Aus dem Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktorin: Frau Prof. Brigitte Vollmar

Etablierung eines metastasierenden Pankreaskarzinommodells in der immuninkompetenten Maus

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von Hagen Joachim Kerndl geb. am 01.08.1992 in Tettnang

aus Augsburg

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005323

GUTACHER:

PROF. DR. D ZECHNER, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

PROF. DR. R JASTER, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

PROF. DR. L.I. PARTECKE, HELIOS KLINIKUM SCHLESWIG

EINREICHUNG: 13.12.2024

VERTEIDIGUNG: 08.07.2025

Inhaltsverzeichnis

Glossar *4*

Zusammenfassung *7*

Abstract *8*

1. Einleitung *9*

1.1. Pankreas *9*

1.1.1. Anatomie *9*

1.1.2. Histologie *9*

1.1.3. Physiologie *10*

1.2. Pankreaskarzinom *12*

1.2.1. Epidemiologie *12*

1.2.2. Histopathologie *12*

1.2.3. Ätiopathogenese *13*

1.3. Klinik und Therapie *15*

1.3.1. Symptomatik *15*

1.3.2. Diagnose *15*

1.3.3. Therapie *16*

1.4. Metastasierung *18*

1.4.1. Grundprinzipien der Metastasierung *18*

1.4.2. Metastasierung des Pankreaskarzinom *22*

1.5. Tiermodelle des Pankreaskarzinoms *23*

1.5.1. Chemische Induktion *23*

1.5.2. Genetische Modelle *23*

1.5.3. Transplantationsmodelle *25*

1.6. Tiermodelle für die Evaluation der Metastasierung *27*

1.6.1. Prinzipien *27*

1.6.2. Metastasierungsmodelle *27*

1.6.2.1. Via naturalis nach orthotoper Injektion *27*

1.6.2.2. Systemische Tumorzellinjektion *28*

1.6.2.3. Metastasierung im GEMM *29*

1.7. Lysophosphatidsäure *29*

1.8. Verwendete Chemotherapeutika *31*

2. Material und Methoden *33*

2.1. In vitro Versuche ... 33
2.1.1. Zelllinien und allgemeine Zellkultur ... 33
2.1.2. Migrations-Assay (Scratch-Assay) ... 34
2.1.3. Proliferations-Assay (BrdU-Assay) ... 35
2.1.4. Western Blot ... 36
2.2. In vivo Versuche ... 38
2.2.1. Allgemeine Information zu den Versuchstieren ... 38
2.2.2. Verwendete Mausstämme ... 39
2.2.3. Versuchsdurchführung ... 39
2.2.3.1. Orthotope Tumorzellinjektion ... 39
2.2.3.2. Versuchsablauf und Versuchsdurchgänge ... 41
2.2.3.3. Blutbild ... 44
2.2.3.4. Gewebeentnahme und Histologische Untersuchung ... 45
2.2.3.5. Bildgebung ... 46
2.3. Statistik ... 48
3. Ergebnisse ... 49
3.1. In vivo: Auswahl der Tierstämme und Zellinjektion ... 49
3.2. Expression von LPA-Rezeptoren in Pankreaskarzinomzelllinien ... 52
3.3. Evaluation der Zellmigration ... 52
3.3.1. Einfluss des Zellmediums auf die Zellmigration ... 52
3.3.2. Hemmung der Migration durch Chemotherapeutika ... 54
3.3.3. Einfluss von LPA auf die Migrationsgeschwindigkeit ... 55
3.3.4. Beeinflussung der Proliferation durch LPA ... 56
3.4. Einfluss von LPA auf Tumorgewicht und Metastasierung ... 58
3.4.1. Tumorinzidenz, Tumorgewicht & Metastasierung ... 58
3.4.2. Anwendung von Bildgebenden Verfahren ... 61
3.4.3. Sensitivität und spezifität des Imaging mit Night-Owl ... 63
3.4.4. Histologie ... 67
4. Diskussion ... 70
4.1. Diskussion von Material und Methoden ... 70
4.1.1. Vor- und Nachteile des Scratch-Assays ... 70
4.1.2. Eignung von Zelllinien, Mausstämmen ... 71
4.1.2.1. Eignung der Zelllinien ... 71
4.1.2.2. Eignung der Mausstämme ... 72

4.1.3. Eignung des orthotopen Tiermodells....72
4.1.4. Eignung von Night-Owl-Imaging zur Detektion von Primärtumoren und Metastasen....73
4.1.5. Optimierung der Versuchsdauer für die Beobachtung von Metastasen....74
4.2. Diskussion der Ergebnisse....75
4.2.1. Stimulation der Zellmigration durch LPA....75
4.2.2. Fehlende Stimulation der Metastasierung durch LPA....78
4.2.3. Ein metastasierendes Pankreaskarzinommodell für zukünftige Studien....79
5. Relevanz der Ergebnisse....80
6. Ausblick....81
Thesen....82
Anhang....83
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis....84
Literaturverzeichnis....86
Danksagung....96
Eidesstattliche Versicherung....97
Lebenslauf....98
Publikationsliste....99

GLOSSAR

^{18}FDG	18-Fluorodesoxyglucose
A.	*Arteria*
Aa.	*Arteriae*
APC	*adenomatous polyposis coli gene*
Aqua. dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATX	*Autotaxin*
BMI	*body mass index*
BRCA2	breast cancer gene 2
BrdU	5-Bromo-2‘-Desoxyuridin
BSA	*bovine serum albumin*
CA19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
CCL2	Chemokinligand 2
CD	*cluster of differentiation*
CDKN	*cyclin dependent kinase inhibitor*
CEA	Karzinoembryonales Antigen
CHC	α-cyano-4-hydroxycinnamate
CK	Zytokeratin
CT	Computertomografie
CTC	*circulating tumor cell*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECOG	*Eastern Cooperative Oncology Group*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	*epithelial growth factor*
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EUS	Endosonografie
FCS	*fetal calf serum*
FS	Fettsäuren
G-CSF	*granulocyt colony stimulating factor*
GEMM	*genetically engineered mouse model*

GLUT4	Glucosetransporter 4
HBSS	*hanks buffered sodium saline*
HIF	*hypoxia induced factor*
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
IPMN	Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie
KRAS	KRAS proto onkogene
LPA	*lysophosphatidic acid*
M	Männer/männlich
MAMs	Metastasen assoziierte Makrophagen
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie
MRT	Magnetresonanztomografie
MUC	Mucin
nab	Nanopartikel-Albumin gebunden
NCCN	*National Comprehensive Cancer Network*
NFkB	*nuclear factor kappa B*
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PALB	*partner and localizer of BRCA2*
PanIN	Pankreatische intraepiteliale Neoplasie
PAS	*periodic acid shift reaction*
PBS	*phosphate buffered saline*
PDA	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDX	*patient-derived xenografts*
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PLC	Phospholipase C
PSCA	*prostate stem cell antigen*
PVDF	Polyvenylidendifluorid
RCT	Radiochemotherapie
RFP	*red fluorescent protein*

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	*rounds per minute*
SDS	*sodium dodecyl sulfat*
siRNA	*small interfering RNA*
SMDA	SMAD
SNAIL	*snail family transcriptional repressor*
SPF	*specific-pathogen-free*
TBS	*TRIS-buffered saline*
TBST	*TRIS-buffered saline with Tween20*
TRIS	*tris (hydroxymethyl)aminomethan*
TGF-beta	*tumor growth factor beta*
TP	Tumor Protein
TWIST	TWIST Transkriptionsfaktor
UICC	*union international contre le cancer*
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
V.	*Vena*
VASP	*vasodilatator stimulated phosphoprotein*
Vv.	*Venae*
W	Frauen/weiblich
µm	Mikrometer

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Trotz der intensiven Forschung der letzten Jahre und zahlreicher neuer Errungenschaften in der Krebstherapie, hat das Pankreaskarzinom noch immer eine sehr schlechte Prognose. Die Erforschung von pathologischen Mechanismen und Evaluation neuer Therapien hat damit eine hohe Priorität. Für diese Forschung bedarf es weiterhin zuverlässiger Tiermodelle, welche die Erkrankung suffizient abbilden und Rückschlüssen auf die Erkrankung und deren Therapie im Menschen zulassen. Ein wesentlicher Punkt ist dabei die Abbildung der Metastasierung als entscheidender Prognosefaktor. Mausmodelle, welche diese Metastasierung adäquat widerspiegeln gibt es wenige. In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, solch ein Modell zu entwickeln und gegebenenfalls die Metastasierung des Pankreaskarzinoms für dieses Modell zu beeinflussen.

Methodik: Untersucht wurde die orthotope Injektion muriner und humaner Pankreaskarzinomzelllinien (6606PDA, 7265PDA, MIA PaCa-2) in Mäusen des Stammes C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J. Nach Injektion erfolgte eine bis zu 88-tägige Beobachtung der Tiere. In diesem Zeitraum erfolgte die Verabreichung von Lysophosphatidsäure um die Metastasierung zu stimulieren. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen mittels MRT, PET/CT und NightOWL-Imaging überprüft. Am Versuchsende erfolgte die histologische Auswertung und Untersuchung auf Metastasen. Weiterhin wurden die Zelllinien *in vitro* auf die Expression von Lysophosphatidsäure-Rezeptoren hin untersucht und überprüft inwieweit Lysophosphatidsäure die Migration und Proliferation dieser Zelllinien beeinflusst.

Ergebnisse und Ausblick: Lysophosphatidsäure stimuliert *in vitro* die Migration von 7265PDA-Zellen ohne die Proliferation zu beeinflussen. Lysophosphatidsäure führt in der Zelllinie MIA PaCa-2 zu keiner signifikanten Änderung der Migration und Proliferation. Allerdings exprimierten alle untersuchten PDA-Zelllinien die Lysophosphatidsäure-Rezeptoren 1-6. Im Mausmodell stimuliert Lysophosphatidsäure nicht die Metastasierung von MIA PaCa-2 Zellen. In unserem Versuchsansatz mit MIA PaCa-2 Zellen in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J konnten wir in bis zu 83 % der Fälle eine hepatische und pulmonale Metastasierung beobachten. Das NightOWL-Imaging erwies sich als praktikable Methode, um Tumoren zu detektieren und sollte auch in Zukunft zur Evaluation von Therapeutika in Kombination mit dem verwendeten Mausmodell verwendet werden.

ABSTRACT

Background: Despite intensive research in recent years and numerous new achievements in cancer therapy, pancreatic cancer still has a very poor prognosis and high lethality. Thus, research into pathological mechanisms and evaluation of new therapies is a high priority. For this research, reliable animal models are still needed that adequately represent the disease and allow conclusions to be drawn about the disease and therapy in humans. A key issue is the modelling of metastasis, as this is a crucial prognostic factor for pancreatic cancer. However, there are only a few mouse models that adequately reflect metastasis. In this work, we attempted to develop such a model and, if necessary, to influence the metastasis of pancreatic carcinoma for this model.

Methods: Various murine and human pancreatic cancer cell lines (6606PDA, 7265PDA, MIA PaCa-2) were orthotopically injected in C;129S4-Rag2tm1.1FlvIl2rgtm1.1Flv/J mice and the animals were observed for up to 88 days. During this period, administration of LPA was performed to promote metastasis. Tumor growth was monitored at regular intervals by MRI, PET/CT, and NightOWL imaging. At the end of the experiment, histological evaluation and examination for metastasis was performed. Furthermore, the cell lines were examined *in vitro* for the presence of LPA receptors and a characterization of the cell lines regarding response to LPA in terms of migration and proliferation was investigated.

Results and Conclusion: *In vitro*, an increase in migration for the 7265PDA cell line by LPA could be demonstrated without affecting proliferation. For MIA PaCa-2, no significant increase by LPA could be detected with respect to migration and proliferation. However, expression of LPA receptors 1-6 could be detected for all PDA cell lines examined. In the mouse model, LPA was not able to stimulate metastasis of MIA PaCa-2. However, in our experimental approach with MIA PaCa-2 cells in C;129S4-Rag2tm1.1FlvIl2rgtm1.1Flv/J, we observed hepatic and pulmonary metastasis in up to 83 %. For monitoring tumor growth, NightOwl imaging was shown to be a reliable method that can also be used in the future to evaluate therapeutics in combination with the mouse model used.

1. EINLEITUNG

1.1. PANKREAS

1.1.1. ANATOMIE

Das Pankreas, auch Bauchspeicheldrüse genannt, liegt leicht S-Förmig sekundär retroperitoneal vor dem ersten und zweiten Lendenwirbelkörper. Die anatomische Gliederung des ca. 13-18 cm langen und 70-80 g schweren Organs erlaubt eine Einteilung in Kopf, Korpus und Schwanz, wobei der Kopf von der Konkavität des duodenalen C umgeben ist. Der *Ductus pancreaticus* als der Hauptausführungsgang, mit einem Durchmesser von zwei Millimetern, durchzieht das gesamte Organ und mündet zusammen mit dem *Ductus choledochus* in der *Papilla duodeni major (Papilla Vateri)*, in der *Pars descendens des Duodenums*. Bei 40 % der Menschen existiert ein zusätzlicher Pankreasgang, welcher in der *Papilla duodeni minor (Papilla Santorini*) mündet(1). Die Blutversorgung des Pankreas erfolgt über die Pankreasarkade, die ein dichtes Gefäßnetz bildet. Die *Aa. pancreaticoduodenales superior, anterior und posterior* bilden im Bereich des Pankreaskopfes eine doppelte Gefäßschlinge mit den Ästen der *A. pancreaticoduodenalis inferior*. Die *A. splenica* gibt in ihrem Verlauf am Pankreasoberrand mehrere *Rami pancreatici* ab, die Corpus und Pankreasschwanz versorgen. Der venöse Abfluss des Pankreaskopfes erfolgt über die *Vv. pancreaticoduodenales* in die *V. mesenterica superior,* Korpus und Kauda drainieren über die *Vv. pancreaticae in die V. splenica, V. mesenterica superior* und *V. splenica* vereinen sich schließlich zur Pfortader(1).

Der Lymphabfluss des Pankreaskörpers und -schwanzes erfolgt über die *Nodi lymphoidei pancreatici superiores* entlang der *A. splenica* und über die *Nodi lymphoidei pancreatici inferiores* entlang der *A. pancreatica inferior* zu den *Nodi lymphoidei coeliaci.* Der Pankreaskopf drainiert vor allem über die *Nodi lymphoidei pankreaticoduodenales superiores und inferiores zu den Nodi lymphoidei hepatici* und *Nodi lymphoidei mesenteriales,* sowie zu den *Nodi lymphoidei coeliaci*. Von dort führt der weitere Lymphabfluss über die *Trunci intestinales* und über die *Cysterna chyli* in den *Ductus thoracicus* (1).

1.1.2. HISTOLOGIE

Die histologische Gliederung des Pankreas ermöglicht eine Einteilung des Gewebes in exokrine Drüsenanteile und die endokrinen Anteile, welche in den Langerhans-Inseln

lokalisiert sind. Dabei nimmt der exokrine Anteil deutlich mehr als 90 % des Pankreasvolumens ein und weist eine Läppchengliederung auf. Die einzelnen Drüsenläppchen bestehen aus vielen hundert azinösen Endstücken (Azini), die wiederum aus ca. 70 Drüsenzellen bestehen, welche der Basallamina aufsitzen(1). Der apikale Zellpol mit seinem Mikrovilli ragt in das Lumen des Drüsenläppchens und dient der Sekretion von Zymogengranula, die inaktive Vorstufen von Verdauungsenzymen enthalten. Sogenannte Schaltstücke aus einreihigem Epithel stülpen sich mit ihren zentroazinären Zellen, gekennzeichnet durch helles Zytoplasma, in das Lumen des Azinus und verbinden je zwei bis vier Azini miteinander(2). An die Schaltstücke schließt sich das Ausführungsgangsystem an, welches zunächst aus größer werdenden Schaltstücken besteht und in intralobuläre Gänge mit kubischem Epithel übergeht. Im weiteren Verlauf werden die Gänge zu interlobulären Gängen. Diese sind größer und besitzen ein prismatisches Epithel, das zusätzliche Muzine sezerniert(2). Die endokrine Funktion liegt vor allem in den Langerhans-Inseln, dies sind 280 µg große Verbände von ca. 2000-3000 endokrinen Zellen, die vorwiegend im Pankreasschwanz lokalisiert sind. Diese Zellen lassen sich aufgrund ihrer geringeren Azidophilität gut von den umgebenden azinösen Zellen unterscheiden. Innerhalb der Langerhans-Inseln unterscheidet man A-/ B-/ D- und PP Zellen, eine Unterscheidung gelingt meist mittels Färbung und Morphologie. Weiterhin sind die insulinproduzierenden B-Zellen zentral in den Langerhans-Inseln angeordnet. Die glukagonproduzierenden A-Zellen finden sich eher randständig. D- und PP-Zellen finden sich verhältnismäßig deutlich seltener und ohne bestimmte Lokalisation in den Langerhans-Inseln(2).

