt deutlich geringer.

In Cokultivierung mit den TFK-1 wurde nach 68 h eine verstärkte Migration der extrahepatischen CCC-Zelllinie im Bereich der CAFmH beobachtet, die sich verglichen zum Cokulturversuch TFK-1/CAFmH (s. Abschnitt 4.2.1) als abgeschwächt darstellte. Im HSC/TFK-1-Kompartiment war eine marginal verstärkte Migration der HSC zu verzeichnen, die sich im Vergleich zur Cokultur TFK-1/HSC (s. Abschnitt 4.4.1) ebenfalls als deutlich schwächer herausstellte. Somit konnte für beide CCC-Zelllinien kein synergistischer Effekt auf das Migrationsverhalten nachgewiesen werden.

4.5.2 Reduzierte Sorafenibempfindlichkeit der mit beiden Stromazelllinien kokultivierten extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1, kein veränderter Effekt in der Cokultur mit der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1

Ein möglicher inhibierender Effekt durch Sorafenib sollte ebenfalls analog zu den vorherigen Cokultur-Experimenten mithilfe des Parakrinen-Interaktions-Modells untersucht werden.

Es zeigte sich, dass die Wirkung von Sorafenib in der Cokultur mit der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 und beiden Stromazelllinien (CAFmH und HSC) gegenüber der Cokultur mit CAFmH reduziert war. Während die Applikation von 1 μ M Sorafenib in der Cokultur aus TFK-1 und CAFmH die Konfluenz im Spalt von 45% auf 23% reduzieren konnte, konnte in der Cokultivierung aus TFK-1 mit beiden Stromazelllinien Im Kompartiment aus TFK-1 und CAFmH keine Hemmung detektiert werden.

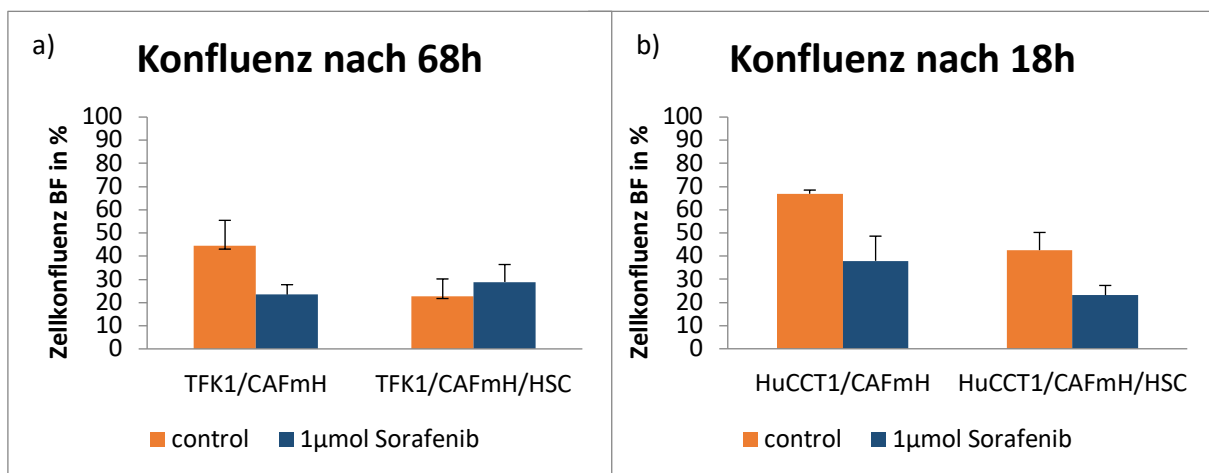


Abb. 4.21: Parakrines-Interaktions-Modell – Behandlung mit 1 μ M Sorafenib

a) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an konfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der unbehandelten oder mit 1 μ M Sorafenib behandelten Cokultur (TFK-1/CAFmH) und des Kompartiments aus TFK-1 und CAFmH der Cokultur TFK-1/CAFmH/HSC nach Applikation von 1 μ M Sorafenib. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen.

b) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an konfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der unbehandelten oder mit 1 μ M Sorafenib behandelten Cokultur (HuCCT-1/CAFmH) und des Kompartiments aus HuCCT-1 und CAFmH der Cokultur HuCCT-1/CAFmH/HSC nach Applikation von 1 μ M Sorafenib. Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen.

Hier schien die Applikation von Sorafenib tendenziell sogar zu einer Erhöhung der Konfluenz im Spalt beizutragen (s. Abb. 4.21 a). Bei den mit beiden Stromazelllinien kokultivierten HuCCT-1 hingegen entsprach der inhibierende Effekt durch 1 μ M Sorafenib im Kompartiment aus HuCCT-1 und CAFmH (Reduktion von 67% auf 38%) nahezu dem der Kokultur aus HuCCT-1/CAFmH (Reduktion von 43% auf 23%) (s. Abb. 4.21 b).

4.5.3 Kein synergistischer Effekt der mit beiden Stromazelllinien CAFmH und HSC kokultivierten intra- bzw. extrahepatischen CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 auf die Zytokinfreisetzung

Analog zu den vorherigen Kokultur-Experimenten sollte nun ebenfalls mithilfe des *Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit Panel A*-Zytokinkits von R&D-Systems der Einfluss der beiden Stromazelllinien in Kokultur mit den HuCCT-1 bzw. TFK-1 auf die Zytokinsekretion analysiert werden. Erneut wurden dafür die Überstände aus den Parakrinen-Interaktions-Modellen nach 72h verwendet. Es zeigte sich eine verstärkte Sekretion von Serpin E1, MCP-1 und IL-8 sowie eine leichte Freisetzung von CXCL-1 in Kokultur mit den HuCCT-1 und den beiden Stromazelllinien. Verglichen zur HuCCT-1-Kokultur mit den CAFmH bzw. HSC konnte kein ausgeprägter Unterschied in der Freisetzung dieser Zytokine festgestellt werden (s. Abb. 4.8 und 4.17). Jedoch wurde hier im Gegensatz zur Kokultur mit den CAFs keine IL-6-Sekretion detektiert. Nach Applikation von 1 μ M Sorafenib konnte wie in der HuCCT-1/CAF-Kokultur eine Reduktion der Sekretion von MCP-1, CXCL-1 sowie IL-8 beobachtet werden (s. Abb. 4.22 a).

In der TFK-1-Kokultur mit beiden Stromazelllinien konnten gegenüber den Kokulturen TFK-1/CAFmH und TFK-1/HSC erhöhte Mengen an Serpin E1 detektiert werden (s. Abb. 4.8 und 4.17). Zudem wurde eine leichte Sekretion von MCP-1, CXCL-1 sowie IL-8 detektiert, die sich im Vergleich zur Kokultur mit den CAFs als abgeschwächter herausstellte. Eine IL-6-Freisetzung konnte auch hier nicht beobachtet werden (s. Abb. 4.22 b). Die Behandlung mit 1 μ M Sorafenib resultierte ebenfalls in einer reduzierten Freisetzung von MCP-1, CXCL-1 und IL-8. Die Sekretion von Serpin E1 konnte durch Sorafenib nicht inhibiert werden.

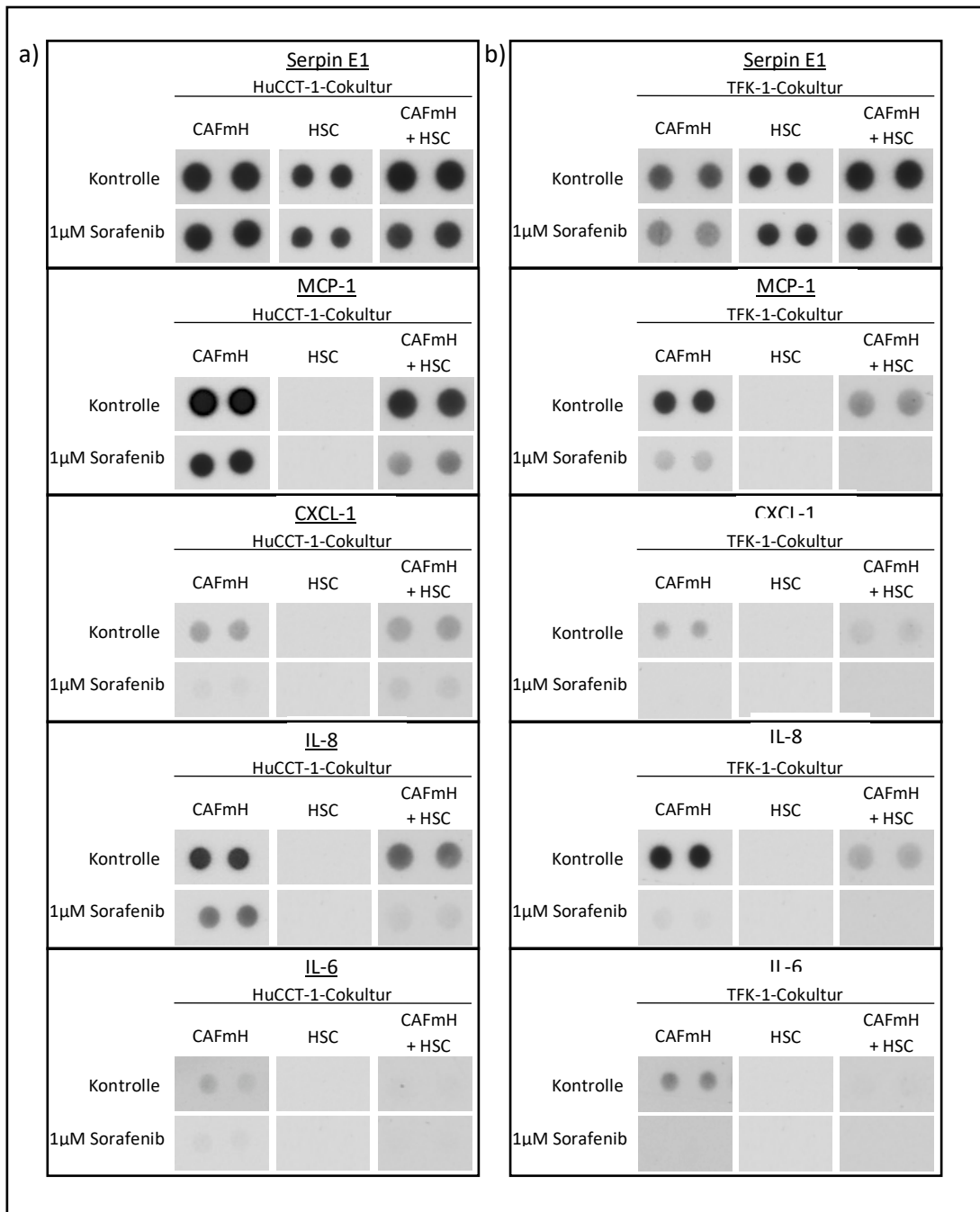


Abb. 4.22: Vergleich der Zytokinfreisetzung zwischen mit HuCCT-1 bzw. TFK-1 kokultivierten CAFmH, HSC und beiden Stromazelllinien sowie inhibierende Auswirkungen durch Applikation von 1 µM Sorafenib

a) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zytokinfreisetzung einerseits der HuCCT-1-Cokultur mit CAFmH, andererseits der HUCCT-1-Cokultur mit HSC, sowie der Cokultur mit beiden Stromazelllinien (CAFmH + HSC) inklusive und exklusive 1 µM Sorafenib. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

b) Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Zytokinfreisetzung einerseits der TFK-1-Cokultur mit CAFmH, andererseits der TFK-1-Cokultur mit HSC, sowie der Cokultur mit beiden Stromazelllinien (CAFmH + HSC) inklusive und exklusive 1 µM Sorafenib. Das Bildmaterial stammt aus einem von n=3 unabhängigen Versuchen.