1.1.3. PHYSIOLOGIE

Die exokrine Funktion besteht in der Sekretion von Verdauungsenzymen, welche die aufgenommene Nahrung im Darm in resorbierbare Bestandteile spalten, sowie der Sekretion von bicarbonathaltigen Muzinen zur Neutralisation des Magensaftes, um ein pH-Optimum für diese Enzyme zu schaffen. Der Übertritt sauren Speisebreies in das Duodenum löst die Ausschüttung von Sekretin aus den duodenalen S-Zellen aus, welches im Pankreasgangsystem die Sekretion von bikarbonathaltigem Pankreassekret stimuliert. Treten Fettsäuren, Peptide und Aminosäuren in das Duodenum über und stimulieren dort die I-Zellen kommt es zu einer Steigerung der Sekretion von Cholezystokinin(3). Dieses führt in den Pankreasazini zur Ausschüttung

von Zymogenen, inaktiven Vorstufen der Verdauungsenzyme, sowie α-Amylase und Lipase. Im Darmlumen spalten Enteropeptidasen Trypsinogen zu Trypsin, welches die aktive Enzymform darstellt. Trypsin aktiviert durch proteolytische Spaltung weiteres Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Proelastase wie auch Procarboxypeptidase. Diese Verdauungsenzyme sind im Darmlumen an der Aufspaltung der Nahrungsbestandteile in resorbierbare Nährstoffe beteiligt. Die Bildung als Zymogene stellt einen von mehreren Schutzmechanismen dar, welche die Autolyse des Pankreas durch die Aktivität der sezernierten Enzyme verhindernt. So werden auch Enzyme, die vor ihrer Sekretion in den Darm aktiviert werden, erkannt und noch in den Granula abgebaut(3). Die Hormone Insulin und Glukagon, welche in den Langerhans-Inseln produziert werden, sind hauptverantwortlich für die Regulation der Blutglukosekonzentration. Insulin wird bei Nahrungsaufnahme sowie steigendem Blutglukosespiegel vermehrt ausgeschüttet. Dabei wirkt die Aufnahme von Glukose in die B-Zellen als Sensor, über die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) wird ein Kalium-Kanal blockiert. In der Folge kommt es zu einen Kalzium-Einstrom, welcher die Exozytose von Insulin auslöst.

Eine bedeutende Rolle wird hier auch den gastrointestinalen Hormonen zugeschrieben, welche bei oraler Nahrungsaufnahme verstärkt ausgeschüttet werden. So führt eine orale Aufnahme von Kohlenhydraten zu einer ausgeprägteren Insulinausschüttung als die parenterale Aufnahme. Das vegetative Nervensystem begünstigt über die anabole Wirkung des Parasympathikus ebenso die Ausschüttung von Insulin. Insulin führt an den Muskel- und Leberzellen durch vermehrten Einbau des Glukosetransporters 4 (GLUT4) in der Zellmembran zur vermehrten Aufnahme von Glukose in die Zelle und dort zur Bildung von Glykogen. Außerdem kommt es zu einer Umstellung der Zellen zu einer anabolen Stoffwechsellage. Glukagon als Insulin-Antagonist wird beim Absinken des Blutglukosespiegels oder durch sympathische Stimulation vermehrt ausgeschüttet. Vor allem in den Leberzellen führt es zur Glykogenolyse sowie zur Steigerung der Glukoneogenese, was einen Anstieg des Blutglukosespiegels zur Folge hat(3). Somatostatin, welches in den D-Zellen der Langerhans-Inseln synthetisiert wird, wirkt parakrin hemmend auf die Insulin- und Glukagonsynthese, sowie im gesamten Magendarmtrakt hemmend auf viele Absorptions- und Motilitätsvorgänge. Das Pankreatische Polypeptid (PP) wird in den PP-Zellen der Langerhans-Inseln gebildet(3). PP zählt zu den Neuropeptiden und reguliert über die Aktivierung der hypothalamischen Neuropeptide Appetitregulation

und Sättigungsgefühl(4). Weiterhin hemmt es die Sekretion von Insulin, Glukagon und Somatostatin(4).

1.2. PANKREASKARZINOM

1.2.1. EPIDEMIOLOGIE

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms in Deutschland beträgt 47/100.000 Einwohner bei nahezu ausgeglichenem Geschlechterverhältnis für Männer (M) und Frauen (W) (5). Das Pankreaskarzinom liegt damit in der Statistik der Krebsneuerkrankungen in Deutschland an siebter/ sechster Stelle (M/W)(6). Das mediane Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 76 und bei Männern bei 72 Jahren (5, 6) Aufgrund der schlechten Prognose stellt das Pankreaskarzinom bei beiden Geschlechtern zurzeit die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar. Die Sterberate liegt bei Männern bei 21,9/100.000/Jahr bei Frauen bei 21,6/100.000/Jahr. Da sich Inzidenz und Sterberate ähnlich hoch präsentieren ist auch die 5-Jahresüberlebensrate sehr gering, sie beträgt für männliche Erkrankte neun Prozent für weibliche acht Prozent(6). 95 % der Pankreaskarzinome sind duktale Adenokarzinome (*pancreatic ductal adenocarcinoma* PDA), weshalb diesen die größte Bedeutung unter den Pankreaskarzinomen zugeschrieben werden kann(5).

1.2.2. HISTOPATHOLOGIE

Das PDA, als bedeutendste Entität unter den Pankreaskarzinomen, entsteht aus den Vorläuferläsionen *Pankreatische intraepiteliale Neoplasie* (PanIN), *Intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie* (IPMN) oder *Muzinös-zystische Neoplasie* (MCN). Die PanINs spielen hier eine besonders große Rolle, da für >95 % der PDAs eine Entwicklung aus diesen Vorläuferläsionen angenommen wird(7). Weitere Entitäten des Pankreaskarzinoms sind Zysteadenokarzinome und Azinuszellkarzinome sowie endokrine Tumoren, wobei letztere aus den Zellen der Langerhans-Inseln hervorgehen(5). Diese Entitäten sind mit insgesamt 10 % der Pankreaskarzinome sehr selten und stellen weiterhin eine sehr heterogene Gruppe dar(8).

Resektate von PDAs präsentieren sich als unscharf begrenzte, derb-weißliche Tumoren ohne größere Nekroseareale und/ oder Zysten. Mikroskopisch zeigen gut bis mäßig differenzierte PDAs eine Drüsenstruktur von heterogener Größe mit umgebendem desmoplastischem Stroma. Die Tumorzellen selbst sind PAS-positiv,

zylindrisch bis kubisch und einschichtig angeordnet(9). Intrapankreatisch zeigt sich eine ausgeprägte Infiltration des Parenchyms, häufig begleitet von einer perineuralen, lymphovaskulärer oder vaskuläre Invasion(10). Das duktale Adenokarzinom exprimiert karzinoembryonales Antigen (CEA) und Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA19-9), welche allerdings als Tumormarker nicht pankreasspezifisch sind. Immunhistochemisch lässt sich das PDA durch die Expression von Zytokeratin 7 (CK7), CK18, CK20, Mucin1 (MUC1) und MUC5AC charakterisieren. Diese sind allerdings ebenfalls nicht spezifisch für das PDA. Erst das Expressionsprofil erlaubt eine Differenzierung in Vergleich zu weiteren soliden Pankreastumoren wie muzinösen oder endokrinen Tumoren(9).

1.2.3. ÄTIOPATHOGENESE

Bei der Entstehung des PDAs werden zwei Ätiologien unterschieden, sporadisch und familiär/hereditär. Die meisten PDAs treten sporadisch auf, sie sind meist durch modifizierbare Risikofaktoren bedingt, welche im Verlauf zu erworbenen Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen führen. Das Auftreten von sporadischen PDAs ist eng mit dem Vorhandensein von spezifischen Risikofaktoren verknüpft(7). Zu diesen, meist modifizierbaren, Risikofaktoren zählt Nikotinkonsum als einer der wichtigsten Risikofaktoren(11). Raucher zeigen eine 74 % erhöhtes Risiko ein Pankreaskarzinom zu entwickeln(12). Viele im Zigarettenrauch enthaltene Substanzen wirken dabei als Karzinogene, welche auf das Pankreasgewebe einwirken, und eine DNA-Schädigung hervorrufen können. So wurde allein Nikotin über die Veränderung der Zellmorphologie oder des Zellstoffwechsels eine DNA-Schädigung und folglich Förderung von Mutationen nachgesagt(13). Neuere Publikationen bezeichnen Nikotin nicht mehr als ein Kanzerogen, durch die suchterzeugende Wirkung, wird jedoch die Aufnahme verschiedener anderer Karzinogene über den Zigarettenrauch gefördert(14). Exzessiver Alkoholkonsum von mehr als 30 g Alkohol pro Tag erhöht das relative Risiko an einem PDA zu erkranken um 22 %. Ursächlich ist hierbei vor allem die Entstehung von Pankreatitiden, die durch die häufig chronische Inflammation zu DNA-Schäden mit kanzerogenem Potenzial führen(15). Die chronische Pankreatitis als eigenständiger Risikofaktor ist mit einer 13-prozentigen Risikosteigerung für ein Pankreaskarzinom ebenso als ein relevanter Risikofaktor zu benennen. Durch die anhaltende entzündliche Gewebeschädigung kann es hierbei zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms kommen(16). Durch deine anhaltende Hyperglykämie und dem

damit vermehrt anfallenden "*advanced glycation end products*" kann es bei einem lange bestehenden und vor allem schlecht eingestellten Diabetes zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion des Pankreas kommen. Durch die dadurch ausgelösten Umbauvorgänge und Zellschädigung kann die Entstehung eines PDA begünstigt werden.(16, 17). So ist bei einem Diabetes mellitus Typ 1 die Erkrankungswahrscheinlichkeit bei einer Krankheitsdauer >10 Jahre um das 5–10-fache erhöht(18, 19). Bei Diabestes mellitus Typ 2 gilt die langjährige Erkrankung ebenfalls als Risikofaktor, das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken ist bei Diabetes Typ 2 um das 1,5 bis zweifache erhöht(20). Im Gegensatz dazu ist ein neu aufgetretener Diabetes oft ein Warnzeichen, welches auf ein Pankreaskarzinom hindeuten kann. Übergewicht wird weiterhin als Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gesehen. Menschen mit Übergewicht haben ein um das 1,6 fache erhöhtes Risiko im Vergleich zu normalgewichtigen Personen(16, 21). Eine Zunahme des BMI um fünf kg/m^2 erhöht dabei das Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken um 12 %(22). Hereditäre Karzinome machen circa zehn Prozent der Fälle aus, dabei kann die Erkrankungsentstehung bestimmten Mutationen und Tumorsyndromen zugeordnet werden. Diese werden in betroffenen Familien häufig weitervererbt. Das Erkrankungsrisiko ist bei Erkrankung eines erstgradig Verwandten bereits 9-fach erhöht, bei drei erstgradig Verwandten ist das Risiko zu erkranken um das 32-fache erhöht. Eine große Rolle spielen dabei die erblichen Tumorsyndrome wie Lynch-Syndrom (HNPCC), Peutz-Jeghers Syndrom und das Familiäre atypische multiple Melanom Syndrom sowie die Hereditäre Pankreatitis(23, 24). Durch Mutation in *KRAS,* Cyclin Dependent Kinase Inhibitor *(CDKN2A (p16)),* tumor protein 53 *(TP53),* SMAD family meber 4 *(SMAD4)* kommt es primär zur Ausbildung von Vorläuferläsionen, die sich durch Anhäufung weiterer Mutationen zu einem PDA entwickeln können. Die Entwicklung dieser Vorläuferläsionen folgt meist einem festen Schema. Nach initialer Telomerverkürzung, sowie *KRAS* und *p16* Mutation kommt es im Verlauf zum Verlust von *TP53* und *SMAD4* und im weiteren zur Entwicklung eines PDA(25). Dabei wird das Auftreten von Mutationen im *KRAS* in 47-81 % beobachtet und zählt damit zu den häufigsten Mutationen in der Entwicklung des PDAs. Nachfolgende *p53* Mutationen werden etwa bei 50 % der PDAs beobachtet, simultan werden in 55 % der PDAs Mutationen im *SMAD4* gefunden.

1.3. KLINIK UND THERAPIE

1.3.1. SYMPTOMATIK

Bei Betrachtung der Symptomatik des Pankreaskarzinoms ist es sinnvoll eine Unterscheidung zwischen Frühsymptomen und Spätsymptomen vorzunehmen. Spezifische Frühsymptome, die auf ein PDA hindeuten, treten bei vielen Patienten nicht auf. Sofern das PDA in einem frühen Tumorstadium zu Symptomen führt, so handelt es sich meist um unspezifische Beschwerden wie Meteorismus, Übelkeit und Erbrechen, sowie Bauch- und Rückenschmerzen. Obwohl diese Frühsymptome oft schon mehr als sechs Monate vor definitiver Diagnosestellung auftreten, führen diese im ambulanten Setting nur selten zur Veranlassung einer Schnittbildgebung und somit nicht zu einer frühzeitigen Diagnose(26). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung präsentieren sich die Patienten oft mit Gewichtsverlust, progredienten abdominellen Beschwerden mit Ikterus durch Okklusion des Ductus choledochus und Lethargie. Ein Verschlussikterus ist dabei ein häufiges Leitsymptom für ein Pankreaskarzinom im fortgeschrittenen Stadium. Auch ein neu aufgetretener Diabetes mellitus sollte als Warnsymptom für ein PDA beachtet werden, da bis zu 22 % der PDA-Patienten an einem neu aufgetreten Diabetes mellitus leiden (26, 27). Durch die teils unspezifische Symptomatik erfolgt die Diagnosestellung oft spät und bei 80-85 % erst zu einem Zeitpunkt, an dem eine operative Resektion nicht mehr möglich ist(27). Es zeigt sich, dass die Diagnose in frühen Tumorstadien essenziell für eine gute Prognose der Erkrankung ist. Bei weiterhin steigenden Inzidenzen ist somit eine frühe bildgebende Untersuchung notwendig, um eine Diagnose in einem frühen Tumorstadium zu ermöglichen(22, 27).

1.3.2. DIAGNOSE

Bei neu aufgetretenen Bauch-/ oder Rückenschmerzen, welche aufgrund ihrer Lokalisation auf ein Pankreaskarzinom hindeuten und wenn ein gewisses Risikoprofil gegeben ist, sollte die Abklärung der Beschwerden mit einem bildgebenden Verfahren erfolgen. Hier ist als primäre Untersuchungsmethode zunächst die Sonografie empfohlen(5). Bei weiterem Verdacht schließt sich die Bildgebung mit Endosonografie (EUS), Computertomografie (CT), MRT in Kombination mit einer Magnetresonanz-Cholangiopankreatikografie (MRCP), sowie die endoskopisch retrograde Cholagiopankreatikographie (ERCP) an. Je nach Verfügbarkeit sollte auch eine

Kombination der Verfahren durchgeführt werden. Die Verfahren mit der höchsten Sensitivität sind hier die Multidetector-CT (90 %) und die MRT (93 %), welche in Kombination mit einer MRCP durchgeführt wird. Die Sensitivität unterscheidet sich hier allerdings stark nach Tumorstadium und Tumorgröße. Für frühe Tumorstadien ist die EUS mit 43 % die sensitivste Methode. Mittels EUS lassen sich bereits Tumoren mit einer Größe von zwei bis drei Millimeter darstellen, wohingegen MRT und CT hier mit Ortsauflösungen in dieser Größenordnung an ihre Grenzen stoßen. Zur Beurteilung der lokalen Krankheitsausdehnung sollte neben der EUS eine weitere Schnittbildgebung erfolgen(22). Die Durchführung einer ERCP erlaubt nur die Darstellung von Veränderungen des Ganges, eine direkte Darstellung des Tumors gelingt nicht. Deshalb sollte hier immer die Kombination mit CT oder MRT erfolgen. Bei der Durchführung einer ERCP kann, bei einer Stenose des Gallengans, allerdings direkt eine therapeutische Stenteinlage erfolgen(5). Für die thorakoabdominelle Ausbreitungsdiagnostik ist eine CT- oder MRT- Untersuchung indiziert. Präoperativ ist immer eine Kombination aus CT (Thorax, Abdomen, Becken) und Endosonografie empfohlen. Bei geplanter Resektion sollte zusätzlich ein MRT der Leber mit Diffusionswichtung zum Ausschluss von Metastasen durchgeführt werden.
Die Bestimmung des Tumormarkers CA19-9 sollten bei Verdacht oder Nachweis eines Pankreaskarzinoms erfolgen. Dies ermöglicht einerseits die Detektion von Rezidiven nach Resektion sowie andererseits die Evaluation des Therapieansprechen unter Chemotherapie. (5). Sehr hohe CA19-9-Konzentration können zudem auf eine in der Bildgebung nicht detektierbare erhöhte Tumorlast hindeuten und somit Anlass zur Staging-Laparoskopie zur Klärung der Resektabilität geben. Da CA19-9 jedoch weder organ- noch tumorspezifisch ist, eignet es sich wie alle Tumormarker, nicht für Screening-Zwecke. Eine primäre Histologiegewinnung mittels Endosonografie sollte nur erfolgen, falls dies eine Änderung der Therapie nach sich ziehen würde, beispielsweise bei Verdacht auf eine Metastase eines weiteren Karzinoms in der Anamnese(5). Vor Einleitung einer Chemotherapie sollte hingegen in jedem Fall eine histologische Sicherung erfolgen.