4.5.4 Kein synergistischer Effekt auf die Signaltransduktion in der intra- bzw. extrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und TFK-1 nach Stimulation mit konditioniertem CAFmH- und HSC-Kulturmedium detektierbar

Zuletzt sollte der Einfluss der beiden Stromazelllinien auf mögliche Änderungen in der Signaltransduktion mittels Western Blot analysiert werden. Fokus lag hierbei erneut auf den JAK/Stat-, MAPK- sowie PI3K-Akt-Signalwegen. Nach Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Kulturmedium konnte sowohl die Aktivierung des JAK/Stat- sowie des MAPK- und PI3K-Akt-Signalweges detektiert werden, nahezu analog zu den Ergebnissen aus der Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Kulturmedium (s. Abschnitt 4.2.5).

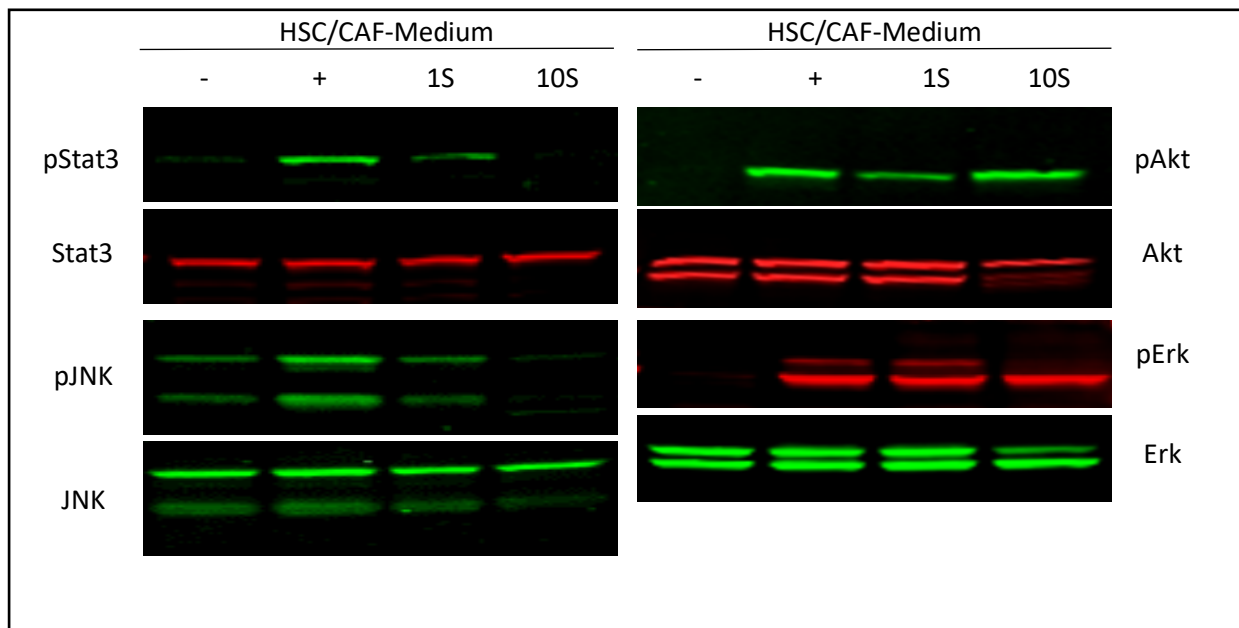


Abb. 4.23: Stimulation der TFK-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Medium führt zur verstärkten Aktivierung des JAK-STAT-, des MAPK- und des PI3K-Akt-Signalweges

Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus n=3 unabhängigen Versuchen, in denen die TFK-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Medium stimuliert wurden. Für die Behandlung wurde konditioniertes HSC/CAFmH-Medium inklusive 1 μ M Sorafenib (1S) bzw. 10 μ M Sorafenib (10S) verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus 0% FCS-haltigem Medium.

Die Applikation von 1 μ M Sorafenib führte ebenfalls zu einer reduzierten Stat3-Phosphorylierung. Jedoch konnte verglichen zur Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Kulturmedium unter Behandlung mit 1 bzw. 10 μ M Sorafenib keine Reduktion im ERK-Signaling beobachtet werden, ähnlich wie nach Stimulation mit konditioniertem HSC-Kulturmedium (s. Abschnitt 4.4.4). Zudem wurde wie in allen vorherigen Western Blots eine verstärkte Akt-Aktivierung nach Applikation von 10 μ M Sorafenib beobachtet.

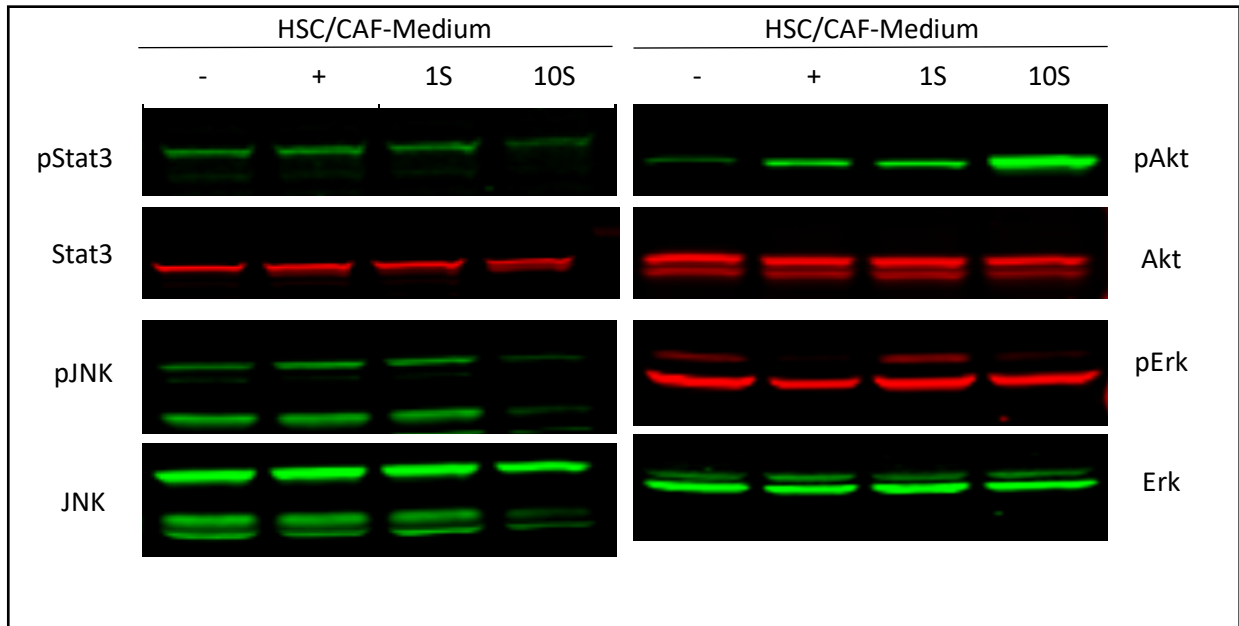


Abb. 4.24: Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Medium führt zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K-Akt-Signalweges

Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus n=3 unabhängigen Versuchen, in denen die HuCCT-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Medium stimuliert wurden. Für die Behandlung wurde konditioniertes HSC/CAFmH-Medium inklusive 1 μ M Sorafenib (1S) bzw. 10 μ M Sorafenib (10S) verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus 0% FCS-haltigem Medium.

Nach Stimulation der HuCCT-1 mit konditioniertem HSC/CAFmH-Kulturmedium konnte lediglich analog zur Stimulation mit konditioniertem CAFmH-Kulturmedium eine Aktivierung des Akt-Signalweges beobachtet werden (s. Abb 4.24). Auffallend war hier ebenfalls die Hyperphosphorylierung von Akt nach Behandlung mit 10 μ M Sorafenib, die ebenfalls bereits in den mit CAFmH bzw. HSC kokultivierten HuCCT-1 detektiert wurde (s. Abschnitte 4.2.5 und 4.4.4).

5 Diskussion

Aufgrund fehlender aussichtsreicher Therapieoptionen ist die Prognose beim CCC noch heute als überaus schlecht einzustufen. Die chirurgische Resektion des Tumors stellt bisher die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar, welche jedoch bei Diagnosestellung aufgrund des meist fortgeschrittenen Tumorstadiums nicht mehr möglich ist, sodass nur die Option einer palliativen systemischen Therapie mit schlechten Überlebensraten bleibt.

Auf der Suche nach neuen adäquaten Behandlungsansätzen wurde der Fokus in der letzten Zeit verstärkt auf die Tumorumgebung gelegt. Das sogenannte Tumorstroma hat sich als eine wesentliche Struktur für die Progression solider Tumoren herausgestellt und bietet einen vielversprechenden Angriffspunkt für den Einsatz zielgerichteter Therapien. Da insbesondere das CCC einen hohen Anteil an desmoplastischem Stroma und somit eine erhöhte Anzahl an Fibroblasten in der Umgebung aufweist, sollte im ersten Teil der Arbeit der Einfluss von tumorassoziierten Fibroblasten auf die Migration einer intra- sowie einer extrahepatischen CCC-Zelllinie näher untersucht werden (Kalluri & Zeisberg, 2006; Rizvi & Gores, 2013).

Die immunhistochemischen Analysen einer kleinen Kohorte an Patienten des UKSH lieferten ein Indiz, dass möglicherweise die Präsenz α SMA-positiver Fibroblasten mit einer verschlechterten Prognose beim CCC korreliert. Dieses Resultat stimmt mit mehreren publizierten Studien überein (Chuaysri et al., 2009; Sirica, 2011) (s. Abb. 4.1). In einer *in vitro*-Cokultur mit CAFs und CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 im Rahmen eines Parakrinen-Interaktions-Modells konnte zudem der bereits in der Literatur beschriebene durch die CAFs ausgelöste Effekt der verstärkten Migration beider CCC-Zelllinien bestätigt werden (Sha et al., 2018; Shiga et al., 2015) (s. Abb. 4.2-4.5). Insbesondere in der Cokultur aus der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 und CAFmH konnte eine verstärkte Migration nachgewiesen werden. Es scheinen parakrine Interaktionen zwischen Tumor und Stroma einen positiven Effekt auf die Tumormigration *in vitro* auszuüben. Mehrere Studien haben bereits zeigen können, dass CAFs in der Lage sind, über die Sekretion von Zytokinen sowie Remodeling der extrazellulären Matrix ein inflammatorisches Milieu zu kreieren, wodurch die Theorie vom Krebs als niemals heilende Wunde nach Dvorak et al. zusätzlich gestärkt wird (Dvorak, 1986). Auf diese Weise können CAFs Proliferation, Migration, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren beeinflussen (Alkasalias et al., 2018). Dieses Phänomen konnte bereits mithilfe von Tiermodellen beim Brustkrebs, Gebärmutterkrebs, Melanom und auch im Rahmen eines anderen Versuchssettings von unserer Arbeitsgruppe beim CCC beobachtet werden (Alkasalias et al., 2018; Heits et al., 2016).

Die detektierte, verstärkte Migration der CCC-Zelllinien in Cokultur mit den CAFs konnte wiederum durch Applikation von Sorafenib, einem Multityrosinkinaseinhibitor, in nicht wachstumsinhibierenden Konzentrationen (s. Abb. 4.6) reduziert werden (s. Abb. 4.7).

Auch in der CAF-Monokultur konnte nach Behandlung mit 1 μ M Sorafenib eine Reduktion der Migration erreicht werden (s. Abb. 4.7). Sorafenib wird bereits seit Jahren erfolgreich zur palliativen Therapie des hepatozellulären Karzinoms sowie des renalen Karzinoms eingesetzt und konnte ebenfalls sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Wachstum von CCC-Zelllinien signifikant inhibieren (Luo et al., 2017; Sugiyama et al., 2011). Das Medikament scheint einen inhibierenden Einfluss auf die parakrinen Interaktionen zwischen CAFs und CCC-Zelllinien auszuüben, was wiederum in einer verringerten Migration der Tumorzellen resultiert. Dennoch lieferten klinische Studien zur Behandlung des CCC mit Sorafenib bisher leider eher enttäuschende Resultate (Lee et al., 2013; Moehler et al., 2014). Eine wie in der Literatur häufig beschriebene durch CAFs erlangte Medikamentenresistenz – in diesem Fall gegenüber Sorafenib – konnte hier jedoch nicht festgestellt werden (Fabris et al., 2019).

Nähere Analysen ergaben zudem eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen mit protumorösen Eigenschaften in der Kokultur aus HuCCT-1 bzw. TFK-1 und CAFs sowie in der CAF-Monokultur gegenüber der jeweiligen CCC-Monokultur (s. Abb. 4.8). Insbesondere die Zytokine MCP-1, CXCL-1, IL-8 sowie IL-6, welche fördernde Eigenschaften auf die Tumorprogression besitzen sowie ein inflammatorisches Milieu kreieren können, waren signifikant erhöht nachweisbar. Durch Aufrechterhaltung dieser chronischen Entzündung kann eine Nische für den Tumor entstehen, was wiederum zu einer optimalen Entwicklung und beschleunigten Progression beiträgt (Gascard & Tlsty, 2016). Zudem konnten mehrere Studien bereits zeigen, dass die genannten Zytokine einen entscheidenden Einfluss auf Migration sowie Angiogenese auf unterschiedliche solide Tumoren ausüben (Haga et al., 2015; Lim, Yuzhalin, Gordon-Weeks, & Muschel, 2016; Qian Liu, Anping Li, Yijun Tian, Jennifer D. Wu, Yu Liu, Tengfei Li, Yuan Chen, Xinwei Han, 2016; Shiga et al., 2015). Es wäre möglich, dass die in Abb. 4.2. - 4.5. beobachtete, verstärkte Tumormigration zum Großteil auf parakrine Interaktionen zwischen CCC-Zelllinien und CAFs mittels dieser Zytokine zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu verifizieren, sind jedoch weiterführende Experimente notwendig.

Speziell die Überexpression von MCP-1, auch als CCL-2 bekannt, könnte auch beim CCC eine wichtige Funktion in der Invasion von Tumorzellen übernehmen und somit eine daraus resultierende Fernmetastasierung erleichtern. Dieses Phänomen konnte bereits unter anderem beim Brustkrebs beobachtet werden. Für das Magenkarzinom wurde überdies eine Korrelation zwischen hoher MCP-1-Sekretion und einer geringeren Gesamtüberlebensrate beschrieben (Lim et al., 2016). *In vitro*-Untersuchungen zum hepatozellulären Karzinom konnten zudem bereits zeigen, dass CAFs durch eine vermehrte Sekretion von MCP-1 maßgeblich zur Progression sowie Migration des Tumors beitragen (Z.-Y. Lin, Chuang, & Chuang, 2012; Liu et al., 2016).

Auch in dieser Arbeit konnte eine erhöhte Freisetzung an MCP-1 in der CAF-Monokultur sowie in der Cokultur aus CAFs und CCC-Zelllinie nachgewiesen werden, was einen ähnlichen Mechanismus vermuten lässt.

Auch CXCL-1 scheint für die Invasivität von Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte unter anderem anhand einer Studie zum Urothelkarzinom *in vitro* gezeigt werden, dass CXCL-1 einerseits die Ausbildung von Metastasen begünstigen kann, andererseits mit höheren Tumorstadien assoziiert ist. Interessanterweise erfolgte die Sekretion dieses Zytokins von tumorassoziierten Fibroblasten (Miyake et al., 2016). Auch in dieser Arbeit konnten in der CAF-Monokultur unter anderem erhöhte Mengen an CXCL-1 nachgewiesen werden (s. Abb. 4.8), was möglicherweise ein Indiz für einen ähnlichen Prozess darstellen könnte. Eine Überexpression von CXCL-1 konnte weiterhin beim Brust-, Haut-, Nieren-, Magen- und Dickdarmkrebs detektiert werden (Han et al., 2016).

Einige Arbeitsgruppen konnten ebenfalls bereits eine erhöhte Sekretion von IL-8, auch als CXCL-8 bekannt, beim CCC nachweisen, welche mit schlechteren Überlebensraten korreliert. IL-8 ist zudem in der Lage, die Immunantwort gegen Tumoren zu vermindern, wodurch die Entwicklung und Progression des CCC zusätzlich gefördert werden könnte (David, Dominguez, Hamilton, & Palena, 2016; Sun, Li, Sun, & Niu, 2015).

Als eines der bedeutsamsten proinflammatorischen Zytokine ist IL-6 sogar in der Lage, die Synthese von eben erwähnten MCP-1 sowie IL-8 zu induzieren (Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, 2018). In der Literatur konnten mehrere Arbeitsgruppen eine Überexpression von IL-6 in verschiedenen soliden Tumoren, unter anderem auch im CCC, nachweisen, deren immenser Einfluss für den Erhalt des chronisch inflammatorischen Milieus, die Tumorprogression sowie die Hemmung von Apoptose ausschlaggebend mitverantwortlich ist. Im Rahmen einer Dickdarmkrebsstudie konnte gezeigt werden, dass tumorassoziierte Fibroblasten die Hauptquelle für die vermehrte IL-6-Produktion darstellen (Braconi, Swenson, Kogure, Huang, & Patel, 2010; Nagasaki et al., 2014). Aufgrund der in der CAF-Monokultur detektierten, erhöhten IL-6-Konzentration (s. Abb. 4.8) wäre es denkbar, dass die CAFs beim CCC ebenfalls einer der Hauptproduzenten für dieses Zytokin sein könnten. Um diese Hypothese zu bekräftigen, sind auch hier weiterführende Experimente, wie beispielsweise Blockierungsversuche von IL-6, essenziell.

Die mit Sorafenib behandelte Cokultur aus CAFs und der jeweiligen CCC-Zelllinie zeigte jedoch neben der bereits erwähnten verringerten Tumorzellmigration ebenfalls eine Reduktion in der Freisetzung von MCP-1, CXCL-1, IL-8 sowie IL-6 auf. Auch in der mit Sorafenib behandelten CAF-Monokultur konnte eine deutliche Inhibierung der Sekretion dieser Zytokine verzeichnet werden (s. Abb. 4.8). Somit scheint Sorafenib in nicht wachstumshemmender Konzentration in der Lage zu sein, *in vitro* parakrine Interaktionen zwischen tumorassoziierten Fibroblasten und CCC-Zelllinien zu unterbinden.

Die Hemmung der Sekretion von protumörösen Zytokinen, welche insbesondere migrations- und invasionsfördernde Eigenschaften besitzen, könnte hierbei eine Schlüsselfunktion übernehmen.

Um den durch die CAFs ausgelösten Effekt der verstärkten Migration auf die CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 sowie deren Inhibierung durch Sorafenib noch näher zu ergründen, sollten mittels Western Blot Veränderungen in der Signaltransduktion - primär bei den Signalproteinen Stat3, JNK, Akt und Erk - der Tumorzellen analysiert werden. Insbesondere in der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 war nach Stimulation mit konditioniertem CAF-Medium in allen aufgeführten Signalproteinen eine signifikant erhöhte Aktivierung zu verzeichnen (s. Abb. 4.9). In der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 war nach Stimulation hingegen lediglich eine erhöhte Akt-Aktivierung nachweisbar (s. Abb. 4.10). Der gravierende Unterschied zwischen beiden Tumorzelllinien könnte möglicherweise auf die erhöhte Stoffwechselaktivität der HuCCT-1 zurückzuführen sein. Eine verkürzte Stimulationsdauer hätte hier eventuell potentiell vorhandene Effekte visualisieren können.

Eine verstärkte Aktivierung von Erk, Akt sowie Stat3 konnte ebenfalls bereits in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Heits et al., 2016). Insbesondere die Überexpression von aktiviertem Erk als Teil des mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges beim CCC wurde von mehreren Forschungsgruppen beobachtet, was wiederum mit einer erhöhten Tumorprogression sowie verlängertem Tumorzellüberleben assoziiert war (Chen et al., 2019). Überdies kann eine verstärkte Aktivierung von Erk bzw. des MAPK-Signalweges die Invasion eines CCC begünstigen (Fabris et al., 2019). Interessanterweise erfolgt in mehreren soliden Tumoren die Überaktivierung von Erk unter anderem auch durch IL-6 und IL-8/CXCL-8 (Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, 2018; Qian Liu, 2016). Somit könnte sich die detektierte erhöhte Sekretion von IL-6 und IL-8 durch die CAFs als ein wichtiger Faktor für die Aktivierung des MAPK-Signalweges insbesondere beim CCC ohne raf/ras-Mutation herausstellen, wodurch wiederum die für das CCC klassische gravierende Invasion begünstigt wird.

Eine Überaktivität des PI3K-Akt-Signalweges konnte ebenfalls von mehreren Arbeitsgruppen beim CCC gezeigt werden, die vor allem mit verstärkter Migration und Invasivität des Tumors sowie einer Apoptoseresistenz assoziiert ist (Chen et al., 2019). Hierbei scheinen die CAFs durch Sekretion von Botenstoffen eine Schlüsselfunktion in der Akt-Aktivierung zu übernehmen. In verschiedenen Tumorentitäten waren erneut IL-6 sowie IL-8 maßgeblich für die Überexpression des PI3K-Akt-Signalweges mitverantwortlich (Qian Liu, 2016; Rizvi & Gores, 2014). Ferner konnte zudem beim Prostatakarzinom eine Korrelation von MCP-1/CCL-2 und erhöhter Akt-Aktivierung nachgewiesen werden (Son et al., 2015). Vor diesem Hintergrund könnte die vermehrte Sekretion dieser Zytokine durch die CAFs, wie sie in unseren Experimenten detektiert wurde (s. Abb. 4.8), einen ausschlaggebenden Faktor für die verstärkte Akt-Aktivierung darstellen. Diese könnte wiederum einen immensen Beitrag zur beobachteten verstärkten Tumormigration (s. Abb. 4.2 - 4.5) sowie generell zur Aggressivität des CCC leisten.

Auch in der Aktivierung des JAK-Stat3-Signalweges übernimmt IL-6 eine wesentliche Funktion. So führt eine erhöhte Konzentration an IL-6 zu einer Hyperaktivierung dieses Signalweges, wodurch eine gesteigerte Progression und Invasion des Tumors sowie eine Apotoseresistenz resultieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass viele solide Tumoren inklusive des CCC eine Überaktivierung des JAK-Stat3-Signalweges aufweisen, welche zudem oftmals mit schlechteren Überlebensraten korreliert (Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, 2018). Neben IL-6 ist MCP-1 ebenfalls unter bestimmten Voraussetzungen in der Lage, den JAK-Stat3-Signalweg zu aktivieren und folglich immunsuppressiv auf das Tumormilieu einzuwirken (Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, 2018; Fabris et al., 2019; Labib, Goodchild, & Pereira, 2019).

Relativ wenig ist bisher zur Funktion von JNK beim CCC bekannt. Eine Hyperaktivierung von JNK, das ein Mitglied einer Subgruppe des MAPK-Signalweges darstellt, ist beim hepatozellulären Karzinom mit verschlechterter Prognose assoziiert (Bubici & Papa, 2014). Auch beim CCC scheint eine Überaktivierung von JNK protumoröse Eigenschaften zu besitzen. So konnte von einer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass mithilfe eines Antikörpers gegen JNK Proliferation und Invasion von CCC-Zelllinien gehemmt werden konnten (Chen et al., 2019; C. Feng et al., 2014; Y. Lin et al., 2013). Demzufolge könnte die Überaktivierung von JNK ebenfalls zur Migration der Tumorzellen in Cokultur mit den CAFs beigetragen haben.