1.3.3. THERAPIE

In der Therapie des Pankreaskarzinoms muss zwischen palliativer und kurativer Therapie unterschieden werden. Der einzige kurative Therapieansatz ist die vollständige Resektion des Tumors, bezeichnet als R0-Resektion. Erweist sich das

Karzinom im Staging als resektabel, sollte die Resektion bei einem ECOG Stadium ≤ 2 unabhängig des Patientenalters durchgeführt werden(5). Bezüglich der Resektabilität kommen die anatomischen Kriterien des *National Comprehensiv Cancer Networks (NCCN*) zur Anwendung. Es wird unterschieden zwischen resektabel, borderline resektabel, lokal fortgeschritten und metastasiert. Bei borderline resektablen Tumoren liegt ein lokal fortgeschrittenes Wachstum mit Infiltration der versorgenden Gefäße vor, so dass meist eine Rekonstruktion von venösen Gefäßen erfolgen muss. Zeigt sich die Notwendigkeit, dass eine operative Rekonstruktion von arteriellen Gefäßen notwendig werden sollte, sollte von einer Operation abgesehen werden(28, 29). Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren mit Infiltration von Nachbarorganen wird eine Resektion bei Möglichkeit der R0-Resektion dennoch empfohlen(5). Das Vorhandensein von Fernmetastasen und ein lokal fortgeschrittener Tumor schließt die primäre Resektion aus. Bei primärer Resektabilität wird keine neoadjuvante Vorbehandlung empfohlen. Bei borderline resektablen Tumoren wird eine neoadjuvante Vorbehandlung mit Chemotherapie mit entweder FOLFIRINOX (Oxaliplatin, Irinotecan, 5-Fluorouracil und Folinsäure) oder Gemcitabin und Nanopartikel-Albumin-gebundenes Paclitaxel (nab-Paclitaxel) empfohlen. Auch eine Radiochemotherapie (RCT) kann in solchen Fällen durchgeführt werden, prognostisch entscheidend ist dabei ob eine R0-Resektion gelingt, nach R0-Resektion ist eine deutlich höhere 5-JÜR möglich(30).

Bei Tumorlokalisation im Pankreaskopf erfolgt die partielle Duodenopankreatektomie, je nach Infiltrationsausmaß erfolgt die Operation dabei pyloruserhaltend (OP nach Traverso-Longmire) oder mit Resektion des Pylorus (OP nach Whipple). Bei weit fortgeschrittener Erkrankung kann eine totale Pankreatektomie notwendig werden. Bei Pankreasschwanzkarzinom erfolgt die Pankreaslinksresektion und bei Tumor im Pankreaskorpus erfolgt die subtotale Pankreaslinksresektion und gegebenenfalls die totale Duodenopankreatektomie. Bei jeder dieser Operationen sollten mindestens 12 Lymphknoten entnommen und histologisch untersucht werden, eine erweitere Lymphadenektomie sollte allerdings nicht durchgeführt werden(5).

Nach R0-Resektion im UICC-Stadium I-III und ECOG 0-2 sollte eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Diese wird acht Wochen postoperativ begonnen und über sechs Monate durchgeführt. Bei ECOG 0-1 soll diesen mit mFOLFIRINOX erfolgen. Bei Patienten unter 80 Jahren gelang es damit das mediane Überleben auf 54 Monate zu verbessern (PRODIGE24/ ACCORD 24 Studie(31)). Bei ECOG 2

Patienten erfolgt die Therapie mit Gemcitabin. In der ESPACE-4-Studie konnte bei diesen Patienten die mediane Überlebenszeit auf 28 Monate verlängert werden(32).
Ist der Tumor lokal fortgeschritten und eine Resektion nicht möglich, sollte eine primäre Chemotherapie erfolgen. In 30 % zeigt sich hier eine Tumorresponse auf FOLFIRINOX, alternativ ist eine Therapie mit Gemicitabine + nab-Paclitaxel möglich. Nach sechs Monaten erfolgt ein *Re-Staging* und falls möglich eine operative Resektion(5).
Patienten mit einem inoperablen oder metastasierten Tumorleiden, sollte bei ECOQ 0- 2 eine palliative Chemotherapie angeboten werden, da diese eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung der Lebensqualität ermöglicht(33). Bei einem Nachweis von Metastasen sollte diese Therapieoption möglichst zeitnah begonnen werden. Bei gutem Performancestatus erfolgt die Therapie mit FOLFIRINOX, oder Gemcitabin + nabPaclitaxel. Bei reduzierten Allgemeinzustand erfolgt die Therapie mit Gemicitabin in Kombination mit Erlotinib oder als Monotherapie. Es konnte gezeigt werden, dass mit einer Therapiedauer von sechs Monaten ein Gesamtüberleben von 11,1 Monaten (FOLFIRINOX) bzw. 6,8 Monate für Gemcitabin mono erreicht werden konnte(34, 35).

1.4. METASTASIERUNG

1.4.1. GRUNDPRINZIPIEN DER METASTASIERUNG

Metastasierung bezeichnet die Lösung von Tumorzellen aus dem Zellverband des Primärtumors gefolgt von deren Fortleitung über Blut- und Lymphbahnen oder durch Körperhöhlen und abschließender Bildung weiterer Tumorabsiedlungen, sogenannten Metastasen, in weiteren Organen. Generell gilt, dass die Metastasierung der Tumoren einen wesentlichen Einfluss auf die Behandlung und die Prognose der Tumorerkrankung hat (36-38). Im Falle des metastasierten PDAs führt eine Resektion des Primärtumors nicht zur Verbesserung der Prognose. Auch das Ansprechen von Systemtherapien auf die Metastasen ist durch die Anreicherung von Mutationen und Selektion besonders aggressiver Subpopulationen oft geringer ausgeprägt (39). Durch diese Escape-Mechanismen kommt es zum geringeren Ansprechen der eingeleiteten Chemotherapien(40, 41).
Der Prozess der Metastasierung ist komplex und folgt einem Schema aus mehreren Schritten, die von den Tumorzellen in einer festgelegten Reihenfolge, auch

metastatische Kaskade genannt, durchschritten werden(36). Um eine Metastasierung zu ermöglichen, braucht es zunächst einen fortschreitend wachsenden Primärtumor, welcher über einen Anschluss zum Blut- oder Lymphgefäßsystem verfügt. Durch Migration einzelner Tumorzellen aus dem Tumorverband in das umgebende Gewebe und eine Invasion von dünnwandigen Venen und Lymphgefäßen, gelangen Tumorzellen in den Kreislauf.

Um eine Ablösung aus dem epithelialen Karzinomverband zu ermöglichen, bedürfen die Zellen einiger struktureller und metabolischer Veränderungen, um sich im umgebenden mesenchymalen Gewebe und in die Blut- und Lymphbahnen zu bewegen. Diese Zellveränderungen werden unter dem Begriff Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) zusammengefasst. Charakteristisch für mesenchymale Zellen ist die eher lockere Anordnung mit gering ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten und die Einbettung in die extrazelluläre Matrix, welche sie durchwandern können. EMT spielt nicht nur in der Tumorpathologie eine Rolle, sondern auch in vielen physiologischen Vorgängen wie in der Embryo- und Organogenese, Gewebshomöostase und bei Reparaturvorgängen. Ausgelöst werden diese Veränderungen durch eine Vielzahl von parakrinen Signalwegen, deren Mediatoren bei Karzinomen durch Zellen des Tumorstromas ausgeschüttet werden. So führt ein *Wnt-Signal* über den Membranrezeptor (F*rizzled and low-density lipoprotein receptor-related protein receptor)* zur Hemmung des Tumorsuppressorgens *APC* (*adenomatous polyposis coli gene)* und dadurch zur Phosphorylierung und Stabilisierung von beta-Catenin, welches als Transkriptionsfaktor dient und die Transkription von EMT-spezifischen Proteinen aktiviert(42). In vielen Tumoren ist der Wnt-Signalweg durch eine Mutation aktiviert und löst durch die Transkriptionsfaktoren *SNAIL* und *SLUG*, die Proteinsynthese und EMT aus (43, 44). Ein anderer Mechanismus führt über den NOTCH Signalweg zur Expression von Vimentin, einem mesenchymalen Marker der EMT-Regulation (45). *SNAIL* führt über ein Zusammenspiel mit *tumor growth factor beta* (TGF-beta) und SMADs zu Induktion der EMT. Dies hat eine Steigerung der Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) zur Folge, welche durch eine Degradation der extrazellulären Matrix zur Migration der Zellen beitragen. Genau wie *SNAIL* und *SLUG* gehört auch *TWIST1/2* zur Familie der *basic helix-loop-helix* Transkripitionsfaktoren. *TWIST* kann durch den Hypoxie-induzierten-Faktor 1-alpha (HIF-1a) aktiviert werden und fördert ebenso die EMT und Metastasierung. Neben den mediatorvermittelten

Signalwegen können durch DNA-Methylierung bedingte epigenetische Veränderungen die EMT beeinflussen(46). So führen beispielsweise Histonmodifikationen oder Veränderung der Nukleosomen zu Veränderungen der Genexpression (47, 48). Auch microRNAs spielen in der Regulation der EMT und auch der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) durch Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren *SNAIL, SLUG* und *TWIST* eine Rolle(49).

Die für die Metastasierung erforderliche Beweglichkeit der Zellen wird durch Veränderungen im Aktinskelett ermöglicht. Es bilden sich Lamellopodien und Filopodien, welche durch Aktin-regulierende Proteine wie den Arp2/3 Komplex, Fascin und VASP gesteuert werden(50). Bei Karzinomzellen werden diese Ausstülpungen des Zytoskelettes häufig auch als Invadopodien bezeichnet, diese unterliegen der Regulation durch N-WASP und Arp2/3(50). Durch diese Ausstülpungen der Zellmembran, die in eine Richtung aufgebaut werden, und anschließendem „Nachziehen“ der Zellorganellen und Membran an den gebildeten Zytoskelettstrukturen entlang kommt es zur Bewegung der Zelle.

Tumorzellen, welche sich nach Intravasation im Gefäßsystem befinden, werden auch *circulating tumor cells* (CTC) genannt. Diese haben eine durchschnittliche Halbwertszeit von ca. 2,4 Stunden(51). Umstellungen des Zellstoffwechsels und Anpassung an die neue Umgebung führen zu gesteigertem Überleben und zur Steigerung der metastatischen Aussaht der Zellen(52). Die Umstellung des Zellstoffwechsels als sogenannte „*Hallmark of Cancer*“ bedeutet im Rahmen der Metastasierung eine Anpassung an das vorherrschende *microenvironment,* um den Zellstoffwechsel an die neue Umgebung bestmöglich anzupassen. Beispielhaft sind hier der Warburg-Effekt und der Mevalonatweg zur Energiegewinnung zu nennen(52). Nur wenige der CTC vollziehen diese Anpassung und bilden Organmetastasen. CTCs können durch Anpassungsvorgänge den Zelltod in der Zirkulation verhindern. Ein wichtiger Mechanismus ist hier die Resistenz gegen Anoikis, den Zelltod nach Verlust von Interzellularkontakten. Dabei bleiben die Zellen, TGF-beta vermittelt, in einem EMT-Status, verbinden sich mit Integrinen zu fokalen Adhäsionen und vermeiden so die Anoikis(53). Ferner können hohe Scherkräfte, wie sie CTCs im arteriellen System erfahren, zum Zelltod führen(54). Signale der CTC, wie die Präsentation von *tissue factor,* führen zu einer Aggregation von Thrombozyten um die Zellen und so zu einem Schutz vor mechanischem Stress und der körpereigene Immunabwehr (55-58).

Um der Bekämpfung durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu entgehen, umgeben sich die CTSs zusätzlich mit immunsuppressiven Zellen, wie Granulozyten und Thrombozyten. Auch nach der erfolgten EMT können die CTCs durch Zell-Zellkontakt vermittelte Clusterbildung einer Zerstörung durch NK-Zellen entgehen(42, 59).
Im venösen und Kapillarsystem führen die verminderte Fließgeschwindigkeit und die Scherkräfte, welche durch den Kontakt zu den Gefäßwänden entstehen, dazu, dass die Extravasation der Zellen gefördert wird(54). Man spricht dabei auch vom *homing* der Zellen. Dabei kommt es zunächst zum *tethering*, durch ein lockeres, reversibles Anheften der Zellen an das Gefäßendothel wird die Tumorzelle im Blutstrom verlangsamt und die nächsten Schritte werden ermöglicht. Durch die lockere Bindung des *tetherings* kann die Tumorzellen am Endothel entlang rollen (*rolling*) und dadurch an besonders geeignete Endothelbereiche gelangen. An diesen Bereichen erfolgt dann eine feste Bindung (*adhesion*) und die Zelle kann in das darunter liegende Gewebe gelangen (*transmigration*). Alternativ kann es durch Embolisation zu einem kompletten mechanischen Stillstand kommen und die Extravasation der Zellen wird ermöglicht(60). Durch Ausschüttung von Mediatoren, wie *TGF*-beta und *vascular endothelial growth factor* (VEGF), wird die Barrierefunktion des Kapillarendothels herabgesetzt und das Gefäßsystem permeabel für die Zellen(57, 61). Durch direkte oder indirekte Interaktion der CTCs mit den Endothelzellen der Gefäße, speziell über die Glykocalyx, kommt es organspezifisch, man spricht hier auch vom Organtropismus, zur möglichen Adhäsion über Integrin und CD44(62-64). Auch hier spielt die Ausbildung von Invadopodien eine Rolle um die Migration der Zellen und die Absiedelung im Stroma des Zielorgans zu ermöglichen (65). Nur 0,01 % der zirkulierenden Tumorzellen entgehen der Immunabwehr und schaffen es das Gefäßsystem zu verlassen und sekundäre Metastasen zu bilden(66, 67). Hier spielt der Organtropismus eine entscheidende Rolle. Die *seed and soil*- Theorie, welche von Paget 1889 postuliert wurde(68), besagt, dass die Bildung von Organmetastasen sehr von den Stoffwechsel- und Stromaeigenschaften des Zielorgans, dem sog. *microenvironment*, abhängt(69). Durch Ausschüttung von Mediatoren führen Metastasen-assoziierte Makrophagen (MAMs) häufig zu einer Modifikation des *microenvironments* von Zielorganen und fördert dadurch die Kolonisation und Metastasierung durch CTCs. MAMs führen beispielsweise beim Mammakarzinom zur Expression von Chemokinligand 2 (CCL2) und zur weiteren Invasion von Tumor-assoziierten Makrophagen, welche durch Sekretion weiterer Chemokine zum

Überleben und Anwachsen von metastatischen Zellen führen(70-72). Bei Betrachtung des Immunsystems im Kontext der Metastasierung spielen auch Makrophagen eine bedeutende Rolle. Diese können pro- und antimetastatisch wirken. M2-Makrophagen, auch alternativ aktivierte Zellen genannt, fördern die Tumorzellproliferation, Angiogenese, Invasion, Metastasierung sowie den Immunescape der Tumorzellen(73, 74). Diese werden über den Chemokinrezeptor 2 (CCR2) aktiviert. M1-Zellen fungieren als Gegenspieler zu den M2-Zellen und hemmen diese, weiterhin wirken sie über die Rekrutierung von T-Zellen antikanzerogen(74). Entzündliche Prozesse spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Auch im Fall der Metastasierung konnte gezeigt werden, dass *nuclear factor kappa B* (NFkB) über den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und die Rekrutierung von immunsuppressiven Granulozyten fördert und über diese Entzündungsreaktion die Metastasierung begünstigt(75-77). So fördert eine Entzündungsreaktion des Körpers teils das Tumorwachstum oder die Metastasierung. Für das Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass durch die operative Resektion und die damit einhergehende Entzündung ein Progress von Mikrometastasen in der Leber verursacht werden kann(78).