Interessanterweise konnte auch auf Signaltransduktionsebene mithilfe von 1 μ M Sorafenib eine Inhibierung der durch die CAFs bedingten stimulierenden Effekte, insbesondere in der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1, nachgewiesen werden. Hierbei konnte Sorafenib, das unter anderem durch Hemmung von raf-Kinasen gezielt inhibierend auf den MAPK-Signalweg einwirken kann, nicht nur die Überaktivierung von Erk, sondern zusätzlich die Hyperaktivierung von Akt, Stat3 und JNK deutlich reduzieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Hemmung von Erk und Stat3 durch Sorafenib beim CCC mit verminderter Proliferation sowie erhöhter Apoptoserate assoziiert ist (Yokoi et al., 2018). Somit scheint Sorafenib in der Lage zu sein, durch Hemmung der parakrinen Interaktionen zwischen Tumorzellen und CAFs die protumorösen Effekte beim CCC *in vitro* zu reduzieren. Jedoch lieferten klinischen Studien mit Sorafenib bisher eher enttäuschende Resultate. Dies könnte möglicherweise bis zu einem gewissen Grad mit der detektierten Hyperaktivierung von Akt in beiden CCC-Zelllinien unter 10 μ M Sorafenib-Therapie zusammenhängen (s. Abb. 4.9 + 4.10). Der PI3K/Akt-Signalweg könnte dabei einen Escape-Mechanismus für den durch Sorafenib inhibierten MAPK-Signalweg darstellen (Yokoi et al., 2018).

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf einer bisher noch kaum untersuchten Komponente des Tumorstromas, den sogenannten Schwann’schen Zellen. Schwann-Zellen stellen als Neuroglia den Hauptbestandteil der peripheren Nerven dar und sind in der letzten Zeit aufgrund ihres protumorösen Potentials immer stärker in den Fokus der Forschung gerückt.

So konnte bereits gezeigt werden, dass Schwann'sche Zellen in der Lage sind, die Migration, Invasion sowie Metastasierung von Tumoren - insbesondere des Pankreasadenokarzinoms - maßgeblich zu fördern (Su et al., 2020). Eine immunhistochemische Untersuchung von 14 Gewebeschnitten von Patienten mit CCC des UKSH Campus Kiel lieferte einen ersten Hinweis, dass die Anwesenheit von S100-positiven Schwann-Zellen im Tumorstroma beim CCC mit einer verschlechterten Prognose einhergehen könnte (s. Abschnitt 4.3). Um diese Hypothese zu bekräftigen, muss die Stichprobe jedoch vergrößert werden.

Vor diesem Hintergrund sollte der Einfluss auf die Migration bei den HuCCT-1 und TFK-1 näher untersucht werden. Interessanterweise konnte in der Cokultivierung der Schwann'schen Zelllinie HSC mit den beiden CCC-Zelllinien keine verstärkte Migration der Tumorzellen, jedoch aber der HSC detektiert werden (s. Abb. 4.12 - 4.15). Insbesondere in Cokultur mit der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 war die Migration der HSC in Richtung Tumorzellen überaus eindrucksvoll. Diese verstärkte Migration der HSC in Richtung TFK-1 könnte dadurch erklärt werden, dass sich insbesondere das extrahepatische CCC klassischerweise mittels perineuraler Invasion in die Leber ausbreitet (Deborde et al., 2016), während das intrahepatische CCC - wie die HuCCT-1 - hauptsächlich von CAFs und hepatischen Sternzellen umgeben ist (Vaquero, Aoudjehane, & Fouassier, 2020). Ein ähnliches Phänomen konnte bereits beim duktalem Pankreasadenokarzinom sowie beim Dickdarmkrebs *in vivo* und *in vitro* beobachtet werden. Hier migrierten die Schwann'schen Zellen ebenfalls zuerst auf die Tumorzellen zu und lösten bei direktem Zell-Zell-Kontakt eine gesteigerte Motilität der Tumorzellen in Richtung Schwann-Zellen aus. Überdies waren die Schwann'schen Zellen in der Lage, einzelne Tumorzellen zu separieren und die umliegende Matrix so abzubauen, dass regelrechte Tunnel entstanden sind. Interessanterweise konnten vergleichbare Effekte in analogen Versuchen mit benignen Zellen nicht nachgewiesen werden (Deborde & Wong, 2017; Demir et al., 2014). Eine erhöhte Motilität der CCC-Zelllinien sowie eine Separierung dieser lässt sich in dieser Arbeit nur erahnen, weitere Experimente sind hierfür nötig.

Schwann'sche Zellen scheinen somit eine gewisse Affinität zu Tumorzellen aufzuweisen. Es wird vermutet, dass durch die derartige Interaktion ein invasiver Charakter begünstigt wird und darüber hinaus die Schwann'schen Zellen als Leitlinien für die Tumorzellen in Richtung der Nerven dienen, wodurch eine Invasion in die peripheren Nerven – die sogenannte perineurale Invasion – erleichtert werden könnte (Azam, Pecot, Azam, & Pecot, 2016; Demir et al., 2014; Sylvie Deborde et al., 2016). Dabei weist dieses Verhaltensmuster eine gewisse Ähnlichkeit zur physiologischen Nervenregeneration auf, in der eine Nervenschädigung in einer Dedifferenzierung der Schwann'schen Zellen resultiert.

Daraufhin verlieren die Schwann-Zellen ihre Fähigkeit zur Myelinisierung, beginnen zu proliferieren, werden beweglicher und bilden die sogenannten Büngner-Bänder, die für die Axone als Leitschienen von einem Ende des verletzten Axons zum anderen dienen. Die Tumorzellen scheinen diesen Mechanismus auszunutzen, wodurch eine perineurale Invasion begünstigt werden könnte (Sylvie Deborde et al., 2016). Dieser protumoröse Einfluss der Schwann-Zellen konnte zusätzlich zu den erwähnten Tumoren des Pankreas und des Dickdarms auch bei Tumoren der Haut, der Lunge, der Prostata und der Schilddrüse nachgewiesen werden (Deborde & Wong, 2017; S. H. Zhang et al., 2019; Yan Zhou et al., 2018).

Wie auch schon beim duktalem Pankreasadenokarzinom wird beim CCC eine Invasion von Nerven ebenfalls bereits im frühen Tumorstadium sehr häufig beobachtet, die auch hier mit einer erhöhten Rezidivrate sowie verschlechterter Prognose korreliert (Murakami et al., 2013; Shirai et al., 2008). Dabei ist das vermehrte Vorkommen von perineuraler Invasion beim CCC zudem womöglich auf die anatomische Lage zurückzuführen. Das Gallengangssystem ist reich an autonomen Nervenfasern und befindet sich in unmittelbarer Nähe von Nervenplexus, wodurch die Wahrscheinlichkeit für eine Invasion der Nerven deutlich erhöht wird (Corti et al., 2019; Murakami et al., 2013; Shen et al., 2010; Shirai et al., 2008; Yanming Zhou, Liu, Wu, & Wan, 2017). Es wäre denkbar, dass die Schwann'schen Zellen auch hier eine Schlüsselfunktion in der perineuralen Invasion übernehmen. So könnte die Anwesenheit von Schwann-Zellen - wie bereits für mehrere solide Tumoren gezeigt - einerseits die Invasionsrate des CCC erhöhen. Andererseits könnte sie durch Linderung von tumorbedingten Schmerzen sowie Kreierung eines immunsuppressiven Milieus entscheidend dazu beitragen, dass das CCC bei Patienten oftmals lange Zeit asymptomatisch verläuft und somit erst im fortgeschrittenem Tumorstadium diagnostiziert wird (Bunimovich et al., 2017; Martyn, Shurin, Keskinov, Bunimovich, & Shurin, 2019; S. H. Zhang et al., 2019). Folglich könnten die Schwann'schen Zellen möglicherweise einen guten Angriffspunkt für den Einsatz zielgerichteter Therapien darstellen. So konnte unter experimentellen Versuchsbedingungen bereits gezeigt werden, dass die Eliminierung von Schwann'schen Zellen beim duktalem Pankreasadenokarzinom mit einer reduzierten perineuralen Invasion assoziiert ist (Martyn et al., 2019). Zur Bekräftigung dieser Hypothese sind jedoch weitere Versuche notwendig.

Interessanterweise war die wachstumshemmende Wirkung von Sorafenib bei den HSC ähnlich stark ausgeprägt wie bei den CCC-Zelllinien HuCCT-1 und TFK-1 (s. Abb. 4.16). Im Parakrinen-Interaktions-Modell hingegen zeigte die Applikation von 1 μ M Sorafenib nur einen marginal inhibierenden Effekt auf die verstärkte Migration der HSC in Kokultur mit der jeweiligen CCC-Zelllinie (Abb s. Anhang).

Somit scheint Sorafenib in nicht wachstumshemmender Konzentration zwar fähig zu sein, *in vitro* die parakrinen Interaktionen zwischen CAFs und CCC-Zelllinien zu inhibieren, nicht aber die Interaktionen zwischen HSC und den Tumorzellen. Dies könnte ein weiteres Indiz für die bisher eher enttäuschenden Resultate der klinischen Studien mit Sorafenib darstellen.

Um die verstärkte Migration der HSC in Cokultur mit den beiden CCC-Zelllinien sowie die geringere Sorafenibempfindlichkeit näher zu ergründen, wurde auch hier analog zum ersten Teil dieser Arbeit die Zytokinfreisetzung näher untersucht. Es zeigte sich insbesondere in der Cokultur sowie in der HSC-Monokultur eine verstärkt ausgeprägte Sekretion von MIF (Makrophagen-Migration-inhibierender Faktor) sowie von Serpin-E1, auch als PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1) bekannt. MIF war zudem sowohl in der HuCCT-1- als auch in der TFK-1-Monokultur leicht erhöht nachweisbar, Serpin-E1 hingegen lediglich in der HuCCT-1-Monokultur (s. Abb. 4.17). Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits die protumorösen Eigenschaften dieser beiden Zytokine nachweisen. So konnte eine erhöhte Konzentration von MIF bereits in verschiedenen soliden Tumoren detektiert werden. Die Überexpression dieses Zytokins stellt einen Indikator für die Aggressivität eines Tumors dar und ist mit erhöhtem Metastasierungspotential assoziiert. Dabei scheint MIF in der Lage zu sein, Migration und Invasion – insbesondere perineurale Invasion – von Tumoren zu stimulieren, indem es fördernd auf die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) einwirkt. Die EMT führt zum Verlust des epithelialen Charakters der Tumorzellen, sie können sich nun aus dem Zellverband lösen und erwerben die Fähigkeit zu migrieren, wodurch Invasion und Metastasierung entscheidend erleichtert werden (Morris, Nofchissey, Pinchuk, & Beswick, 2014). Eine Hemmung von MIF konnte *in vitro* bereits Migration, Invasion sowie perineurale Invasion von Speicheldrüsenkrebs signifikant reduzieren (M. Zhang et al., 2019). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MIF ebenfalls Angiogenese, Apoptoseresistenz und Immunsuppression in Tumoren stimulierend beeinflusst, wodurch eine Progression zusätzlich unterstützt wird (Morris et al., 2014; Nobre et al., 2017; M. Zhang et al., 2019). Auch beim CCC könnte die beobachtete Überexpression von MIF einen Einfluss auf die Migration sowie speziell auf die frühe perineurale Invasion nehmen und somit zur Aggressivität des Tumors beitragen. Serpin-E1 ist ebenfalls in den meisten Tumoren überexprimiert und wird mit einer antiapoptotischen sowie wachstumsfördernden Wirkung in Verbindung gebracht. Zudem hat es einen Einfluss auf die Angiogenese der Tumoren, indem es Endothelzellen zur Proliferation und Migration stimuliert. Aufgrund der Fähigkeit von Serpin-E1, das Loslösen von Tumorzellen aus der extrazellulären Matrix zu unterstützen, kann es die Migration von Tumoren begünstigen und ferner eine Metastasierung erleichtern (Kubala & DeClerck, 2019). Dies lässt vermuten, dass Serpin-E1, ebenso wie MIF, einen wichtigen Beitrag zur beobachteten verstärkten Migration der HSC in Cokultur mit den CCC-Zelllinien leisten könnte (s. Abb. 4.12 - 4.15).

Die Annahme wird zusätzlich dadurch bekräftigt, dass hier die Behandlung mit 1 μ M Sorafenib keinen Einfluss auf die vermehrte Zytokinfreisetzung ausüben konnte (s. Abb. 4.17).

Analog zum ersten Teil dieser Arbeit sollten ebenfalls die Auswirkungen der parakrinen Interaktionen zwischen HSC und CCC-Zelllinien auf Signaltransduktionsebene näher analysiert werden. Insbesondere in der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 konnte nach Stimulation mit konditioniertem HSC-Medium eine verstärkte Aktivierung von JNK, Akt und Erk beobachtet werden (s. Abb. 4.18). Stimulierende Effekte auf den JAK/STAT-Signalweg konnten jedoch nicht detektiert werden. In der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 war nach Stimulation hingegen lediglich eine erhöhte Akt-Aktivierung nachweisbar (s. Abb. 4.19). Auch hier könnte der gravierende Unterschied zwischen beiden Tumorzelllinien möglicherweise auf die erhöhte Stoffwechselaktivität der HuCCT-1 zurückzuführen sein, sodass eine veränderte Stimulationsdauer eventuell vorhandene Effekte eher darstellen könnte. Mehrere Forschungsgruppen konnten bereits zeigen, dass eine erhöhte Aktivierung von Akt, JNK und Erk beim CCC mit einer erhöhten Invasionsrate assoziiert ist (Chen et al., 2019; C. Feng et al., 2014). So konnte eine Inhibierung von JNK *in vitro* die Invasion von CCC-Zellen signifikant reduzieren (C. Feng et al., 2014). Auch die Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges konnte das Auftreten von Migration, Invasion und sogar von perineuraler Invasion deutlich vermindern, was eine entscheidende Funktion von Akt in der perineuralen Invasion beim CCC vermuten lässt (Y. Feng et al., 2018). Interessanterweise kann MIF, das auch in der Kokultur mit HSC und Tumorzellen vermehrt nachgewiesen wurde (s. Abb. 4.17), ebenfalls zu einer Akt-Aktivierung in Tumoren beitragen, wodurch zusätzlich Zellüberleben und Migration gefördert werden (Chen et al., 2019; Y. Feng et al., 2018; Lue et al., 2007). Auch die Aktivierung von Erk kann in Tumoren durch MIF ausgelöst werden. Eine Überaktivierung von Erk steht zudem im Zusammenhang Epithelial-mesenchymale Transition in Tumoren zu begünstigen und somit eine Invasion zu erleichtern (Chen et al., 2019; Nobre et al., 2017). Diese Erkenntnisse bekräftigen die Hypothese, dass Schwann'sche Zellen auch beim CCC eine maßgebliche Funktion in der Invasion und speziell in der perineuralen Invasion übernehmen könnten.

Mithilfe von 1 μ M Sorafenib konnte die verstärkte Aktivierung von JNK und Akt insbesondere in den TFK-1 marginal inhibiert werden. Erstaunlicherweise führte die Behandlung mit Sorafenib jedoch zu einer erhöhten Erk-Aktivierung, obwohl Sorafenib durch Hemmung intrazellulärer raf-Kinasen des MAPK-Signalweges die Aktivierung von Erk reduzieren sollte. Die Applikation von 10 μ M Sorafenib führte – wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit beobachtet – paradoxerweise erneut zu einer Hyperaktivierung von Akt, darüber hinaus aber ebenfalls wiederum zu einer verstärkten Erk-Aktivierung (s. Abb. 4.18). Diese fehlende Hemmung von Erk durch Sorafenib könnte eine Teilerklärung für die eher enttäuschenden Ergebnisse in den klinischen Studien mit Sorafenib liefern.

So könnte die Wirksamkeit von Sorafenib maßgeblich von der Zusammensetzung der Tumorumgebung beeinflusst werden. Möglicherweise wäre somit eine Therapie mit Sorafenib eher bei Patienten mit CCC ohne perineuraler Invasion effektiver.

Wie bereits im ersten Teil dieser Arbeit erwähnt, kann die paradoxe Hyperaktivierung von Akt zusätzlich zur reduzierten Sorafenibempfindlichkeit beigetragen haben. Vor diesem Hintergrund könnten die ineffektive Hemmung auf Signaltransduktions- und Zytokinebene wichtige Faktoren für die fehlende Wirksamkeit von Sorafenib in den mit HSC kokultivierten CCC-Zelllinien darstellen.

Demzufolge könnten die Schwann'schen Zellen als Bestandteil des Tumorstromas möglicherweise eine wichtigere Funktion in Tumorprogression und -invasion beim CCC übernehmen als bisher angenommen.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, inwiefern das Migrationsverhalten der CCC-Zelllinien HuCCT-1 bzw. TFK-1 durch eine simultane Kokultivierung mit CAFs und HSC beeinflusst wird. Auch in diesem Experiment konnte eine erhöhte Migration der HSC in Richtung Tumorzellen sowie eine verstärkte Migration der CCC-Zelllinien in Richtung der CAFs beobachtet werden (s. Abb. 4.20), was einen additiven Effekt vermuten lässt. Verglichen zum jeweiligen Migrationsverhalten des ersten bzw. zweiten Teils dieser Arbeit war die Migration jedoch weniger stark ausgeprägt. Dies könnte möglicherweise auf die reduzierte Anzahl an CAFs und HSC im Parakrinen-Interaktions-Modell zurückzuführen sein. Denn während in den Kokultivierungsversuchen der ersten beiden Teile dieser Arbeit die ibidi Platten jeweils mit zwei Wells Tumorzellen und zwei Wells CAFs bzw. HSC konfiguriert wurden, bestanden die Platten dieses Experiments lediglich aus einem Well HSC, einem Well CAFs und zwei Wells Tumorzellen (s. Abb. 3.1).

Durch Applikation von 1 μ M Sorafenib konnte jedoch insbesondere die Migration der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 im Bereich des Kompartiments aus HuCCT-1 und CAFs (s. Abb. 4.20b) von 42% auf 23% reduziert werden. Interessanterweise konnte für die extrahepatische CCC-Zelllinie TFK-1 im Bereich des Kompartiments aus TFK-1 und CAFs (s. Abb. 4.20c) kein inhibierender Einfluss durch Sorafenib nachgewiesen werden, während in Kokultivierung mit den CAFs allein noch eine signifikante Hemmung verzeichnet werden konnte (s. Abb. 4.21). Somit scheinen die Schwann'schen Zellen auch hier in der Lage zu sein, die Wirksamkeit von Sorafenib zu reduzieren. Dies bekräftigt zusätzlich die im zweiten Teil dieser Arbeit postulierte Hypothese, dass die Sorafenibwirkung stark von der Zusammensetzung des Tumorstromas abhängig sein könnte.

Um die Mechanismen der abgeschwächten Sorafenibsensitivität näher zu ergründen, wurde ebenfalls die Zytokinfreisetzung untersucht. Dabei glich das Zytokinsekretionsmuster nahezu dem der jeweiligen CAF-Kokultur aus dem ersten Teil dieser Arbeit, wobei die Zytokine CXCL-1, MCP-1 sowie IL-8 abgeschwächt exprimiert wurden. Eine Sekretion von IL-6 konnte nicht detektiert werden (s. Abb. 4.22).

Diese verringerte Zytokinfreisetzung könnte ebenfalls auf das oben beschriebene Problem zurückzuführen sein. Da auch die hemmende Wirkung von Sorafenib hier weitestgehend derer in der CAF-Cokultur entsprach, konnte diese Analyse leider keinen Hinweis auf eine mögliche Erklärung der bei den TFK-1 beobachteten, reduzierten Sorafenibempfindlichkeit liefern.

Zuletzt sollten analog zu den ersten beiden Teilen dieser Arbeit die Auswirkungen der parakrinen Interaktionen zwischen beiden Stromazelllinien und Tumorzellen auf Signaltransduktionsebene näher untersucht werden. Hier konnte in der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 nach Stimulation mit konditioniertem CAF/HSC-Medium eine verstärkte Aktivierung von JNK, Akt, Erk und Stat3 beobachtet werden (s. Abb. 4.23). In der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 konnte hingegen - wie bereits auch schon in den ersten beiden Teilen dieser Arbeit - lediglich eine erhöhte Akt-Aktivierung nachgewiesen werden (s. Abb. 4.24). Die Behandlung mit 1 μ M Sorafenib resultierte in einer Hemmung der Hyperaktivierung von Stat3, JNK und Akt in den TFK-1. Analog zum zweiten Teil dieser Arbeit zeigte sich auch hier paradoxerweise eine fehlende Inhibierung der Erk-Aktivierung unter Sorafenib. Nach Applikation von 10 μ M Sorafenib konnte – neben der bereits bekannten Akt-Hyperaktivierung – ebenfalls keine Hemmung von Erk beobachtet werden. Es scheint, als sei es zu einer Addition der beobachteten Effekte in der CAF-Cokultur - primär die verstärkte Aktivierung des JAK/Stat-Signalweges – mit denen in der HSC-Cokultur, insbesondere die fehlende Erk-Inhibierung, gekommen. Dies könnte womöglich einen bedeutsamen Faktor für die detektierte, ineffektive Hemmung der TFK-1-Migration im Parakrinen-Interaktions-Modell darstellen und ferner in einer gesteigerten Aggressivität des Tumors resultieren.

Zusammenfassend unterstreicht diese Arbeit die Bedeutsamkeit der Tumor-Stroma-Interaktionen beim CCC. Sie trägt einerseits zu einem besseren Verständnis der Mechanismen der parakrinen Interaktionen zwischen tumorassoziierten Fibroblasten und CCC sowie deren Auswirkungen auf den Progress des Tumors bei. Andererseits liefern diese Resultate einen Hinweis darauf, dass Schwann'sche Zellen – eine noch wenig untersuchte Komponente des Tumorstromas – möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Aggressivität des CCC haben könnten als bisher angenommen. Auch zu der in klinischen Studien beobachteten verringerten Sorafenibsensitivität könnten die Schwann-Zellen einen wesentlichen Beitrag geleistet haben. So konnte Sorafenib zwar die verstärkte Migration der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 in der CAF-Cokultur signifikant inhibieren, nicht jedoch in der Cokultur mit CAFs und Schwann'schen Zellen. Die Konfiguration des Tumorstromas könnte somit einen bedeutenden Einfluss auf die Sorafenibsensitivität ausüben. In Zukunft müssen durch weitere Studien die genaue Funktion der Schwann-Zellen beim CCC sowie die komplexen Wechselwirkungen und Wirkmechanismen zwischen den Komponenten des Tumorstromas und des Tumors noch näher ergründet werden, um folglich zielgerichtete Therapieoptionen entwickeln zu können.

6 Zusammenfassung

Beim cholangiozellulären Karzinom (CCC) handelt es sich um einen seltenen, malignen Tumor der Gallenwege mit steigender Inzidenz. Die chirurgische Resektion des Tumors stellt bisher die einzige kurative Therapieoption dar, die jedoch aufgrund des meist hohen Tumorstadiums bei Diagnosestellung nicht mehr möglich ist, weshalb oftmals lediglich eine palliative Systemtherapie mit schlechten Überlebensraten indiziert ist.

Auf der Suche nach neuen zielgerichteten Therapieansätzen ist das Tumorstroma aufgrund der protumorösen Eigenschaften in der letzten Zeit immer stärker in den Fokus der Forschung gerückt.

Da auch das CCC einen hohen Anteil an desmoplastischen Stroma aufweist, war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss parakriner Interaktionen durch tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs) und einer noch kaum analysierten Komponente des Tumorstromas, den Schwann'schen Zellen, auf die Progression beim CCC näher zu ergründen. Dazu wurde das Wachstumsverhalten der intrahepatischen CCC-Zelllinie HuCCT-1 sowie der extrahepatischen TFK-1 mithilfe eines fluoreszenzbasierten Parakrinen-Interaktions-Modells in Cokultur mit CAFs, Schwann-Zellen (HSC) sowie beiden Stromazellen untersucht. Mittels Zytokinscreening sowie Analyse der Signaltransduktion durch Western Blot sollten die Effekte näher qualifiziert werden. Eine mögliche Hemmung des Wachstums sollte durch Behandlung mit dem Multityrosinkinaseinhibitor Sorafenib getestet werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Cokultivierung mit CAFs in einer erhöhten Migration beider CCC-Zelllinien resultiert, welche jedoch durch 1 μ M Sorafenib wieder reduziert werden konnte. Auch die daraufhin in der Cokultur detektierte vermehrte Sekretion der protumorösen Zytokine MCP-1, CXCL-1, IL-6 sowie IL-8 sowie die verstärkte Aktivierung der Signalproteine JNK, Akt, Stat3 und Erk konnten durch Applikation von 1 μ M Sorafenib erfolgreich inhibiert werden, was somit eine entscheidende Funktion dieser Zytokine und Signalproteine in der parakrinen Interaktion beim CCC vermuten lässt.