1.4.2. METASTASIERUNG DES PANKREASKARZINOM

Ein entscheidendes Prognosekriterium beim Pankreaskarzinom ist die frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung. Oft kommt es zu einer frühen Metastasierung *per continuitatem*, so dass sich eine ausgeprägte Peritonealkarzinose entwickeln kann. Die hämatogene Metastasierung erfolgt über das Pfortadersystem zunächst in die Leber, später können sich Lungen und Knochenmetastasen entwickeln. Das PDA bedient sich vieler der für die Metastasierung bekannten Signalwege. Die im PDA meist vorkommende *KRAS*-Mutation ist durch gesteigerte Invasivität und Metastasierung mit einer schlechteren Prognose assoziiert(79). Die über 80 nachgeschalteten Signalwege, wie beispielsweise *PI3K-mTOR*, die MAPK-Kinase (MEK) sowie die Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren wie *cMYC* führen zur gesteigerten Differenzierung, Proliferation, Migration, Transformation, Adhäsion und zum gesteigerten Überleben der zirkulierenden Zellen in der Peripherie(80).
Darüber hinaus haben KRAS-Mutationen Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. So kommt es durch die Mutation zu einer Triggerung des Warburg-Effektes und zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)(79, 81). Für diese ROS-Moleküle

wurde in Kombination mit TGF-beta ein modifizierender Effekt auf die Metastasierung und das Tumorwachstum beschrieben. Die Effekte, welche hier zu einem vermehrten Tumorwachstum führen, sind dabei über eine Aktivierung von ERK vermittelt. In weiterer Folge kommt es zur Hochregulation von CDK2 und der EMT(82). Vor allem in späteren Tumorstadien wurde hierrüber für *tumor growth factor beta* (TGF-beta) und ROS ein prometastatischer Effekt nachgewiesen (82-84). Die EMT spielt somit auch in der Metastasierung des PDAs eine zentrale Rolle, welche durch verschiedene Wege gesteigert werden kann. Durch nukleäre Transkriptionsfaktoren, wie Tenascin C und Kollagen V, konnte ein Einfluss auf die EMT beobachtet werden. Für Tenascin C konnte eine gesteigerte Expression im Krankheitsverlauf in Korrelation zu gesteigerter Invasivität gezeigt werden(83, 85). Dabei kommt es über Tenascin C zu einer gesteigerten Expression von TGF-beta und Interleukin-4 (IL-4)(85-87). Auch Phospholipide wie LPA scheinen einen großen Einfluss auf die Invasivität und Metastasierung verschiedener gastrointestinaler Tumoren, wie dem Pankreaskarzinom zu haben. Dabei spielen verschiedene Signalwege die durch unterschiedliche Rezeptoren beeinflusst werden eine Rolle(88).

1.5. Tiermodelle des Pankreaskarzinoms

1.5.1. Chemische Induktion

Die chemische Induktion des Pankreaskarzinoms im Tiermodell spielt heutzutage nur noch eine untergeordnete Rolle. Durch Injektion von N-nitroso (2-oxopropyl)amin lässt sich in syrischen Goldhamstern die Entstehung von Pankreaskarzinomen auslösen. Zur Etablierung muriner Pankreaskarzinommodelle ist N-nitroso (2-oxopropyl)amin jedoch aufgrund der unspezifischen multilokulären karzinogenen Wirkung ungeeignet. Bei Mäusen entstehen überwiegend Malignome von Lunge und Leber(89). Eine weitere Methode der chemischen Induktion ist die Injektion von 4-Hydroxyaminoquinolin-1-Oxid, wodurch in Ratten, Hamstern und Meerschweinen die Induktion von unter anderem Adenomen und Adenokarzinomen der Azinuszellen beobachtet werden konnte. Die induzierten Tumorenspiegeln damit allerdings nicht die im Menschen am häufigsten vorkommenden duktalen Adenokarzinome wider und sind daher als präklinisches Modell eher ungeeignet(90).

1.5.2. GENETISCHE MODELLE

Bei den genetischen veränderten Tiermodellen (*genetically engineered mouse models* (GEMMs) des Pankreaskarzinoms liegt eine genetische Manipulation eines Onkogens oder eines Tumorsuppressorgens vor. Je nach verändertem Gen kommt es zur Entwicklung kanzeröser oder präkanzeröser Läsionen im Pankreas oder anderen Organen. Häufig wird hierfür das *Cre/loxP* System verwendet. Die Rekombinase Cre katalysiert im Bereich der *loxP* -Erkennungssequenzen eine Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Strängen (91). Abhängig von der Ausrichtung der loxP-Sequenz wird eine Deletion, Translokation oder Inversion des Zielgenes bewirkt. Durch die Verpaarung von Mäusen mit Cre-Expression und solchen, die das zu untersuchende Zielgen flankiert von *loxP*-Sequenzen („gefloxtes Gen“) tragen, entstehen in der F1-Generation Tiere, bei denen das zu untersuchende Gen gezielt verändert ist. Die Kombination von Cre mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren erlaub hierbei die spatiotemporale Genaktivierung bzw. -inaktivierung

Die im humanen Pankreaskarzinomen häufig vorkommenden *KRAS*-Mutationen finden auch in vielen GEMMs Anwendung. Ein weit verbreitetes und wissenschaftlich gut untersuchtes Modell ist das KPC-Mausmodell (LSL-$Kras^{G12D/+}$;LSL-$Trp53^{R172H/+}$;Pdx-1-Cre). Hierbei wird durch die Rekombinase *cre* eine aktivierende *KRAS*-Mutation und ein mutiertes p53 Allel im Pankreas exprimiert. Dieses Modell weist viele Ähnlichkeiten zur humanen Erkrankung auf. So zeigen die Tumoren ein ähnliches Verhalten in Hinblick auf Invasivität und Metastasierung, wodurch sich das Modell zur Evaluation verschiedener Immun- und Chemotherapien eignet(92-94).

Ein anderes häufig genutztes Modell ist das der LSL-$Kras^{G12D/+}$;$Tgfbr2^{flox/flox}$;$pft1a^{Cre/+}$Maus. Neben einer aktivierenden *KRAS*-Mutation führt die zusätzliche Deletion des TGF-beta-2 Rezeptorgenes im Pankreasepithel zur Entwicklung hoch aggressiver PDAs(95). Weitere Modelle wie das LSL-$Kras^{G12D/+}$;$Dpc4^{flox/flox}$;Pdx-1-Cre, beinhalten neben der *KRAS*-Mutation eine Mutation in *SMAD-4*, was zu einer Unterbrechung der TGF-beta-Kaskade führt(96). Ein weiteres Modell mit einer sehr aggressiven Tumorentwicklung, welches in den Eigenschaften dem humanen PDA recht ähnlich ist und sich mit invasivem Wachstum präsentiert, hat die Bezeichnung LSL-$Kras^{G12D/+}$;$Ink4a/Arf^{flox/flox}$;Pdx1-Cre, auch hier liegt eine Mutation des *Kras* vor. Des Weiteren kommt es zu einer Mutation im *p16/p19*-Gen und im Folgenden zur Entwicklung eines PDAs(94).

Im humanen PDA entstehen durch verschiedene Mutationsschritte in verschiedenen Zellen sehr heterogene Tumore, welche auch innerhalb des Tumors ein sehr heterogenes Ansprechen auf Chemo- und Immuntherapie zeigen. In GEMMs verfügen alle Pankreaszellen ab einem frühen Entwicklungsstadium über die Mutationen in Onkogenen und/ oder Tumorsuppressorgenen. Durch diese Eigenschaft ist es möglich, die Auswirkungen der einzelnen Mutationen im Krankheitsverlauf sehr gut nachzuverfolgen(97). Nachteile der genetischen Modelle sind einerseits die hohen Kosten für die Entwicklung, anderseits die Unterschiede zur humanen Erkrankung. Bei der humanen Erkrankung treten meist in höheren Alter Mutationen in einzelnen Zellen auf, was im Verlauf zu einer Tumorentwicklung führt. Bei den GEMMs betreffen die Mutationen viele Pankreaszellen, was zu einer frühen und homogenen Tumorentwicklung führt und damit im Kontrast zur humanen Erkrankung steht(98).

1.5.3. TRANSPLANTATIONSMODELLE

Zunächst entscheidet man bei den Transplantationsmodellen zwischen der Herkunft des transplantierten Gewebes. Syngenes Gewebe ist Gewebe, welches artgleich und genetisch identisch ist. Wird aus einem GEMM Tumorgewebe entnommen und einer Maus des gleichen Stammes ohne transgene Modifikation implantiert, spricht man von einem syngenen Modell. Von einem xenogenen Modell spricht man hingegen, wenn Gewebe oder Zellen einer anderen Spezies transplantiert werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Implantation von humanen Zellen in Mäuse. Die hierdurch hervorgerufene Immunantwort lässt sich durch immuninkompetente Empfängertiere umgehen, sodass es zu einer Tumorausbreitung und Metastasierung kommen kann(99-101).

Einerseits ist es möglich Tumorzellen als Zellsuspension in das Gewebe des Empfängertiers zu implantieren, andererseits ist es auch möglich ganze Gewebestücke zu transplantieren. Diese Tumorfragmente werden Patienten entnommen und dann in immuninkompetente Tiere implantiert, man spricht hier von *patient-derived xenografts* (PDX). Da hierbei die (molekular-) pathologischen Charakteristika des Spendertumors weitgehend erhalten bleiben, eignen sich diese gut zur Evaluation präklinischer Therapie und Chemoresistenz(102, 103). Eine Weiterentwicklung dieses Modells führte zur Injektion von Tumorstammzellen, eingebettet in ein Gerüst aus Polycarbonat und Gelatine, was ein besseres Tumorwachstum und eine noch höhere Ähnlichkeit zum humanen Karzinom erbrachte(104).

Weiterhin wird unterschieden zwischen subkutaner und orthotoper Implantation.
Subkutane Karzinommodellen überzeugen durch eine leichte Durchführbarkeit und ein einfaches Monitoring des heranwachsenden Tumors. Verwendet werden meist immunsupprimierte Mäuse, um eine Immunreaktion gegen das transplantierte Gewebe zu minimieren, dabei gilt: Je ausgeprägter die Immunsuppression des Tieres, desto eher kommt es zu einer suffizienten Tumorentwicklung. Nach subkutaner Injektion oder Implantation kann das Tumorwachstum direkt beobachtet und händisch mittels Messschieber quantifiziert werden. Die Limitation des Tumormodells besteht in der nicht natürlichen Umgebung des Tumors. Es findet keine vergleichbare Interaktion des Tumorgewebes mit dem eigentlichen Zielorgan, dem Pankreasgewebe statt(105). Auch wenn die Vaskularisation und Organstruktur nicht der eigentlichen Erkrankung entsprechen, ist die Evaluation neuer Therapien durch beispielsweise Chemotherapeutika an diesem Modell doch sehr gut möglich(98).
Bei der orthotopen Zellinjektion wird die Tumorzellsuspension direkt in das Pankreas des Versuchstiers injiziert. Bei korrekter Injektion ohne Verschleppung von Tumorzellen, zeigen sich die Tumorausbreitung und Metastasierung analog dem humanen PDA. Die Interaktion der Tumorzellen mit dem umgebenden Pankreasgewebe, welche als wichtiger Faktor der Tumorprogredienz und Metastasierung bekannt ist, findet ebenso vergleichbar zum natürlichen Erkrankungsverlauf statt. Im Vergleich zu subkutanen Modellen zeigt sich bei der orthotopen Injektion die Beeinträchtigung von Nachbarorganen wie Darm oder Leber durch invasives oder verdrängendes Wachstum. Dies entspricht zwar einerseits dem eigentlichen Krankheitsprozess, andererseits führt es zu vermehrten Komplikationen und zum Ausscheiden von Versuchstieren aus dem Versuch. Ein weiterer Nachteil des Modells gegenüber dem subkutanen Modell besteht in einem erschwerten Monitoring des Tumorwachstums. Neben der Evaluation des Gesundheitszustandes lässt sich die Tumorprogredienz lediglich mittels bildgebender Verfahren darstellen. Anwendung findet hier meist die Magnetresonanztomographie. Jedoch werden auch neuere fluoreszenz- oder biolumineszenzbasierte Verfahren eingesetzt, welche bei entsprechend modifizierten Tumorzellen zumindest eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Tumorgewebe liefern können. Dafür wird den entsprechenden Tumorzellen ein zusätzliches Fluoreszenzgen, wie beispielsweise das *red fluorescent protein* (RFP), implementiert. Im weiteren Verlauf können diese Zellen *in vivo* durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Beim Verfahren der Biolumineszenz

wird den Tumorzellen ein Luciferase-Gen zugefügt und zu einem definierten Zeitpunkt vor der Untersuchung den Tieren das Substrat Luciferin injiziert. Die ablaufende Oxidation, welche durch die Luciferase katalysiert wird, führt zur Freisetzung von Photonen(106). Diese Photonenemmission lässt sich als Lumineszenz-Signal der Tumorzellen mit einem Detektor sichtbar machen und anhand der Ausprägung des Signals eine Aussage über die Tumorausbreitung treffen(107, 108). Gemein ist diesen Verfahren, dass die Tiere, um eine Durchführung der Untersuchung zu gewährleisten, narkotisiert werden müssen. Dies ist mit einem Mehraufwand und einem erhöhten Risiko für die Versuchstiere verbunden.

1.6. Tiermodelle für die Evaluation der Metastasierung

1.6.1. Prinzipien

Um die Mechanismen der Metastasierung zu erforschen und auch um neue Therapeutika zu evaluieren, bedarf es eines zuverlässigen Tiermodelles. Dieses Tiermodell sollte die natürliche Pathogenese möglichst genau abbilden können und besonders zur Evaluation von Therapeutika gut etabliert sein, um den Einfluss der Behandlung suffizient beurteilen zu können. Ein wichtiges Kriterium für die Güte des Tiermodells ist die frühzeitige Metastasierung, noch bevor es durch das Wachstum des Primärtumors zu Lokalkomplikationen mit einem konsekutiven Ausscheiden der Versuchstiere aus dem Experiment kommt. Um dies zu erreichen, wurden neben dem orthotopen Model mit spontaner Metastasierung auch Modelle entwickelt, bei denen zusätzlich durch Zellinjektion in den Blutkreislauf eine Metastasierung simuliert wird.

1.6.2. Metastasierungsmodelle

1.6.2.1. Via naturalis nach orthotoper Injektion

Von den oben genannten Tiermodellen ist die orthotope Injektion eine sehr gute Methode, um die Erkrankung möglichst realitätsnah abzubilden. Nach dem Anwachsen der Tumorzellen im Pankreas des Versuchstieres und damit verbundenem Größenwachstum des Tumors sowie Interaktion mit dem umgebenden Gewebe und auch Infiltration benachbarter Blut-/Lymphgefäße und Nerven kann es mit der Zeit zu einer spontanen Metastasierung*, via naturalis*, wie im natürlichen Krankheitsverlauf beim Menschen kommen(39, 109). Dieses Modell wurde vor der Entwicklung der genetischen Modelle, und auch heute noch, intensiv für die Erprobung neuer

Therapeutika genutzt(98, 110). Da nach orthotoper Injektion oder Implantation die Variabilität der Krankheitsprogression wesentlich geringer ist als bei GEMMs, vertreten einige Arbeitsgruppen die Hypothese, dass diese Modelle den GEMMs sogar überlegen sind(111). Neben der Verwendung syngener Zelllinien in immunkompetenten Tieren werden auch oft humane Zelllinien in immuninkompetenten Tieren injiziert(99-101). Die Verwendung immuninkompetenter Tiere verhindert, dass die humanen Zellen aufgrund ihrer Xenogenität vom Immunsystem beseitigt werden, bevor eine Metastasierung stattfinden kann.