Schwann'sche Zellen weisen, als Hauptbestandteil peripherer Nerven, eine hohe Affinität zu Tumorzellen auf. Wie bereits für mehrere solide Tumoren gezeigt, konnte auch hier in Cokultur eine verstärkte Migration der HSC in Richtung CCC-Zelllinien beobachtet werden. Es wird vermutet, dass die Schwann'schen Zellen als Leitlinien für die Tumorzellen in Richtung der Nerven dienen könnten, wodurch eine perineurale Invasion, die ebenfalls ein charakteristisches Merkmal beim CCC darstellt, erleichtert werden könnte. Die erhöhte Sekretion an Serpin-E1 und MIF sowie die Aktivierung der Signalproteine JNK, Akt und Erk bekräftigen diese Vermutung. Die Behandlung mit Sorafenib hatte jedoch, womöglich partiell aufgrund fehlender Erk-Inhibierung, keinen Einfluss auf die Migration der HSC.

In der Kokultivierung mit beiden Stromazelllinien konnte insbesondere das Wachstum der extrahepatischen CCC-Zelllinie TFK-1 durch Sorafenib nicht ausreichend gehemmt werden, was ebenfalls mit der paradoxen, unzureichenden Erk-Hemmung assoziiert sein könnte. Die Zusammensetzung des Tumorstromas könnte somit größere Auswirkungen auf die Sorafenibsensitivität bedingen als bisher angenommen. Eventuell wäre eine Therapie mit Sorafenib eher bei Patienten mit CCC ohne perineuraler Invasion effektiver.

Zusammenfassend unterstreicht diese Arbeit die Bedeutsamkeit der Tumor-Stroma-Interaktionen beim CCC. Zukünftig müssen durch weitere Forschungen die genaue Funktion der Schwann-Zellen beim CCC sowie die komplexen Interaktionen zwischen den Komponenten des Tumorstromas und des Tumors noch näher analysiert werden, um somit zielgerichtete Therapieoptionen zu ermöglichen.

III. Literaturverzeichnis

- Alkasalias, T., Moyano-Galceran, L., Arsenian-Henriksson, M., & Lehti, K. (2018). Fibroblasts in the tumor microenvironment: Shield or spear? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms19051532>
- Azam, S. H., Pecot, C. V., Azam, S. H., & Pecot, C. V. (2016). Cancer 's got nerve : Schwann cells drive perineural invasion Find the latest version : Cancer 's got nerve : Schwann cells drive perineural invasion. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1242–1244. <https://doi.org/10.1172/JCI86801.Schwann>
- Bakst, R. L., & Wong, R. J. (2016). Mechanisms of Perineural Invasion. *Journal of Neurological Surgery, Part B: Skull Base*, 77(2), 96–106. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571835>
- Baradari, V., Höpfner, M., Huether, A., Schuppan, D., & Scherübl, H. (2007). Histone deacetylase inhibitor MS-275 alone or combined with bortezomib or sorafenib exhibits strong antiproliferative action in human cholangiocarcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 13(33), 4458–4466. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i33.4458>
- Batsakis, J. G. (1985). Nerves and neurotropic carcinomas. *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, 94(4 Pt 1), 426–427.
- Bertuccio, P., Bosetti, C., Levi, F., Decarli, A., Negri, E., & La Vecchia, C. (2013). A comparison of trends in mortality from primary liver cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma in Europe. *Annals of Oncology*, 24(6), 1667–1674. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds652>
- Bismuth, H., & Corlette, M. B. (1975). Intrahepatic cholangioenteric anastomosis in carcinoma of the hilus of the liver. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 140(2), 170–178.
- Blechacz, B. (2017). Cholangiocarcinoma: Current knowledge and new developments. *Gut and Liver*, 11(1), 13–26. <https://doi.org/10.5009/gnl15568>
- Blechacz, B., Komuta, M., Roskams, T., & Gores, G. J. (2012). Clinical Diagnosis and Staging of Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 8(9), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.131.Clinical>
- Braconi, C., Swenson, E., Kogure, T., Huang, N., & Patel, T. (2010). Targeting the IL-6 dependent phenotype can identify novel therapies for cholangiocarcinoma. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015195>
- Bridgewater, J., Galle, P. R., Khan, S. A., Llovet, J. M., Park, J. W., Patel, T., ... Gores, G. J. (2014). Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 60(6), 1268–1289. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.01.021>
- Bubici, C., & Papa, S. (2014). JNK signalling in cancer: In need of new, smarter therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, 171(1), 24–37. <https://doi.org/10.1111/bph.12432>
- Bunimovich, Y. L., Keskinov, A. A., Shurin, G. V., & Shurin, M. R. (2017). Schwann cells: a new player in the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(8), 959–968. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1929-z>
- Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J.-M., & Kohn, E. C. (2015). The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*, 120(22), 3446–3456. <https://doi.org/10.1002/cncr.28864.The>

- Chang, Q., Chen, J., Beezhold, K. J., Castranova, V., Shi, X., & Chen, F. (2009). JNK1 activation predicts the prognostic outcome of the human hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-64>
- Chen, H., Zhu, B., Zhao, L., Liu, Y., Zhao, F., Feng, J., ... Wei, Y. (2018). Allicin Inhibits Proliferation and Invasion in Vitro and in Vivo via SHP-1-Mediated STAT3 Signaling in Cholangiocarcinoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 47(2), 641–653. <https://doi.org/10.1159/000490019>
- Chen, Nelson, Ávila, & Cubero. (2019). Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) and Cholangiocarcinoma: The Missing Link. *Cells*, 8(10), 1172. <https://doi.org/10.3390/cells8101172>
- Chuaysri, C., Thuwajit, P., Paupairoj, A., Chau-In, S., Suthiphongchai, T., & Thuwajit, C. (2009). Alpha-smooth muscle actin-positive fibroblasts promote biliary cell proliferation and correlate with poor survival in cholangiocarcinoma. *Oncology Reports*, 21(4), 957–969. https://doi.org/10.3892/or_00000309
- Ciriello, G., Miller, M. L., Aksoy, B. A., Senbabaoglu, Y., & Sander, C. (2015). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers Giovanni. *Nat Genet.*, 45(10), 1127–1133. <https://doi.org/10.1038/ng.2762>.Emerging
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: A diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(1–2), 195–208. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9340-x>
- Comen, E. A., Bowman, R. L., & Kleppe, M. (2018). Underlying Causes and Therapeutic Targeting of the Inflammatory Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(June), 56. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00056>
- Corti, F., Nichetti, F., Raimondi, A., Niger, M., Prinzi, N., Torchio, M., ... Pusceddu, S. (2019). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in biliary tract cancers: A review of current evidences and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews*, 72(November 2018), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.11.001>
- Daniel E. Johnson, Rachel A. O’Keefe, J. R. G. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>.
- David, J. M., Dominguez, C., Hamilton, D. H., & Palena, C. (2016). The IL-8/IL-8R axis: A double agent in tumor immune resistance. *Vaccines*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/vaccines4030022>
- Daya, M., Loilome, W., Techasen, A., Thanee, M., Sa-Ngiamwibool, P., Titapun, A., ... Namwat, N. (2018). Progranulin modulates cholangiocarcinoma cell proliferation, apoptosis, and motility via the PI3K/pAkt pathway. *OncoTargets and Therapy*, 11, 395–408. <https://doi.org/10.2147/OTT.S155511>
- Deborde, S., & Wong, R. J. (2017). How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(24), 4405–4420. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2578-x>
- Demir, I. E., Boldis, A., Pfitzinger, P. L., Teller, S., Brunner, E., Klose, N., ... Ceyhan, G. O. (2014). Investigation of schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju184>
- DeOliveira, M. L., Cunningham, S. C., Cameron, J. L., Kamangar, F., Winter, J. M., Lillemoe, K. D., ... Schulick, R. D. (2007). Cholangiocarcinoma: Thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Annals of Surgery*, 245(5), 755–762. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000251366.62632.d3>

- Deoliveira, M. L., Schulick, R. D., Nimura, Y., Rosen, C., Gores, G., Neuhaus, P., & Clavien, P. A. (2011). New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 53(4), 1363–1371. <https://doi.org/10.1002/hep.24227>
- Dokduang, H., Techasen, A., Namwat, N., Khuntikeo, N., Pairojkul, C., Murakami, Y., ... Yongvanit, P. (2014). STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 21(10), 767–776. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jhbp.131>
- Dvorak, H. F., Flier, J. S., & Underhill, L. H. (1986, December). Tumors: Wounds That Do Not Heal. *New England Journal of Medicine*, Vol. 315, pp. 1650–1659. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606>
- Fabris, L., Perugorria, M. J., Mertens, J., Björkström, N. K., Cramer, T., Lleo, A., ... Strazzabosco, M. (2019). The tumour microenvironment and immune milieu of cholangiocarcinoma. *Liver International*, 39(S1), 63–78. <https://doi.org/10.1111/liv.14098>
- Feng, C., He, K., Zhang, C., Su, S., Li, B., Li, Y., ... Dai, R. (2014). JNK contributes to the tumorigenic potential of human cholangiocarcinoma cells through the mtor pathway regulated GRP78 induction. *PLoS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090388>
- Feng, Y., Hu, X., Liu, G., Lu, L., Zhao, W., Shen, F., ... Zhang, B. (2018). M3 muscarinic acetylcholine receptors regulate epithelial-mesenchymal transition, perineural invasion, and migration/metastasis in cholangiocarcinoma through the AKT pathway. *Cancer Cell International*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0667-z>
- Gabbiani, G., Ryan, G. B., & Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*, 27(5), 549–550.
- Gascard, P., & Tlsty, T. D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy. *Genes and Development*, 30(9), 1002–1019. <https://doi.org/10.1101/gad.279737.116>
- Gentilini, A., Pastore, M., Marra, F., & Raggi, C. (2018). The role of stroma in cholangiocarcinoma: The intriguing interplay between fibroblastic component, immune cell subsets and tumor epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms19102885>
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L., & Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Research*, 70(17), 6945–6956. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0785>
- Haga, H., Yan, I. K., Takahashi, K., Wood, J., Zubair, A., & Patel, T. (2015). Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(2015), 1–13. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.24900>
- Han, K. Q., Han, H., He, X. Q., Wang, L., Guo, X. D., Zhang, X. M., ... Jiang, M. W. (2016). Chemokine CXCL1 may serve as a potential molecular target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Medicine*, 5(10), 2861–2871. <https://doi.org/10.1002/cam4.843>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 157(1), E41–E46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