1.6.2.2. SYSTEMISCHE TUMORZELLINJEKTION

Ein häufig angewandtes Modell zur Induktion hepatischer Metastasen ist die Tumorzellinjektion in die Milz der Versuchstiere. Durch die direkte venöse Drainage der Milz über die V. portae in die Leber, werden die Tumorzellen in die Leber eingeschwemmt und können sich hier im Sinne einer Metastasierung durch Invasion in das Lebergewebe festsetzten und Metastasen bilden. Bei Betrachtung der „*seed and soil*“ Theorie, welche bereits 1889 von Stephen Paget publiziert wurde(68), ist nicht nur die Bildung der freien Tumorzelle mit Lösung vom Tumorverband in das Gefäßsystem von enormer Wichtigkeit, sondern auch das *microenvironment* des Zielorgans, um dort eine Invasion der Zelle in das Gewebe und ein Heranwachsen als Metastase zu ermöglichen. Diese Theorie wurde 2008 von Fiedler und Kollegen (69) erneut aufgegriffen und findet inzwischen weitreichend Anerkennung. Da so die regelhafte Metastasierung bestimmter Tumoren in bestimmte Organe erklärt werden kann, während andere Organe, welche an den direkten Blut- oder Lymphabflusswegen liegen nicht von Metastasen betroffen sind(112-114). Mit der Leber als primäres Metastasierungsorgan des PDA im natürlichen Verlauf, bietet die Milzinjektion mit einer hohen Inzidenz von Lebermetastasen ein zuverlässiges Metastasierungmodell(98). Durch die direkte Injektion und die Menge der injizierten Tumorzellen ist nach Einschwemmung in das Lebergewebe ein Festsetzen in den Leberkapillaren und die Bildung von Metastasen begünstigt. Auch wenn dies ein Vorteil des Modells ist, gibt es doch auch Einschränkungen. Die Zellen, die injiziert werden, haben den pathophysiologisch relevanten Teil der EMT und die Ablösung aus dem primären Zellverband mit Anhäufung zusätzlicher Mutationen nicht durchlaufen. Somit werden Zellen beobachtet, die wenig heterogen sind und unter normalen

Bedingungen evtl. nicht metastasieren würden. Somit kann das Ansprechen auf Therapien nur mit Einschränkungen beurteilt werden.

1.6.2.3. METASTASIERUNG IM GEMM

Die neuen Entwicklungen im Bereich der GEMMs mit Manipulation mehrere Gene führte auch hier zur Entwicklung einiger Metastasierungsmodelle. Besonders das $KRAS^{G12D}$;$TP53^{R172H}$;Pdx-1-Cre (KPC-) Modell zeigt eine aggressive Tumorentwicklung über die Bildung von Vorläuferläsionen in einem Tieralter von acht bis zehn Wochen mit anschließend hoher Metastasierungsinzidenz. Das KPC-Modell bildet dabei viele Eigenschaften des menschlichen Tumor-*microenvironments* ab und zeigt außerdem immunologische Parallelen auf(98). Diese und daraus entstehende syngene Transplantationsmodelle ermöglichen bei diesen immunkompetenten Mäusen die Evaluation neuer Immuntherapien.

1.7. LYSOPHOSPHATIDSÄURE

Lysophosphatidsäure (*lysophosphatidic acid*, LPA) ist ein Glycerophospholipid, bestehend aus einer Phosphatgruppe als Kopf und einem einfachen Fettsäurerest, der sich in der Kettenlänge unterscheiden kann. Es können gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (FS) vorkommen(115). Die Nomenklatur erfolgt dabei nach dem gängigen Schema der Fettsäuren. So besteht 14:0-LPA aus einem FS-Rest mit 14 C-Atomen ohne Doppelbindungen, 18:2-LPA bedeutet einen FS-Rest mit 18 C-Atomen mit zwei Doppelbindungen und ist damit ungesättigt(115). Die Länge und Sättigung des FS-Rest entscheidet dabei über die Bindungsaffinität, welche LPA an den verschiedenen Rezeptoren zeigt. Die Bildung von LPA aus Lysophosphadiylcholin wird durch die Phospholipase D-Aktivität des Enzyms Autotaxin (ATX) katalysiert. Die Katalyse durch ATX begünstigt hierbei FS mit einer möglichst kurzen Kettenlänge und möglichst gesättigte FS(115, 116). Der Abbau von LPA erfolgt durch Lipid-Phosphat-Phosphohydrolasen zu Monoacylglycerol und Phospholipidsäure.

LPA vermittelt seine Wirkung über sechs bisher bekannte, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, LPA_{1-6}. Dabei können die unterschiedlichen G-Protein-Rezeptoren über G_i, G_q; G_s und $G_{12/13}$ unterschiedliche Signalkaskaden auslösen.

Die Wirkung von LPA hängt damit hauptsächlich vom Rezeptor und der damit ausgelösten Signalkaskade ab. LPA_{1-3} weisen dabei eine recht ähnliche Aminosäurensequenz auf und wirken alle über $G_{i/o}$ und G_q, LPA_3 wirkt außerdem über

G_s und $LPA_{1,2}$ über $G_{12/13}$(117). $LPA_{1,2}$ führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über G_s, einer Hemmung der Adenylatcyclase (G_i) oder zur weiteren Signaltransduktion über MAPK/PI3K oder den Rho-Signalweg. LPA_{4-6} zählen zu den purinergen Rezeptoren und weisen untereinander eine eher heterogene Struktur auf (118). Auch sie sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren und wirken im weiteren Verlauf über G_s, G_q und $G_{12/13}$ mit Aktivierung der PLC, der Adenylatcyclase oder des Rho-Signalweges(118).

Die Wirkungen der einzelnen Rezeptoren sind ebenso heterogen. Wie in Tabelle 1 dargestellt sind die verschiedenen LPA-Rezeptoren an verschiedensten Prozessen beteiligt. Generell gilt, dass LPA eine relevante Rolle bei der embryonalen und vor allem neuronalen Entwicklung zuzuschreiben ist. So führt der Knockout der LPA-Rezeptoren zu schwerwiegenden oder letalen Missbildungen(119).

Tabelle 1: Verschiedene LPA-Wirkungen und beteiligte Rezeptoren

Gewebe/Zellen	Beteiligter Rezeptor
Entwicklung von Haarfollikeln	LPA_6(115)
Gefäßneubildung	LPA_1, LPA_4(115)
Pulmonale und renale Fibrose	LPA_1(115)
Neuropathische Schmerzen	LPA1(115)
Reproduktion	LPA_{1-3}(115)
Neuronale Entwicklung	$LPA_{1/2/5}$(120)
Induktion von Genexpression, Migration und Proliferation	LPA_1(120)
Beinflussung des Knochenbildung/Knochenabbau	LPA_4(119)
Pleotrophe Effekte auf Blut-Lymphsystem	LPA_4(119)
Regulation der Reproduktion, Nidation	LPA_3(119)

Für LPA_5 ist eine Wirkung auf Makrophagen mit Veränderung derer Morphologie und Wirkung auf die Blutplättchen mit Einfluss auf das Gerinnungssystem und auf die Plaquebildung bei Atherosklerose bekannt(121). Weiterhin spielt LPA_5 eine Rolle bei der Regulation der Wasserresorption im Verdauungstrakt(119, 122). Für LPA_5 konnte eine Hemmung der Migration von Melanomzellen, vermittelt über den cAMP-Proteinkinase A Signalweg, gezeigt werden. (123). Für LPA_6 sind multiple Effekte in der Bildung von Haarfollikeln, moduliert durch den TACE-TGFa-EGFR Signalweg beschrieben(124). Im onkologischen Kontext ist für das hepatozelluläre Karzinom bei

erhöhter Expression von LPA_6 eine erhöhte Vaskularisation der Tumoren und damit ein erhöhtes Rezidivrisiko beschrieben(125).

Die Wirkungen von LPA sind vielfältig und ihre Rezeptoren in vielen Organen und Geweben, so auch im Pankreas exprimiert. Bezüglich der Wirkung von LPA auf die Migration wurden zahlreiche, in Abhängigkeit des prädominaten Rezeptors, steigernde oder hemmende Effekte nachgewiesen (118, 126-129). Diese Effekte sind vor allem mit Blick auf die Tumorentwicklung und Metastasierung bedeutend.

Der beim Ovarialkarzinom in großen Mengen entstehende Aszites zeigt erhöhte Konzentrationen von LPA. Diese wird teils durch die Tumorzellen selbst oder durch das Tumorstroma produziert und findet sich bei Ovarialkarzinompatientinnen im Vergleich zu Gesunden auch mit erhöhten Spiegeln im Blutplasma wieder(130). Die ebenfalls erhöhte Expression von LPA-Rezeptoren bei Ovarialkarzinomzellen geht mit proliferationssteigernden und anti-apoptotischen Eigenschaften einher(131). Ebenso zeigten verschiedene Studien zum Ovarialkarzinom eine Änderung der Genexpression unter Stimulation mittels LPA. Dabei kann es zu einer erhöhten Expression von Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA)(132), VEGF(133) und Interleukin 8 (Il-8) kommen(134). Damit erfolgt eine Steigerung der Invasivität und Metastasierung. Für das Pankreaskarzinom ist eine LPA_1 vermittelte Steigerung der Motilität, durch das in malignem Aszites enthaltene LPA beschrieben. Dabei ist die Entstehung von malignem Aszites häufig mit einer peritonealen Aussaht und damit reduzierter Prognose verbunden(135). Kommt es durch das Tumorstroma und die Tumorzellen zu einer vermehrten Bildung von LPA, zeigt die Untersuchung der Tumorzellen, dass Karzinomzellen mit gesteigerter Motilität eine Hochregulation der LPA1-Expression zeigen(126). An Kolonkarzinomzelllinien sahen Yang et al., dass LPA an LPA_2 und LPA_3 über den beta-Catenin-Signalweg eine verstärkte Proliferation dieser Zellen auslösen kann. Die Blockade dieses Signalweges über einen knockdown mit *siRNA* führt zu Blockade der durch LPA vermittelten Stimulation(136).

1.8. Verwendete Chemotherapeutika

Metformin: Metformin (N,N-Dimethylimidodicarbonimid-Diamin) gehört zur Gruppe der Biguanide und ist seit den 1950iger Jahren als orales Antidiabetikum zugelassen. Die durch Metformin vermittelte Senkung des Blutglukosespiegels wird vor allem durch eine Hemmung der hepatischen Gluconeogenese vermittelt. In epidemiologischen Studien konnte bei regelmäßiger Metformineinnahme im Rahmen eines Diabetes

mellitus eine geringere Inzidenz von Pankreaskarzinomen im Vergleich zu anderen antidiabetischen Therapien beobachtet werden(137). Hieraus wurde gefolgert, dass beim Diabetes Mellitus Typ II eine Metformintherapie protektiv im Hinblick auf das Erkrankungsrisiko für PDAs wirkt(138). Im Tiermodell wirkt Metformin wachstumshemmend und Apoptose induzierend auf Pankreaskarzinomzellen(139, 140).

CHC: Bei α-cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) handelt es sich um einen Inhibitor für Monocarbonsäuretransporter (*monocarboxylic acid transporter*, MCT) Diese MCTs sind unter anderem für den Export von Laktat aus dem Zytosol in den Extrazellularraum verantwortlich(141, 142). Durch diesen Export verhindern diese Transporter eine intrazelluläre Übersäuerung und somit einen funktionierenden Zellstoffwechsel. Für verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien konnte eine Überexpression dieser MCTs nachgewiesen werden. Hier ist vor allem die Überexpression von MCT4 mit einer schlechteren Prognose assoziiert(143, 144). Durch Inhibitoren von MCT4 kommt es zu einer Übersäuerung der Tumorzellen und dadurch zu einer Zytotoxizität. wie am Beispiel von Multiplen Myelom-Zellen gezeigt werden konnte(145). CHC beeinflusst zudem die Migration und Invasion von Pankreaskarziomzellen (146).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. *IN VITRO* VERSUCHE

2.1.1. ZELLLINIEN UND ALLGEMEINE ZELLKULTUR

Die *in vitro*- Versuche wurden an zwei murinen und einer humanen Zelllinie durchgeführt. Die Zelllinie 6606PDA wurde aus einem pankreatischen Adenokarzinom einer Maus nach p48-cre-induzierter Expression des KRASG12D-Onkogens isoliert, während die 7265PDA Zellen aus einem pankreatischen Adenokarzinom einer Maus nach pdx1-creER induzierter Expression von $p53^{R172H}$ und $KRAS^{G12D}$ isoliert wurde. Die 6606PDA Zellen stammen aus einer Maus mit C57BL/6 Hintergrund, während die 7265PDA Zellen möglicherweise aus einer Maus mit einem gemischten BL6/129 Hintergrund stammen (147). Bei der humanen Zelllinie MIA PaCa-2 handelt es sich um eine aus menschlichem PDA-Gewebe isolierte, seit vielen Jahren etablierte Zelllinie.
Alle Tumorzelllinien wurden jeweils in 10 ml *Dulbecccos´s Modiefied Eagle Medium* mit zusätzlich 4,5 g/l Glukose, 10 % *fetal calf serum* (FCS) (Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland FG 0435) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrome GmbH, A 2212) auf einer Petrischale (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) bei 37 °C und bei 5 % CO_2 in einem C150-Inkubator (Binder GmbH Tuttlingen, Deutschland) kultiviert. Alle Zellkulturversuche wurden in einer NuAire 440-Sicherheitswerkbank (ibs teconmara GmbH, Fernwald, Deutschland) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die einzelnen Versuche wurde das Medium entfernt und die Petrischale mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) (pH 7,4, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland, 10010-015) gespült. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA 0,5 g/l (Biochrome GmbH, L2103-20G) auf den Zellrasen aufgetragen und für zwei Minuten bei 37 °C inkubiert. Das erfolgreiche Ablösen der Zellen vom Boden der Petrischale wurde mittels Umkehrmikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert. Durch Zugabe von 10 ml Medium wurde der Trypsinierungsvorgang gestoppt, die Zell-Suspension in ein 50 ml Polypropylenröhrchen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) überführt und bei 1300 rpm für 4 Minuten zentrifugiert (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland, CS6RF). Der Überstand wurde mittels Pipette entfernt, das entstandene Zellpellet in 2 ml Medium resuspendiert und die Zellkonzentration nach Auszählen in einer Neubauerzählkammer errechnet.

2.1.2. MIGRATIONS-ASSAY (SCRATCH-ASSAY)

Die Durchführung der Migrationsassays erfolgte in einer 6-*well* Multititerplatte. Die benötigte Anzahl Zellen wurden jeweils in 2 ml des Standardmediums (mit FCS) gelöst und in das entsprechend beschriftete *well* pipettiert. Bei Verwendung von 7265PDA Zellen wurden 0,5 x 10^6 Zellen pro *well* ausgesät und anschließend für 48 h inkubiert, um einen gleichmäßig konfluenten Zellrasen zu erhalten. Unter Verwendung einer 200 µl-Pipettenspitze wurde eine Rautenform (#) in den Zellrasen gekratzt. Anschließend erfolgte das zweimalige Spülen der *wells* mit je 2 ml PBS und die Hinzugabe von 2 ml FCS-freiem Medium.

Bei den Versuchen mit LPA wurde neben einer LPA freien Trägerlösung zur Kontrolle LPA-Lösungen (Enzo Life Sciences, BML-LP-100-0005, Farmingdale, NY, USA) in den Konzentrationen 2,5 µM, 10 µM oder 40 µM LPA zugesetzt. In den Versuchsansätzen mit Metformin und CHC wurden diese als Monotherapie oder als Kombinationstherapie verwendet. Metformin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurde in der Konzentration 20 mM verwendet. CHC (Tocris Bioscience, Bristol UK) wurde in der Konzentration 10 mM verwendet. Das Medium wurde im weiteren Versuchsablauf belassen und nicht erneuert.