- Heits, N., Heinze, T., Bernsmeier, A., Kerber, J., Hauser, C., Becker, T., ... Braun, F. (2016). Influence of mTOR-inhibitors and mycophenolic acid on human cholangiocellular carcinoma and cancer associated fibroblasts. *BMC Cancer*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2360-8>
- Hobbs, G. A., Der, C. J., & Rossman, K. L. (2016). RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of Cell Science*, 129(7), 1287–1292. <https://doi.org/10.1242/jcs.182873>
- Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., & McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*, 14(1), 1–23. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/15/1/015008>.Fluid
- Huether, A., Hopfner, M., Baradari, V., Schuppan, D., & Scherubl, H. (2007). Sorafenib alone or as combination therapy for growth control of cholangiocarcinoma. *Biochemical Pharmacology*, 73(9), 1308–1317. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.12.031>
- Jaiswal, M., Larusso, N. F., & Burgart, L. J. (2000). Inflammatory Cytokines Induce DNA damage and Inhibit DNA repair in Cholangiocarcinoma Cells by a Nitric Oxide-dependent Mechanism
Inflammatory Cytokines Induce DNA damage and Inhibit DNA repair in Cholangiocarcinoma Cells by a Nitric Oxide-dependent Mecha. *Cancer Res*, 60(1), 184–190. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(97\)70244-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(97)70244-0)
- Jaiswal, M., LaRusso, N. F., Shapiro, R. A., Billiar, T. R., & Gores, G. J. (2001). Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology*, 120(1), 190–199. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.20875>
- Jessen, K., R, M., & Lloyd, A. (2015). Schwann cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Khan, S. A., Thomas, H. C., Davidson, B. R., & Taylor-Robinson, S. D. (2005). Cholangiocarcinoma. *Lancet (London, England)*, 366(9493), 1303–1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67530-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67530-7)
- Kubala, M. H., & DeClerck, Y. A. (2019). The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(3), 483–492. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09806-4>
- Kumar, A., Rajendran, V., Sethumadhavan, R., & Purohit, R. (2013). AKT kinase pathway: a leading target in cancer research. *TheScientificWorldJournal*, 2013, 756134. <https://doi.org/10.1155/2013/756134>
- Labib, P. L., Goodchild, G., & Pereira, S. P. (2019). Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *BMC Cancer*, 32(5), 564–569. <https://doi.org/10.1159/000360502>
- Lee, J. K., Capanu, M., O'Reilly, E. M., Ma, J., Chou, J. F., Shia, J., ... Abou-Alfa, G. K. (2013). A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, 109(4), 915–919. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.432>
- Li, X.-Y., Hu, S.-Q., & Xiao, L. (2015). The cancer-associated fibroblasts and drug resistance. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(11), 2112–2119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125276>

- Li, Y., Du, H., Qin, Y., Roberts, J., Cummings, O. W., & Yan, C. (2007). Activation of the signal transducers and activators of the transcription 3 pathway in alveolar epithelial cells induces inflammation and adenocarcinomas in mouse lung. *Cancer Research*, 67(18), 8494–8503. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0647>
- Liao, D., Luo, Y., Markowitz, D., Xiang, R., & Reisfeld, R. A. (2009). Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007965>
- Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P., & Tan, N. S. (2018). Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment - Accomplices in tumor malignancy. *Cellular Immunology*, (September 2017), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.12.003>
- Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N., & Muschel, R. J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*, 7(19), 28697–28710. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7376>
- Lin, Y., Zhang, B., Liang, H., Lu, Y., Ai, X., Zhang, B., & Chen, X. (2013). JNK inhibitor SP600125 enhances TGF- β -induced apoptosis of RBE human cholangiocarcinoma cells in a Smad-dependent manner. *Molecular Medicine Reports*, 8(6), 1623–1629. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1711>
- Lin, Z.-Y., Chuang, Y.-H., & Chuang, W.-L. (2012). Cancer-associated fibroblasts up-regulate CCL2, CCL26, IL6 and LOXL2 genes related to promotion of cancer progression in hepatocellular carcinoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 66(7), 525–529. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2012.02.001>
- Liu, J., Chen, S., Wang, W., Ning, B.-F., Chen, F., Shen, W., ... Zhang, X. (2016). Cancer-associated fibroblasts promote hepatocellular carcinoma metastasis through chemokine-activated hedgehog and TGF- β pathways. *Cancer Letters*, 379(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.05.022>
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, B. J. S. I. S. G. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.*, 359(4), 378–390.
- Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., ... Bernhagen, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*, 26(35), 5046–5059. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210318>
- Luo, X., Jia, W., Huang, Z., Li, X., Xing, B., Jiang, X., ... Shen, F. (2017). Effectiveness and safety of sorafenib in the treatment of unresectable and advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: A pilot study. *Oncotarget*, 8(10), 17246–17257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12825>
- Lutz, H. H., Trautwein, C., & Tischendorf, J. J. W. (2013). Prim??r sklerosierende cholangitis: Diagnostik und therapie. *Deutsches Arzteblatt International*, 110(51–52), 867–874. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0867>
- Martyn, G. V., Shurin, G. V., Keskinov, A. A., Bunimovich, Y. L., & Shurin, M. R. (2019). Schwann cells shape the neuro-immune environs and control cancer progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(11), 1819–1829. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-02296-3>

- Miyake, M., Hori, S., Morizawa, Y., Tatsumi, Y., Nakai, Y., Anai, S., ... Fujimoto, K. (2016). CXCL1-Mediated Interaction of Cancer Cells with Tumor-Associated Macrophages and Cancer-Associated Fibroblasts Promotes Tumor Progression in Human Bladder Cancer. *Neoplasia (United States)*, 18(10), 636–646. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.08.002>
- Moehler, M., Maderer, A., Schimanski, C., Kanzler, S., Denzer, U., Kolligs, F. T., ... Woerns, M. (2014). Gemcitabine plus sorafenib versus gemcitabine alone in advanced biliary tract cancer: a double-blind placebo-controlled multicentre phase II AIO study with biomarker and serum programme. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 50(18), 3125–3135. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.09.013>
- Morris, K. T., Nofchissey, R. A., Pinchuk, I. V., & Beswick, E. J. (2014). Chronic macrophage migration inhibitory factor exposure induces mesenchymal epithelial transition and promotes gastric and colon cancers. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098656>
- Murakami, Y., Uemura, K., Sudo, T., Hashimoto, Y., Kondo, N., Nakagawa, N., ... Sueda, T. (2013). Perineural invasion in extrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic impact and treatment strategies. *Journal of Gastrointestinal Surgery : Official Journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 17(8), 1429–1439. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2251-0>
- Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M., & Takeyama, H. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: Anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. *British Journal of Cancer*, 110(2), 469–478. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.748>
- Navab, R., Strumpf, D., To, C., Pasko, E., Kim, K. S., Park, C. J., ... Tsao, M. S. (2016). Integrin $\alpha 11\beta 1$ regulates cancer stromal stiffness and promotes tumorigenicity and metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 35(15), 1899–1908. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.254>
- Nobre, C. C. G., de Araújo, J. M. G., Fernandes, T. A. A. de M., Cobucci, R. N. O., Lanza, D. C. F., Andrade, V. S., & Fernandes, J. V. (2017). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Biological Activities and Relation with Cancer. *Pathology and Oncology Research*, 23(2), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0138-6>
- Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D., & Cunha, G. R. (1999). Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium.pdf. *Cancer Research*, 5002–5011.
- Osuala, K. O., Sameni, M., Shah, S., Aggarwal, N., Simonait, M. L., Franco, O. E., ... Sloane, B. F. (2015). IL-6 signaling between ductal carcinoma in situ cells and carcinoma-associated fibroblasts mediates tumor cell growth and migration. *BMC Cancer*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1576-3>
- Palmer, W. C., & Patel, T. (2012). Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Journal of Hepatology*, 57(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.022>
- Pang, R. W. C., & Poon, R. T. P. (2007). From Molecular Biology to Targeted Therapies for Hepatocellular Carcinoma: The Future Is Now. *Oncology*, 72(suppl 1(Suppl. 1), 30–44.
- Pencik, J., Thi, H., Pham, T., Schmoellerl, J., & Javaheri, T. (2016). JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome. *Cytokine*, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.017>JAK-STAT
- Pópulo, H., Lopes, J. M., & Soares, P. (2012). The mTOR signalling pathway in human cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 1886–1918. <https://doi.org/10.3390/ijms13021886>

- Qian Liu, Anping Li, Yijun Tian, Jennifer D. Wu, Yu Liu, Tengfei Li, Yuan Chen, Xinwei Han, and K. W. (2016). The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.08.002>.
- Quail, D., & Joyce, J. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19(11), 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.Microenvironmental
- Quintás-Cardama, A., & Verstovsek, S. (2013). MOLECULAR PATHWAYS: JAK/STAT PATHWAY: MUTATIONS, INHIBITORS, AND RESISTANCE. *Clin Cancer Res.*, 48(0), 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>.Gut-Liver
- Razumilava, N., & Gores, G. (2013). Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.09.009>.Classification
- Rizvi, S., Borad, M. J., Patel, T., & Gores, G. J. (2014). Cholangiocarcinoma: Molecular pathways and therapeutic opportunities. *Seminars in Liver Disease*, 34(4), 456–464. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1394144>
- Rizvi, S., Eaton, J. E., & Gores, G. J. (2015). Primary Sclerosing Cholangitis as a Pre-malignant Biliary Tract Disease : Surveillance and Management. *Clinical Gastroenterol Hepatology*, 13(12), 2152–2165. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.05.035>.Primary
- Rizvi, S., & Gores, G. J. (2013). Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*, 145(6), 1215–1229. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.013>
- Rizvi, S., & Gores, G. J. (2014). Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Digestive Diseases*, 32(5), 564–569. <https://doi.org/10.1159/000360502>
- Santi, A., Kugeratski, F. G., & Zanivan, S. (2018). Cancer Associated Fibroblasts: The Architects of Stroma Remodeling. *Proteomics*, 18(5–6), 1–15. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700167>
- Sato, N., Kohi, S., Hirata, K., & Goggins, M. (2016). Role of hyaluronan in pancreatic cancer biology and therapy: Once again in the spotlight. *Cancer Science*, 107(5), 569–575. <https://doi.org/10.1111/cas.12913>
- Serafini, F. M., & Radvinsky, D. (2016). The pathways of genetic transformation in cholangiocarcinogenesis. *Cancer Genetics*, 209(12), 554–558. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.07.004>
- Sha, M., Jeong, S., Qiu, B. jun, Tong, Y., Xia, L., Xu, N., ... Xia, Q. (2018). Isolation of cancer-associated fibroblasts and its promotion to the progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Medicine*, 7(9), 4665–4677. <https://doi.org/10.1002/cam4.1704>
- Shen, F. Z., Zhang, B. Y., Feng, Y. J., Jia, Z. X., An, B., Liu, C. C., ... Lu, Y. (2010). Current research in perineural invasion of cholangiocarcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, Vol. 29, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-24>
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., & Takeyama, H. (2015). Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*, 7(4), 2443–2458. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>
- Shirai, K., Ebata, T., Oda, K., Nishio, H., Nagasaka, T., Nimura, Y., & Nagino, M. (2008). Perineural invasion is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *World Journal of Surgery*, 32(11), 2395–2402. <https://doi.org/10.1007/s00268-008-9726-2>
- Sirica, A. E. (2011). The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(1), 44–54. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.222>