Nach der visuellen Kontrolle der durch das Scratchen entstandenen Kreuzungspunkte wurden pro *well* zwei Kreuzungspunkte ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet möglichst Kreuzungen mit geraden, rechtwinkligen Kanten auszuwählen. Pro Kreuzung erfolgte die Auswahl eines „Arms“, in welchem die anschließende Messung stattfand. Im gewählten „Arm“ erfolgte nun die Messung jeweils 1000 µm und 1500 µm von der Mitte des Kreuzungspunktes parallel in einen Arm hinein. Es wurden drei Messpunkte bei 1000 µm, 1250 µm und 1500 µm vom Kreuzungsmittelpunktpunkt entfernt ausgewählt. Es erfolgte das Aufnehmen eines mikroskopischen Bildes mit Einzeichnen der Messpunkte und spätere Messung mittels Image J Software (Wayne Rushband, *National Institute of Health*, Bethesda Maryland). Nach der Aufnahme der mikroskopischen Fotografien wurden die Zellen im Inkubator belassen und für weitere sieben Stunden inkubiert. Nach sieben Stunden erfolgte die erneute Fotoaufnahme an den identischen Messpunkten. Das Zellmedium wurde dabei belassen. Nach weiteren Inkubationsschritten erfolgten weitere Aufnahmen nach 14 und 21 Stunden. Nach Fotodokumentation aller Messzeitpunkte folgte die Auswertung mithilfe der Image J Software. Dafür wurde der Abstand des Zellrasens an den definierten Messpunkten orthogonal zu den Kanten des Zellrasen gemessen. Die Messwerte

wurden in tabellarische Form in Microsoft Excel (Version 16, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) übertragen. Abschließen wurde die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen anhand der Zeitdifferenz und der Verringerung des Abstandes, der durch den Scratch entstandenen Grenzen des Zellrasens berechnet. Die Angabe der Geschwindigkeit erfolgt in µm/h.

2.1.3. PROLIFERATIONS-ASSAY (BRDU-ASSAY)

Der BrdU-Assay dient der Quantifizierung der Proliferation der untersuchten Zellen mittels photometrischer Messung. Das Pyrimidinanalogon 5-Bromo-2‘-Desoxyuridin (BrdU) konkurriert mit der Base Thymidin im Rahmen der Zellproliferation um den Einbau in die DNA der proliferierenden Zellen. Nach Denaturierung der DNA erfolgt die Bindung eines Antikörpers mit konjugierter Peroxidase an das in der DNA gebundenen BrdU. Durch Zugabe des Chromogens Tetramethylbenzidin und dessen Oxidation durch die Peroxidase lässt sich photometrisch der Stoffumsatz und somit über die Menge des inkorporierten BrdUs die Zellproliferation quantifizieren.
Für die Behandlung von 7265PDA mit LPA wurden 3000 Zellen/*well* in 96 *well-Platten* ausplattiert, um nach 24 h mit einer Konfluenz von zirka 20-40 % fortzufahren. Für den Ansatz von MIA PaCa-2 wurden 4000 Zellen ausplattiert, um auch hier mit einer Konfluenz zwischen 20 und 40 % fortzufahren. Nach Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Kontrolllösung, 2,5 µM, 10 µM oder 40 µM LPA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) bedeckt. Dabei wurde äquivalent zum Scratch-Assay für jedes *well* 100 µl FCS freies Medium verwendet. Im nächsten Schritt wurde zu jedem *well* 10 µl BrdU-Lösung (*BrdU-labeling Reagent, Bromo-2‘-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I,* Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz) hinzugegeben. Nach weiteren 24 h Inkubation erfolgte nun die Auswertung mittels Photometer. Dafür wurden Medium und BrdU-Lösung entfernt und durch 200 µl Fixationslösung ersetzt. Diese wurde nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur durch Ausklopfen der Platte entfernt. Im nächsten Schritt wurden 100 µl einer 1:100 verdünnten Peroxidase-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper-Lösung hinzugegeben. Nach 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung wieder entfernt. Nach anschließender dreimaliger Spülung der *wells* mit 200 µl PBS (Waschpuffer) wurde pro *well* 100 µl TBM-Substratlösung aufgetragen und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Abschließend wurde die photometrische Messung mittels VICTOR

X3 *Multilabel Plate Reader* (Perkin Elmer Inc, Waltham, Massachusetts) bei 450 nm durchgeführt.

2.1.4. WESTERN BLOT

Die Durchführung eines *Western Blots* dient dem Proteinnachweis aus einem Zelllysat. Zunächst erfolgte die Proteinisolation aus den verwendeten Zelllinien. Dafür wurden zunächst 1 x 10^5 Zellen pro *well* in einer 6 *well* Platte kultiviert, um eine möglichst hohe Konfluenz zu erreichen. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und pro *well* mit 200 µl Lysispuffer (Zusammensetzung siehe Anhang) vom Boden abgelöst und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren und vor der Weiterverwendung bei Raumtemperatur aufgetaut.
Nach dem Auftauen erfolgt das Denaturieren (erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten mit *Mercaptoethanol* und *Sodium Dodecylsulfat (SDS)* und Auftrennen der Proteine über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Anschließend erfolgte das *Blotting* der Proteine auf eine Polyvenylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) und die Immunodetektion.
Durch die SDS-PAGE gelingt das Auftrennen der Proteine aus den Zell-Lysaten der unterschiedlichen PDA-Zelllinien (6606PDA; 6606l, 7265PDA und MIA PaCa-2). Die verwendete Gelmatrix besteht aus einem quer und längsvernetzten Acrylamid/Bis-acrylamid-Gel. Bei der durchgeführten diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein getrenntes Sammel- und Trenngel verwendet. Dies ermöglicht eine Konzentration von Proteinen mit demselben Molekulargewicht in scharf abgrenzbaren Banden und die Auftrennung der Proteine anhand des Molekulargewichts.
Für die Durchführung wurden die isolierten und durch Hitze, SDS und Mercaptoethanol denaturierten Proteine in 25 µl Ladepuffer (siehe Anhang) gelöst und in die Ladetaschen des Sammelgels (siehe Anhang) pipettiert. Anschließend wurde eine Stromstärke von 10 mA angelegt. Nach dem Durchlaufen des Sammelgels wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Nach dem Durchlaufen des Trenngels erfolgt das Übertragen der Proteine aus dem verwendeten Polyacrylamid-Gel auf eine proteinbindende PVDF-Membran.
Zur Vorbereitung wurden dafür zwei Filterpapiere in Anodenpuffer I (300 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,5; in A.dest.), ein Filterpapier in Anodenpuffer II (25 mM Tris; 20 % Methanol; pH 10,4; in A.dest.) und drei Filterpapiere in Kathodenpuffer (25 mM Tris; 40 mM Glycin; 20 % Methanol; pH 9,4; in A.dest.) für je fünf Minuten getränkt.

Die PVDF-Membran wurde mittels 17-sekündigem Methanolbad aktiviert, anschließend zwei Minuten in Wasser gewaschen und in Anodenpuffer II equilibriert. Für die Bestückung des Gerätes wurden nun zwei Filterpapiere Anodenpuffer I, ein Filterpapier Anodenpuffer II und die PVDF-Membran auf die Anode gelegt. Darüber folgte das Polyacrylamidgel und drei Filterpapiere mit Kathodenpuffer. Darüber wurde die Kathode aufgelegt und ein elektrisches Feld mit der Stromstärke 2,8 mA/cm^2 für 100 Minuten angelegt.

Zur Immundetektion der LPA-Rezeptoren wurde der Lysophospholipid (LPA) Receptor Antibody Explorer Kit (#AK-515, Alomone Labs, Jerusalem, Israel) verwendet. Diese monoklonalen Antikörper binden spezifisch an die verschiedenen LPA-Rezeptoren 1- 6. Sie wurden nach Herstellerangeben in PBS, 1 % BSA, 0,1 % Tween-20 und 0,05 % NaN_3 gelöst.

Nach der Durchführung des Western Blots wurde die Membran mit der Blockierlösung (PBS mit 3 % BSA und 0,05 % NaN_3, bei den Untersuchungen mit $LPA_{3/6}$ wurde anstelle von BSA Milchpulver verwendet) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die primären Antikörper hinzugegeben und für weitere drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Neben der Durchführung mit Anti-LPA-AK erfolgte auch eine Durchführung mit Anti-beta-Aktin-AK als Ladekontrolle. Nach dieser Inkubation folgte das Waschen der Membran bei Raumtemperatur für drei mal zehn Minuten mit Waschpuffer (PBS und 0,1 % Tween-20). Um die zuvor verwendeten primären Antikörper abzulösen, erfolgte das mehrmalige Waschen der Membran mit TBST und TBS, sowie das Strippen mit Strippingpuffer (25 mM Glycin, 1 % SDS, pH 2 in A. dest.) und ein abschließendes Waschen mit TBST und TBS, um die Membran für den nächsten Antikörper vorzubereiten. Abschließend erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur und erneutes dreimaliges Waschen über zehn Minuten. Zur Detektion wurde das ECL^{Plus} *Western Blotting Detection Reagens* verwendet. Das enthaltene Substrat wird dabei durch Meerrettichperoxidase oxidiert und zerfällt durch Wasserstoffperoxid, dabei wird Licht mit der Wellenlänge 430 nm freigesetzt, nach Überschichten der Membran mit Entwicklungslösung wurde diese Chemilumineszenz mittels Kamera (ChemiDoc XRS) über eine definierte Belichtungszeit aufgenommen (Tabelle 2).

Tabelle 2 Antikörperverdünnung, Proteinkonzentration und Belichtungszeit beim Western Blot

Antikörper (Verdünnung) Blockierlösung mit	Konzentration Protein-	Molekulargewicht Zielstruktur	Belichtungs-zeit

	gemisch		
Rabbit-anti-LPA_1-Rezeptor-AK (1:400) BSA	10 µg	Ca. 50 kDa	100 s
Rabbit-anti-LPA_2-Rezeptor (1:200) BSA	10 µg	Ca. 37 kDa	100 s
Rabbit-anti-LPA_3-Rezeptor (1:200) Milchpulver	10 µg	Ca. 50 kDa	100 s
Rabbit-anti-LPA_4-Rezeptor (1:500) BSA	10 µg	Ca. 45 kDa	50 s
Rabbit-anti-LPA_5-Rezeptor (1:200) BSA	10 µg	Ca. 37 kDa	50 s
Rabbit-anti-LPA_6-Rezeptor (1:1000) Milchpulver	40 µg	Ca. 45 kDa.	100 s

2.2. *IN VIVO* VERSUCHE

2.2.1. ALLGEMEINE INFORMATION ZU DEN VERSUCHSTIEREN

Zur Evaluation der Metastasierung erfolgten die Versuche an immundefizienten Mäusen. Alle Tiere wurden ursprünglich von The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA) erworben und in der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock weiter vermehrt. Die Tierhaltung erfolgte in einem Abschnitt der „*Specific-Pathogen-Free*“ (SPF)-Haltung um die immundefizienten Tiere bestmöglich vor opportunistischen Infektionen zu schützen. In den Räumen herrscht im Vergleich zur Umgebung ein höherer Luftdruck um die Pathogenverschleppung in diesen Bereich zu reduzieren. Der Zutritt erfolgt über eine Schleuße nach Anlegen einer persönlichen Schutzausrüstung und Desinfektion der Arbeitsmaterialien. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum* bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit der deutschen Gesetzgebung und der EU-Direktive 2010/63/EU und nach Genehmigung des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF MV, Thierfelderstraße 18, 18003 Rostock) durchgeführt. Die entsprechenden Eingriffe wurden mit dem Aktenzeichen 7221.3-2-039/14, 2-012/17 und -1-009/17 genehmigt.

2.2.2. VERWENDETE MAUSSTÄMME

Als Versuchstiere wurden männliche Mäuse aus zwei verschiedenen Mausstämmen verwendet.

Bei Nacktmäusen des Stammes Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI\text{-}Foxn1nu/nu}$ handelt sich um Tiere mit einem NMRI-Hintergrund und einer Mutation im *Foxn1* (*forkheadbox N1*) Gen auf Chromosom 11. Diese autosomal rezessive Mutation führt zu einer Thymusaplasie. Es kommt dadurch zu einem fehlenden Ausreifen der T-Zellen und damit zu einer Immundefizienz, welche auch die Detektion und Elimination von körpereigenen, entarteten Zellen betrifft. Die unspezifische Immunantwort ist dabei nicht betroffen. Die ebenso betroffene Keratinsynthese führt zum klassischen Erscheinungsbild als Nacktmaus.

Beim zweiten verwendeten Stamm handelt es sich um den Stamm C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J der Jackson Laboratories. Bei diesem Stamm wurde ein sequenzieller Knock-out der kodierenden Regionen des *Rag2*- und des X-chromosomal gelegenen *Il2rg* Gens durchgeführt. Durch die Mutationen kommt es bei den Tieren zu einem Fehlen der T-, B- und NK-Zellen und somit zu einer deutlich geschwächten Immunantwort. Dieser Mausstamm wurde speziell dafür entwickelt, humane Zellen besser zu tolerieren(148).

2.2.3. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

2.2.3.1. ORTHOTOPE TUMORZELLINJEKTION

Die orthotope Zellinjektion und die durchgeführte retrobulbäre Blutentnahme wurden am narkotisierten Tier durchgeführt. Prinzipiell kamen zwei verschiedene Narkoseverfahren zum Einsatz. Primär favorisiert wurde die Inhalationsnarkose mit Isofluran. Da dieses Verfahren in den Laborräumen der SPF-nahen Haltung jedoch nicht zur Verfügung stand, wurde hier eine Narkose mit Ketamin/Xylacin mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion durchgeführt.

Die Inhalationsnarkose erfolgte mit 2,5 % Isofluran (Actavis Deutschland GmbH und Co. KG, München, Deutschland) über ein Inhalationsgerät (Sula 808, Dräger Medical, Lübeck, Deutschland) mit 0,8 l/min Sauerstoff und 1,6 l/min N_20 (Lachgas). Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Plexiglasbox mit Absaugung des verbrauchten Gases. Die weitere Narkoseaufrechterhaltung erfolgte mit Narkosemaske in Rückenlage und Fixierung auf einer Wärmeplatte.

Die intraperitoneale Injektion von Ketamin/Xylacin erfolgte in einer gewichtsadaptierten Dosierung von 98 mg/kg KG Ketamin und 7 mg/kg KG Xylacin. Nach Narkoseeinleitung erfolgte die s.c. Injektion von 0,05 mg/25 g KG Caprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) und das Aufbringen von 5 % Dexpanthenolsalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) auf die Augen zur Vermeidung kornealer Läsionen. Zur Vorbereitung der Zellinjektion wurde wie im Kapitel zur allgemeinen Zellkultur beschrieben verfahren. Nach dem Auszählen der benötigten Zellzahl wurden die Zellsuspension mittels dreiminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm konzentriert. Das dabei entstandene Pellet wurde anschließend in eisgekühltem PBS aufgenommen. Die injizierte Zellzahl betrug dabei in den ersten Versuchsrunden 2,5 x 10^5 Zellen und wurde im Verlauf auf 0,5 x 10^5 Zellen reduziert. Die entstandene Suspension wurde anschließend mit ebenfalls eisgekühltem Matrigel (BD Bioscience, San José Kalifornien, USA, Nr. 354248) im Verhältnis 1:1 auf Eis gelagert. Die weitere Lagerung erfolgte immer unter konsequenter Kühlung.

Das Abdomen wurde rasiert und mit Povidon-Iod-Lösung desinfiziert. Als Zugang erfolgte eine ca. zwei cm lange Querlaparotomie ca. 1 cm unterhalb des Sternums. Nach Eröffnen des Peritoneums wurde das Duodenum aufgesucht und mittels Gewebefasspinzette nach Adson-Brown mobilisiert und so der Pankreaskopf dargestellt. Nach erneutem Durchmischen der Matrigel-Zellsuspension wurden 5 µl, in späteren Versuchsrunden 1 µl, in eine gekühlte Hamiltonspritze aufgezogen und die Kanüle vorsichtig in das Pankreasparenchym eingeführt und die Zellen injiziert. Bei korrekter Injektion konnte die Bildung einer kleinen Blase im Parenchym beobachtet werden. Durch die Anfärbung der Suspension mit Methylenblau wurde eine verbesserte Sichtbarkeit der Blase erreicht. Um einen Rückfluss der Zellsuspension aus dem Stichkanal zu verhindern, wurde die Kanüle nach Injektion 20 Sekunden im Gewebe belassen und beim Zurückziehen die Injektionsstelle mit einem Stieltupfer bedeckt. Nach Rückverlagerung der Organe in die Bauchhöhle und Spülung mit NaCl erfolgte der Wundverschluss zunächst mit Naht des Peritoneums mit einem 5-0 Vicrylfaden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Hautnaht erfolgte mit einem 4-0 Polypropylenfaden in Einzelknopftechnik. Zusätzlich wurde ein Sprühverband mittels OpSite Sprühverband (Smith&Nephew, Hamburg, Deutschland) aufgebracht. Um Verschlingungen der Organe vorzubeugen, wurde die Maus vorsichtig an den Pfoten angehoben und leicht geschüttelt. Postoperativ wurden

die Tiere in die Käfige gelegt und unter einer Wärmelampe platziert und das Erwachen aus der Narkose abgewartet.

2.2.3.2. VERSUCHSABLAUF UND VERSUCHSDURCHGÄNGE

Die ersten Versuche mit einer Laufzeit von 29 Tagen nach Tumorzellinjektion dienten der Auswahl des verwendeten Mausstammes, Verfeinerung der Injektionstechnik und Testung der generellen Verträglichkeit der injizierten Therapeutika (Abbildung 1).
Es wurden insgesamt drei Versuchsdurchgänge mit dieser geplanten Laufzeit durchgeführt.

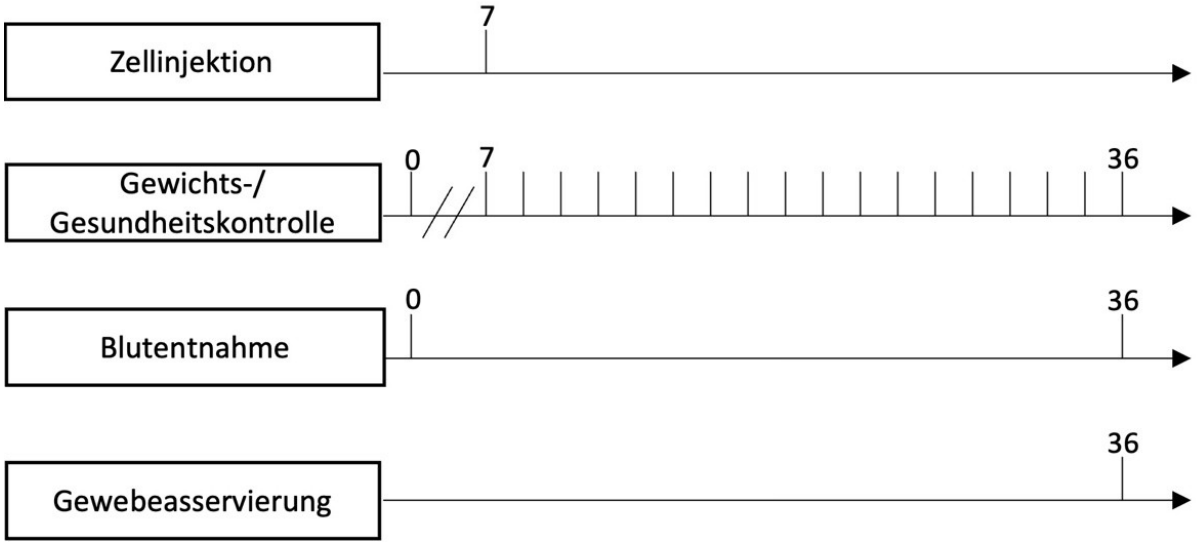

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Vorversuche (Versuch 1-3). 0: Tag 0, Ohrmarkierung, Blutentnahme; 7: Tag 7, Tag der Zellinjektion; 36: Tag 36 des Versuchs, 29 Tage nach Zellinjektion, geplante Gewebeentnahme.

An Tag 0 erfolgte die Gesundheitskontrolle der Tiere sowie die Ohrmarkierung zur weiteren Unterscheidung der Tiere im Versuchsverlauf. Ebenso erfolgte eine erste retrobulbäre Blutentnahme wie unten beschrieben. An Tag sieben erfolgte die orthotope Tumorzellinjektion nach oben beschriebenem Standard. Postoperativ erfolgte die strenge, regelmäßige Gesundheitsevaluation mit einem standardisierten Score Sheet mit Kontrolle von Gewicht und dem Verhalten der Tiere alle zwei Tage. Bei auffälligen Tieren erfolgte eine engmaschigere Kontrolle. Zur weiteren postoperativen analgetischen Therapie wurde ab dem Tag der Tumorzellinjektion Metamizolnatrium (800 mg/l, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) zum Trinkwasser der Tiere hinzugegeben.
Im ersten Versuchsdurchgang (V1) wurde an neun männlichen Versuchstieren des Stammes C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J, mit einem durchschnittlichen Alter von

20 Wochen, die Tumorzellinjektion mit 2,5 x 10^5 Zellen 6606PDA-Zellen durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in der SPF-nahen Zone nach oben genanntem Standard. Es folgte eine engmaschige Überwachung des Gesundheitsstatus und eine abschließende Gewebeentnahme zur histologischen Aufarbeitung und Untersuchung des Primärtumors.

Der zweite Versuchsdurchgang (V2) erfolgte nach demselben zeitlichen Schema an insgesamt zwölf männlichen Versuchstieren. Dabei wurde die Injektion von 2,5 x 10^5 Zellen 6606PDA in jeweils drei Tiere der Spezies C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J und drei Tiere der Spezies NMRI-Fox1nu durchgeführt, außerdem erfolgte die Injektion von 2,5 x 10^5 Zellen MIA PaCa-2 Zellen in drei Tiere C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J und drei NMRI-Fox1nu Mäuse. Das mittlere Alter der Tiere in dieser Versuchsreihe lag bei 17 Wochen. Die postoperative Behandlung und regelmäßige Kontrolle des Gesundheitszustandes wurde analog zum Verfahren der ersten Versuchsrunde durchgeführt, ebenso die Gewebeasservierung und histologische Untersuchung.

Im Versuchsdurchgang (V3) erfolgte die Injektion von 2,5 x 10^5 Zellen der 7265PDA-Zellen in drei männliche Versuchstiere des Stammes C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J. In weiteren drei Tiere desselben Stammes erfolgte die Injektion von 0,5 x 10^5 7265PDA-Zellen. Aufgrund des perioperativen Versterbens von zwei Tieren erfolgte wenige Tage später eine erneute Injektion in zwei Tiere. Bei allen Tieren wurde die Zellsuspension zur Verbesserung und Kontrolle der Injektionsgüte mit Methylenblau versetzt (2,5 mg/ml der Injektionslösung). Da bei geplanter Verwendung von bildgebenden Verfahren im anstehenden längeren Versuch keine Möglichkeit der Rückführung der Tiere in die SPF-Haltung durchführbar war, wurden die Tiere über längere Zeit, in der nicht SPF-Haltung gehalten. Zwei zusätzliche Tiere nahmen ohne Tumorzellinjektion am Experiment teil. Anhand dieser Tiere sollte ein evtl. Einfluss, der nicht SPF-Haltung auf die Gesundheit der Tiere beobachtet werden. Das mittlere Alter zu Beginn des Versuches lag bei 17,7 Wochen. Als Schutzmaßnahme wurden Käfigdeckel mit eingelassenem Luftfilter verwendet.

Der vierte und fünfte Versuchsdurchgang wurde über einen längeren Zeitraum (90 Tagen nach Tumorzellinjektion) geplant (Abbildung 2). Über diesen Zeitraum sollte es nach Erkenntnissen aus den bisherigen Versuchsrunden zu einer Metastasierung kommen.

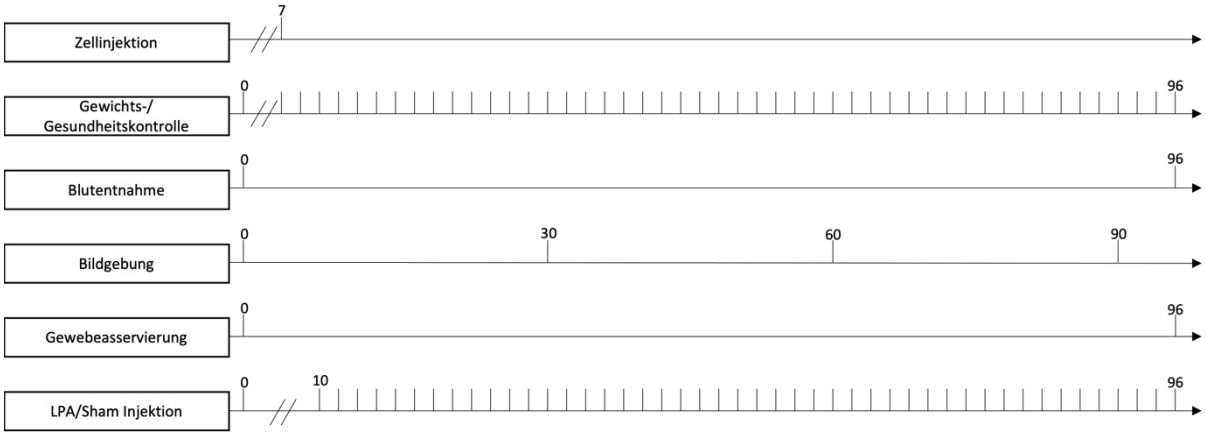

Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Langzeitversuche (Versuch 4-5). 0: Tag 0, Ohrmarkierung, Blutentnahme; 7: Tag 7, Tag der Zellinjektion; 30/60/90: Tage mit geplanter Bildgebung; 96: Tag 96 des Versuchs, 89 Tage nach Injektion der Zelllinie

Im vierten Versuchsdurchgang (V4) wurde die Tumorzellinjektion an 14 männlichen Versuchstieren (C;129S4-Rag2tm1.1FlvIl2rgtm1.1Flv/J) mit einem mittleren Alter von 13 Wochen (bei Versuchsbeginn) durchgeführt. Bei allen Injektionen wurde die Zellzahl im Vergleich zu V1-3 auf 0,5 x 10^5 Zellen reduziert. In drei Tiere erfolgte die Injektion von 7265PDA, in sechs Tiere die Injektion von 7265PDA + LPA (2,5 µM in der Injektionslösung). Tiere, welche mit der Zellsuspension bereits LPA injeziert bekommen hatten bekamen im Versuchsverlauf ab Versuchstag 14 alle zwei Tage eine intraperitoneale Injektion von 100 µl einer 200 µM LPA-Lösung (570 µl einer 5 mM LPA-Lösung verdünnt mit HBSS auf 14250 µl (*Hanks buffered sodium saline*, Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany)).

Weiterhin erfolgten in zwei Tiere die Injektion von MIA PaCa-2 luc + PSCA und in drei Tiere die Injektion von MIA PaCa-2 luc. Die Zusätze luc und PCSA stehen dabei für die Expression von Luciferase und dem Gen des „*prostate stem cell antigen*“. Durch Luciferase kommt es zur enzymatischen Oxidation von i.p. appliziertem Luciferin, wodurch die Zellen mittels Night-Owl-Imaging im Versuchstier detektiert werden können. Bei allen Injektionen wurde zur besseren Beurteilung der Injektionsgüte ein Methylenblauzusatz, wie im Vorversuch erprobt, verwendet. Im Versuchsverlauf erfolgte am Tag 30-40 nach Injektion, sowie am Tag 60-70 nach Injektion ein MRT sowie Positronen Emission Topografie mit CT (PET/CT). Eine erneute Bildgebung (MRT, PET/CT und Night-Owl-Imaging erfolgte kurz vor Gewebeentnahme am Tag 90-96.

Im fünften und abschließenden Versuchsdurchgang erfolgte die orthotope Zellinjektion in insgesamt 22 Tiere (Injektionsschema siehe Tabelle 3). Das mittlere Alter der männlichen Versuchstiere lag bei 20 Wochen.

Die Verteilung der vier Gruppen stellte sich wie folgt dar: MIA PaCa-2 luc (n = 4), MIA PaCa-2 luc + PSCA (n = 4), MIA PaCa-2 luc + LPA (n = 7) und MIA PaCa-2 luc + PSCA + LPA (n = 7).

Dabei wurden alle Zellen in PBS mit Methylenblau (270 µl PBS + 30 µl Methylenblau [50 mg/ml] 1 x 10^5 Zellen/µl) gelöst, 1:1 mit Matrigel gemischt und 0,5x10^5 Zellen injiziert. Bei LPA-Zusatz erfolgte eine Zugabe von LPA-Lösung (100 µM), um eine Konzentration von 2,5 µM LPA in der Injektionslösung zu erreichen.

Tabelle 3: Injektionsschema Versuchsrunde 5

Zelllinie	Injektion von	Injizierte Tiere
1 µl 0,5x10^5 MIA PaCa-2 luc	HBSS	4
1 µl 0,5x10^5 MIA PaCa-2 luc + PSCA	HBSS	4
1 µl 0,5x10^5 MIA PaCa-2 luc + LPA	LPA in HBSS	7
1 µl 0,5x10^5 MIA PaCa-2 luc + PSCA + LPA	LPA IN HBSS	7

Im anschließenden Versuchsverlauf erfolgte wieder alle zwei Tage oder bei Bedarf öfter eine Gesundheits- und Gewichtskontrolle. Bei den beiden Tieren, welche mit der Zellsuspension bereits LPA injiziert bekommen hatten, folgte beginnend an Versuchstag 14 alle zwei Tage eine intraperitoneale Injektion von 100 µl einer 200 µM LPA-Lösung (570 µl einer 5 mM LPA-Lösung verdünnt mit HBSS auf 14250 µl (*Hanks buffered sodium saline*, Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany)), die Kontrollgruppe erhielt HBSS-Injektionen. Analog zu Versuchsrunde vier (V4) wurden wieder ca. 30/60/90 Tage nach Zellinjektion MRT und PET/CT sowie Lumineszenz Imaging mittels Night-Owl durchgeführt.

2.2.3.3. BLUTBILD

Vor der Injektion der Tumorzellen und am Versuchsende wurde am narkotisierten Tier retrobulbär Blut mittels EDTA-beschichteter Glaskanüle entnommen. Danach wurde das Blutbild mit Hilfe des Sysmex KX 21 (Sysmex Cooperation, Kobe, Japan) angefertigt und das Plasma nach 10-minütiger Zentrifugation (1200 g) bei -20 °C asserviert.

2.2.3.4. GEWEBEENTNAHME UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

Die Euthanasie der Tiere am Versuchsende oder bei gravierender Verschlechterung des Gesundheitszustandes erfolgte durch zervikale Dislokation unter Narkose. Für die Gewebeentnahme erfolgte eine Längslaparotomie und Thorakotomie und kreuzförmige Erweiterung in Richtung der Rippenbögen. Das abdominelle Organpaket wurde en-bloc entnommen. Dafür wurden Ösophagus und Rektum durchtrennt und das Organpaket mit Mesenterium vom Retroperitoneum abgetrennt. Nach Entnahme aus dem Situs wurde das Pankreas vorsichtig von Duodenum und der Milz abpräpariert. Dabei wurde der Tumor vom Pankreas isoliert. Anschließend erfolgte die Gewichtsbestimmung von Tumor und Pankreas.

Bei sehr großen Tumoren wurde der Tumor zerteilt, bei kleinen Tumoren erfolgte die Einbettung zur histologischen Aufarbeitung in Gänze. Die Leber wurde ebenfalls aus dem Situs entnommen und makroskopisch auf Metastasen untersucht. Bei Implantation von MIA PaCa-2-luc erfolgte die Luminiszenzbildgebung der Leber nach Entnahme aus dem Situs. Durch die thorakale Eröffnung wurde die Lunge nach Abtrennen der Trachea ebenfalls entnommen, auch hier erfolgte bei Verwendung von MIA PaCa-2 luc die Luminiszenzbildgebung.

Standardmäßig erfolgte die Einbettung in Paraffin. Dafür wurden das Pankreas, mindestens eine Tumorhälfte, bei kleinen Tumoren der Tumor in toto, rechter Leberlappen und zusätzlich bei makroskopischem Anhalt für Metastasen zusätzliches Lebergewebe, das Mesenterium und ein Lungenflügel in Jet-Kassetten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) in vierprozentigem Formalin (Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) fixiert. Um die Gewebe in hydrophobem Paraffin einzubetten, erfolgte die Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihen im vollautomatischem Gewebeinfiltrationsaustomaten (TP1020 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH).

Im nächsten Schritt wurde der Alkohol durch X-TRA-Solv (MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland, 41-5211-00) ersetzt. Nach ausreichender Wirkzeit wurden die Gewebekassetten mit den Geweben im einem EG1160-Einbettungsautomaten (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) in heißes Paraffin überführt. Nach Abkühlen und Aushärten des Paraffins erfolgte das Schneiden (Schichtdicke vier µm) mit dem RM2145 Mikrotom (Leica Mikorosysteme Vertrieb GmbH). Nach Anfertigen der Schnitte wurden diese im 37 °C Grad heißem Wasserbad entfaltet und auf einen Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde

Deutschland) aufgetragen. Abschließend erfolgte das Trocknen im Ofen bei 60-66° C über eine Stunde.