- Smirnova, O. V., Ostroukhova, T. Y., & Bogorad, R. L. (2007). JAK-STAT pathway in carcinogenesis: Is it relevant to cholangiocarcinoma progression? *World Journal of Gastroenterology*, 13(48), 6478–6491. <https://doi.org/10.3748/wjg.13.6478>
- Son, D., Le, N. T., Pannacciulli, N., Chen, K., Salbe, A. D., Hill, J. O., ... Krakoff, J. (2015). The chemokine (CCL2-CCR2) signaling axis mediates perineural invasion. *Mol Cancer Res.*, 86(3), 573–579. <https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2196707>.Separate
- Soon, P. S. H., Kim, E., Pon, C. K., Gill, A. J., Moore, K., Spillane, A. J., ... Baxter, R. C. (2013). Breast cancer-associated fibroblasts induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0227>
- Squadroni, M., Tondulli, L., Gatta, G., Mosconi, S., Beretta, G., & Labianca, R. (2017). Cholangiocarcinoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 116, 11–31. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.11.012>
- Su, D., Guo, X., Huang, L., Ye, H., Li, Z., Lin, L., ... Zhou, Q. (2020). Tumor-neuroglia interaction promotes pancreatic cancer metastasis. *Theranostics*, 10(11), 5029–5047. <https://doi.org/10.7150/thno.42440>
- Sugiyama, H., Onuki, K., Ishige, K., Baba, N., Ueda, T., Matsuda, S., ... Shoda, J. (2011). Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Journal of Gastroenterology*, 46(6), 779–789. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0380-3>
- Sun, Q., Li, F., Sun, F., & Niu, J. (2015). Interleukin-8 is a prognostic indicator in human hilar cholangiocarcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(7), 8376–8384.
- Sylvie Deborde, Tatiana Omelchenko, Anna Lyubchik, Yi Zhou, He, S., McNamara, W. F., Chernichenko, N., Lee, S. Y., Barajas, F., ... Wong, R. J. (2016). Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion Find the latest version : Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1538–1554. <https://doi.org/10.1172/JCI82658>.also
- Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., Hutson, T. E., Pharm, D., Gore, M., ... Simantov, R. (2007). Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.*, 125–134.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., & Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(5), 349–363. <https://doi.org/10.1038/nrm809>
- Tyson, G. L., & El-Serag. (2011). Risk Factors of Cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 54(1), 173–184. <https://doi.org/10.1002/hep.24351>.Risk
- Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H., & Hass, R. (2011). Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-18>
- Vaquero, J., Aoudjehane, L., & Fouassier, L. (2020). Cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma. *Current Opinion in Gastroenterology*, 36(2), 63–69. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000609>
- Wang, C., Maass, T., Krupp, M., Thieringer, F., Strand, S., Worns, M. A., ... Teufel, A. (2009). A systems biology perspective on cholangiocellular carcinoma development: focus on MAPK-signaling and the extracellular environment. *Journal of Hepatology*, 50(6), 1122–1131. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.024>

- Wilhelm, S. M., Carter, C., Tang, L., Wilkie, D., McNabola, A., Rong, H., ... Trail, P. A. (2004). BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF / MEK / ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the Pr. *Cancer Res*, 64(19), 7099–7109. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1443>
- Wu, X., Tao, P., Zhou, Q., Li, J., Yu, Z., & Wang, X. (2017). IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2 / STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*, 8(13), 20741–20750.
- Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, and D. S. H. (2018). Targeting cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 25(4), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.cogdev.2010.08.003>. Personal
- Yokoi, K., Kobayashi, A., Motoyama, H., Kitazawa, M., Shimizu, A., Notake, T., ... Miyagawa, S. (2018). Survival pathway of cholangiocarcinoma via AKT/mTOR signaling to escape RAF/MEK/ERK pathway inhibition by sorafenib. *Oncology Reports*, 39(2), 843–850. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6153>
- Zhang, M., Li, Z. feng, Wang, H. fan, Wang, S. sha, Yu, X. hua, Wu, J. biao, ... Tang, Y. ling. (2019). MIF promotes perineural invasion through EMT in salivary adenoid cystic carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 58(6), 898–912. <https://doi.org/10.1002/mc.22979>
- Zhang, S. H., Shurin, G. V., Khosravi, H., Kazi, R., Kruglov, O., Shurin, M. R., & Bunimovich, Y. L. (2019). Immunomodulation by Schwann cells in disease. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(2), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02424-7>
- Zhao, H.-F., Wang, J., & Tony To, S.-S. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *International Journal of Oncology*, 429–436. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3052>
- Zhou, Yan, Shurin, G. V., Zhong, H., Bunimovich, Y. L., Han, B., & Shurin, M. R. (2018). Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer. *Cancer Research*, 78(20), 5927–5939. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1702>
- Zhou, Yanming, Liu, S., Wu, L., & Wan, T. (2017). Survival after surgical resection of distal cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of prognostic factors. *Asian Journal of Surgery*, 40(2), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2015.07.002>

IV. Anhang

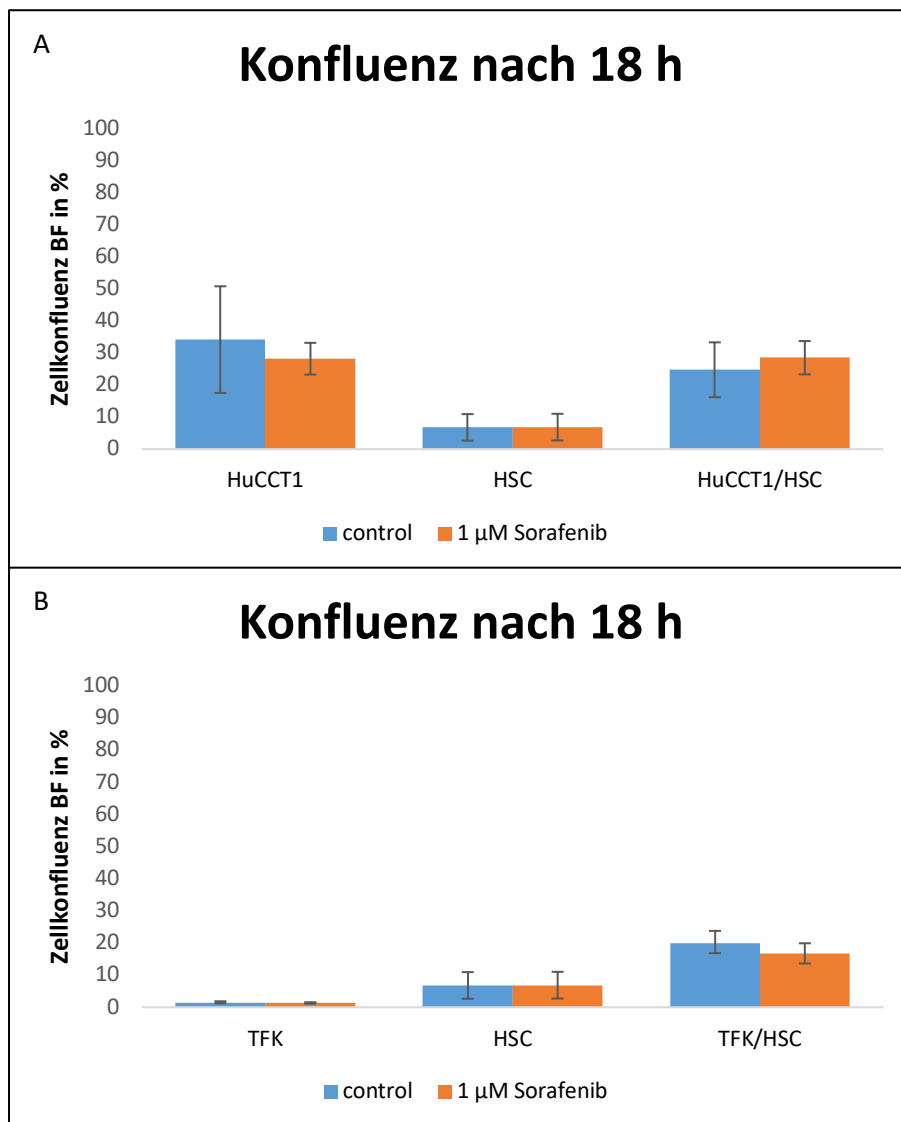


Abb.: Parakrines-Interaktions-Modell - Behandlung mit 1 µM Sorafenib

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an konfluenter Fläche im Spalt im Hellfeld (BF) der unbehandelten oder mit 1 µM Sorafenib behandelten Monokultur aus HuCCT-1, HSC und deren Kokultur (A), bzw. die der TFK-1, HSC sowie deren Kokultur (B). Gezeigt sind die Daten als Mittelwerte inklusive Standardfehler aus drei unabhängigen Versuchen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Susanne Sebens, Herrn PD Dr. Nils Heits und Herrn Dr. Jan-Paul Gundlach für die hervorragende Betreuung. Für die fachliche Unterstützung bei der Zusammenstellung der Arbeit, Interpretation der Ergebnisse, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Thomas Becker möchte ich besonderen Dank für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation in seiner Klinik aussprechen.

Bei Familie Dr. Geisen möchte ich mich zudem für die hervorragende Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Experimente herzlich bedanken. Weiterhin möchte ich Julia Wilking für die ausgezeichnete Hilfe bei den experimentellen Arbeiten danken.

Zu großem Dank bin ich meinen Eltern und meiner Frau verpflichtet, die mich durch das Studium der Humanmedizin begleiteten und mich jederzeit unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht:

Gundlach JP, Kerber J, Hendricks A, Bernsmeier A, Halske C, Röder C, Becker T, Röcken C, Braun F, Sebens S, Heits N. Paracrine Interaction of Cholangiocellular Carcinoma with Cancer-Associated Fibroblasts and Schwann Cells Impact Cell Migration. J Clin Med. 2022 May 15;11(10):2785. doi: 10.3390/jcm11102785

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jannik Kerber
Geburtsdatum: 20.06.1990
Geburtsort: Rendsburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

1997 - 2001 Grundschole (*Jevenstedt*)
2001 - 2010 Herderschule-Gymnasium (*Rendsburg*),
Allgemeine Hochschulreife
2010 - 2012 schulische Ausbildung zum Biologisch-Technischen
Assistenten (*School of Life Science, UKE Hamburg*)
07/2012 - 04/2014 Biologisch-Technischer Assistent am Institut für
Experimentelle Tumorforschung (*UKSH Campus Kiel*)
2014 - 2016 Vorklinisches Medizinstudium an der Universität Szeged
(*Ungarn*)
04/2017 – 09/2017 Klinisches Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-
Universität (*Erlangen-Nürnberg*)
10/2017 - 11/2021 Klinisches Medizinstudium an der Christian-Albrechts-
Universität
Praktisches Jahr: UKSH Kiel (Dermatologie), FEK
Neumünster (Innere Medizin), Imland Klinik Rendsburg
(Chirurgie)
Abschluss: Ärztliche Prüfung
11/2021 Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit:

Seit 01.2022 Assistenzarzt in der Klinik für Dermatologie, Venerologie
und Allergologie, UKSH Kiel

Dissertation

02/ 2018 - 11/2023

Wissenschaftliche Arbeiten zu dem Thema
„Untersuchungen zum Einfluss tumorassoziierter
Fibroblasten sowie Perineuralscheiden auf Proliferation
und Migration beim cholangiozellulären Karzinom“ in
der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie am UKSH Campus
Kiel

Publikationsverzeichnis

Zitable Kongressbeiträge:

Kerber, J., Hendricks, A., Böger, C., Geisen, R., Egberts, J.-H., Braun, F., Sebens, S., Becker, T., Heits, N. (2018). Influence of Cancer-Associated Fibroblasts and Schwann Cells on Tumor Progression of Human Cholangiocarcinoma in Vitro. *Eur Surg Res* 2018;59(suppl 1):1–68 (*135th Congress of the German Society of Surgery (DGCH)*)

Publikationen:

Gundlach JP, Kerber J, Hendricks A, Bernsmeier A, Halske C, Röder C, Becker T, Röcken C, Braun F, Sebens S, Heits N. Paracrine Interaction of Cholangiocellular Carcinoma with Cancer-Associated Fibroblasts and Schwann Cells Impact Cell Migration. *J Clin Med*. 2022 May 15;11(10):2785. doi: 10.3390/jcm11102785

Geisen, U., Zenthoefer, M., Peipp, M., Kerber, J., Plenge, J., Managò, A., ... Kalthoff, H. (2015). Molecular mechanisms by which a *Fucus vesiculosus* extract mediates cell cycle inhibition and cell death in pancreatic cancer cells. *Marine Drugs*, 13(7), 4470–4491. <https://doi.org/10.3390/md13074470>

Heits, N., Heinze, T., Bernsmeier, A., Kerber, J., Hauser, C., Becker, T., ... Braun, F. (2016). Influence of mTOR-inhibitors and mycophenolic acid on human cholangiocellular carcinoma and cancer associated fibroblasts. *BMC Cancer*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2360-8>

Zenthoefer, M., Geisen, U., Hofmann-Peiker, K., Fuhrmann, M., Kerber, J., Kirchhöfer, R., ... Kalthoff, H. (2017). Isolation of polyphenols with anticancer activity from the Baltic Sea brown seaweed *Fucus vesiculosus* using bioassay-guided fractionation. *Journal of Applied Phycology*, 29(4), 2021–2037. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1080-z>