Für die Färbung der Schnitte mit wässrigen Farbstoffen wurden die Schnitte mit X- TRA-Solv Lösungsmittel entparaffiniert und stufenweise rehydriert. Für die Rehydrierung wurde eine Alkoholreihe mit absteigender Ethanolkonzentration verwendet. Nach Färbung erfolgte wieder eine Dehydration mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Überführen in X-TRA-Solv-Lösungsmittel. Es folgte die Zugabe von Eindeckmedium (X-TRA-Kitt, MEDITE GmbH, 415219-00) und das Bedecken des Schnittes mit Deckgläschen.

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte fünf Minuten in Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland 109249) gelegt, im nächsten Schritt folgte ein zehnminütiges warmes Wasserbad, das sogenannte „Bläuen“. Durch das Bläuen wird der pH-Wert erhöht, wodurch der blaue Farbton entsteht. Das Hämalaun färbt dabei durch selektive Bindung der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren den Zellkern. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit 0,5 % Eosinlösung (Merck KGaA) über eine Minute in der Färbelösung. Der saure Farbstoff Eosin färbt dabei vor allem die acidophilen Proteine des Zytoplasmas.

2.2.3.5. BILDGEBUNG

Sämtliche bildgebende Verfahren wurden am Institut für Experimentelle Chirurgie und der Core Facility für Multimodale Kleintierbildgebung der Universität Rostock gemäß der geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde die Sedierung der Tiere im MRT und PET/CT mittels Isofluran-Inhaltionsnarkose sichergestellt. Für die NightOwl Bildgebung erfolgte die Sedierung mit Ketamin/Xylacin. Für die Dauer der Untersuchung und bis zum Wiedererwachen wurde die Körpertemperatur mittels Wärmeunterlage und Infrarotlampe konstant gehalten.

Bei dem verwendeten Magnet-Resonanz-Tomographen handelt es sich um einen Kleintier-MRT (BioSpec 70/30, Fa. Bruker, Billerica, MA, USA) mit 7 Tesla (T) Magnetfeldstärke und 20 mT/m Gradientenstärke. Die Untersuchung erfolgte mit einer T2 gewichteten TurboRARE-Sequenz (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*). Dabei wurden folgende Parameter verwendet: TE/TR: 25/180 ms; FoV ca. 40 x 28 mm; Matrix: 200 x 200; Voxelgröße 0,2 x 0,14 mm, Schichtdicke 1 mm. Die Aufnahme erfolgte in 25 Schichten.

Die Durchführung der Positronen-Emission-Tomografie erfolgte mittels Kleintier- PET/CT (Inveon PET/CT Siemens, Knoxville, TN, USA) mit einer CT- Auflösung von -20 µm und PET- Auflösung von -5 mm. Zur intravenösen Tracer-Applikation erfolge die Kanülierung einer Schwanzvene und Verabreichung von 18- Fluorodesoxyglucose (^{18}FDG). 60 Minuten nach Injektion wurden über 15 Minuten lang statische PET-Scans in Kopflage aufgenommen. Die Abschwächungskorrektur erfolgte mithilfe des aufgenommenen Ganzkörper-CT-Scans, für ^{18}F wurde eine Zerfallskorrektur vorgenommen.

Die Lumineszenzbildgebung mittels Luminographen (NightOwl LB 983, Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Bad Wildbad Deutschland) erlaubt die röntgenstrahlenfreie Bildgebung mittels Chemilumineszenz bei Verwendung Luciferase-exprimierender MIA PaCa-2-luc Zellen. Wird den Tieren nun Luciferin injiziert, wirkt es als Substrat für die Luciferase der Tumorzellen. Dabei wird Luciferin oxidiert und es entsteht ein energetisch angeregtes Zwischenprodukt, bei dessen Zerfall Licht der Wellenlänge 560 nm entsteht, welches von einem Detektor aufgenommen wird. Durch eine geeignete Software und die parallele Fotoaufnahme, kann die gemessene Lumineszenz farblich dargestellt und auf das Bild des Versuchstiers übertragen werden. Dies ermöglicht eine Aussage über das Vorhandensein eines Tumors aus den injizierten Zellen und über seine ungefähre Größe, bzw. über den Verlauf der Tumorgröße bei mehrfacher Bildgebung im Versuchsverlauf.

Für die Bildgebung erfolgte die intraperitoneale Injektion von 100 µl Luciferinlösung (150 mg/kgKG, D-Luciferin (Gold Bio, St. Louis, MO, USA)) gelöst in DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*)) und fünf Minuten später die gewichtsadaptierte Sedierung mit 98 mg/kgKG Ketamin und 7 mg/kgKG Xylacin.

Nach erfolgter Sedierung wurde die Maus in Rückenlage unter Fixierung der Extremitäten in die Messkammer des Luminographen gelegt. Die Bildgebung erfolgte mit Hilfe mitgelieferten Software IndiGO™ (Format Solutions, Hopkins Minnesota), (Grundeinstellungen: Lumineszenz: 60 s; Binning 4x4, Gain: high, Sample Size 20 mm). Die Software erlaubt es die Aufnahme als Bilddatei zu exportieren und des Weiteren die maximale Lumineszenz in Photonen/s zu ermitteln. Nach Durchführung der Bildgebung wurden die Versuchstiere in ihre Käfige unter einer Wärmelampe bis zum vollständigen Wiedererwachen beobachtet.

Im Rahmen der Gewebeentnahme erfolgte fünf Minuten vor Euthanasie und Organentnahme ebenso die Injektion von 100 µl Luciferinlösung (150 mg/kgKG). Nach Organentnahme wurden die entnommenen Lebern und Lungen in der Bildgebungseinheit platziert und das Night-Owl-Imaging zum Nachweis von Organmetastasen verwendet.

2.3. STATISTIK

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit SigmaPlot12 (Systat Software, Inc., San Jose Kalifornien, USA). Die Berechnung auf signifikante Unterschiede erfolgte mit dem Mann-Whitney Rank-Sum Test, die Akkumulation des alpha-Fehlers wurde bei mehrfachen Vergleichen durch Nutzung der Bonferroni Korrektur berücksichtigt. Unterschiede mit einem p-Wert ≤ 0,05 geteilt durch die Anzahl der Vergleiche wurden als signifikant bezeichnet. Auch die Erstellung der Grafiken und Diagramme erfolgte mittels oben genannter Software. Die gezeigten Boxplots zeigen den Median und die Grenzen des ersten und dritten Quartils als Box, die Whiskers stellen das 10. und 90. Quantil dar. Bei Nennung des Mittelwertes ist das arithmetische Mittel gemeint, parallel dazu erfolge die Angebe der Standartabweichung.

3. ERGEBNISSE

3.1. *IN VIVO*: AUSWAHL DER TIERSTÄMME UND ZELLINJEKTION

Für die Auswahl des geeigneten Tiermodelles erfolgten die Injektion von 2,5 x 10^5 6606PDA in neun Mäusen des Stammes C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J (Versuch 1). Dabei verstarben zwei der neun Tiere bereits am dritten Tag nach der Zellinjektion. Bei allen Tieren war im Versuchsverlauf eine deutliche Gewichtsreduktion und Verschlechterung des Gesundheitszustandes zu verzeichnen, was sich in der Punktzahl des Score-Sheets deutlich widerspiegelte. Beim Erreichen der festgelegten Abbruchkriterien (Punktwert des Score-Sheets) erfolgte die Euthanasie der entsprechenden Tiere. So erfolgten die Euthanasie und Gewebeentnahme bei einem Tier an Tag zehn, sowie bei den verbliebenen sechs Tieren an Tag zwölf bzw. dreizehn (Daten fließen in Tabelle 4, Zeile 1 ein). Bei der nachfolgenden Autopsie wurden intraperitoneale Verwachsungen als Folge der Operation oder des Tumorwachstums beobachtet. Bei drei Tieren gelang die Asservierung eines Primärtumors. Das Tumorgewicht lag dabei zwischen 240 mg und 320 mg (Daten fließen in Tabelle 4, Zeile 1 ein). Da nach Beendigung des Tierversuches in einer Routinekontrolle einer späteren Passage der Zelllinie eine Kontamination mit Mykoplasmen festgestellt wurde, konnte eine opportunistische Infektion der Versuchstiere als Todesursache oder Cofaktor der hohen und frühen Letalität nicht sicher ausgeschlossen werden.
Nach negativer Testung auf Mykoplasmen erfolgte die Wiederholung des o.g. Versuches (Erster Teil des Versuches 2). Die Injektion erfolgte dabei an drei Mäusen (C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J mit 6606PDA). Dennoch konnte weiterhin eine eher kurze Überlebenszeit von 12, 12 und 16 Tagen nach Tumorzellinjektion beobachtet werden. In diesem Versuchsdurchgang konnte ein weiterer Tumor asserviert werden. Die Daten dieser Versuchsrunde (drei Mäuse) und die Daten der ersten Versuchsrunde (neun Mäuse) werden zusammengefasst in Tabelle 4 (Zeile 1) präsentiert. Insgesamt verstarben zwei Mäuse perioperativ. Das mittlere Überleben nach Tumorzellinjektion lag bei 10,8 Tagen. Bei acht untersuchten Mäusen konnten insgesamt vier Primärtumoren (50 %) mit einem durchschnittlichen Tumorgewicht von 350 mg nachgewiesen werden. Bei einem Tier lagen zudem intraperitoneale Metastasen vor. Im zweiten Teil des Versuches 2 erfolgte zudem die Injektion von 6606PDA in drei Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI-Foxn1nu/nu}$ Mäusen. Alle Tiere überlebten die ersten drei postoperativen Tage. Die mittlere Überlebenszeit nach Tumorinjektion betrug 21 Tage. Bei der Autopsie konnte bei einem von drei Versuchstieren (33 %) ein

makroskopisch sichtbarer Pankreastumor mit einem Gewicht von 202 mg detektiert werden ohne das Anhalt für eine Metastasierung bestand (Tabelle 4 Zeile 2). Auch in dieser Gruppe musste das Experiment aufgrund einer progredienten Verschlechterung des Gesundheitszustandes frühzeitig vor der geplanten Versuchsdauer von 29 d abgebrochen werden.

Nach Injektion von MIA PaCa-2 Zellen in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J (dritter Teil des Versuches V2) überlebten alle Mäuse bis zum geplanten Ende des Versuchszeitraumes von 29 Tage nach Zellinjektion. Zwar konnte bei allen Tieren ein Pankreastumor asserviert werden, jedoch waren diese mit einem mittleren Gewicht von 105 mg deutlich kleiner. Metastasen konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 4, Zeile 3). Nach Injektion von MIA PaCa-2 in Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI-Foxn1nu/nu}$ -Mäuse (vierter Teil des Versuches V2) überlebten ebenfalls alle Tiere bis Tag 29, allerdings konnten keine sichtbaren Tumoren oder Metastasen identifiziert werden (Tabelle 4, Zeile 4).

Tabelle 4 Ergebnisse Versuchsdurchgänge 1 und 2 unter Verwendung unterschiedlicher Mausstämme und Zelllinien

Maus-stamm	Anzahl Versuchs-tiere	Perioperative Mortalität (≤3 d)	Überleben nach Tumorzell-injektion X±STABW [d]	Tumorinzidenz	Tumorgewicht [mg]	Hepatische Metastasierung oder Peritonealkarzinose
Injektion von 5µl (2,5x10^5 Zellen) **6606PDA (Tumorentnahme Tag 10-13 n.I.) (V1+2)**						
129S4-Rag2Il2rg	12	16 % (2/12)	10,8±3,7	50 % (4/8)	350±60	13 % (1/8)
NMRI-Fox1nu	3	0	21,0±1,6	33 % (1/3)	202±0	0 % (0/3)
Injektion von 5µl (2,5x10^5 Zellen) **MIA PaCa-2 (Tumorentnahme Tag 29 n.I.) (V2)**						
129S4-Rag2Il2rg	3	0	29,0±0,0	100 % (3/3)	105±15	0 % (0/3)
NMRI-Fox1nu	3	0	29,0±0,0	keine Tumoren		0% (0/3)

Im dritten Versuch (V3) erfolgte die Evaluation der Zelllinie 7265PDA in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J-Mäusen (Tabelle 5). Während bei drei Tieren 2,5 x 10^5 Zellen injiziert wurden, erfolgte bei drei weiteren Mäusen die Injektion einer auf 0,5 x 10^5 Zellen reduzierten Suspension, um zu überprüfen, ob eine Reduktion der Zellmenge zu weniger Lokalkomplikationen durch ein zu rasches Tumorwachstum führt.

Während ein Tier aus der ersten Gruppe perioperativ verstarb, betrug die mittlere Überlebenszeit der beiden verbliebenen Mäuse 13,2 Tage nach Zellinjektion bei einer 100 % Tumorinzidenz und einem mittleren Tumorgewicht von 789 mg. Bei der Untersuchung des Gewebes zeigte sich hier bei einem der beiden Tiere in der histologischen Aufarbeitung Metastasen in der Leber (Zeile 1 in Tabelle 5). Das aus der zweiten Gruppe zwei Tiere aufgrund perioperativer Komplikation verstarben, wurde die Injektion nach gleichem Schema zu einem späteren Zeitpunkt an zwei weiteren Versuchstieren wiederholt, um eine sinnvolle Fortführung des Versuchs zu gewährleisten. Die mittlere Überlebenszeit der verbliebenen Tiere lag bei 20 Tagen. Die Autopsie zeigte bei allen Tieren einen abgrenzbaren Tumor (100 %) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 411 mg. In der mikroskopischen Evaluation der HE-Präparate der Leber zeigte sich in allen Fällen eine hepatische Metastasierung oder metastatische Ablagerungen im Bauchraum welche als Peritonealkarzinose gewertet wurden (100 %) (Tabelle 5, Zeile 2). Die Reduktion der injizierten Tumorzellzahl bei führte zu einer deutlichen Verlängerung des postoperativen Überlebens (20 d vs. 13,2 d). Zwei weitere Tiere erhielten keine Intervention und wurden zur Evaluation der Umweltbedingungen im Versuch mitgeführt. Davon verstarb ein Tier nach dreizehn Tagen, mutmaßlich nach einer Auseinandersetzung mit einem Artgenossen Das Zweite überlebte ohne Auffälligkeiten bis zum Versuchsende nach 13 Tagen (werden in Tabellen nicht gezeigt).

Tabelle 5 Tumorinzidenz bei Verringerung der injizierten Zellzahl (Versuch 3)

Mausstamm	Anzahl Versuchstiere	Perioperative Mortalität (≤3 d)	Überleben nach Tumorzell-injektion* X±STABW [d]	Tumorinzidenz*	Tumorgewicht* [mg]	Hepatische Metastasierung* oder Peritonealkarzinose
Injektion von 5 µl (2,5x10^5 Zellen) **7265PDA (Tumorentnahme Tag 17-25 n.I.) (V3)**						
129S4-Rag2Il2rg	3	1	13,2±9,8	100% (2/2)	789±453	50 % (1/2)
Injektion von 1 µl (0,5x10^5 Zellen) **7265PDA (Tumorentnahme Tag 26-27 n.I.) (V3)**						
129S4-Rag2Il2rg	5	2	20±0,47	100 % (3/3)	411±23	100% (3/3)

*Tiere, welche perioperativ verstarben, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.2. Expression von LPA-Rezeptoren in Pankreaskarzinomzelllinien

Um zu überprüfen, ob die Zugabe von LPA die Migration und Metastasierung der verwendeten PDA-Zellen beeinflusst, wurde die Expression der uns bekannten LPA-Rezeptoren LPA_{1-6} mittels Western Blot überprüft. Bei allen vier Zelllinien konnte eine deutliche Bande im Bereich von 50 kDA, dem Molekulargewicht des LPA_1-Rezeptors, nachgewiesen werden (Abbildung 3 A). Ebenso konnte bei allen vier Zelllinien LPA_2-Rezeptor (Molekulargewicht: 37 kDa), LPA_3-Rezeptor (50 kDa), LPA_4-Rezeptor (45 kDa), LPA_5-Rezeptor (37 kDa) und LPA_6-Rezeptor mit ca. 45 kDa (Abbildung 3 B-F) detektiert werden.

Für die Zellen der Linien 6606PDA, 7265PDA, 6606L und MIA PaCa- 2 ist somit die Expression aller sechs LPA-Rezeptoren nachgewiesen. Allerdings zeigt der Assay bei den MIA PaCa-2 Zellen eine deutlich schwächere Bande für den LPA_6-Rezeptor, sodass von einer geringeren Expression des Rezeptors oder einer verminderten Bindungsaffinität des Antikörpers an das humane LPA_6 Protein ausgegangen werden kann. Zur Bestätigung der Untersuchung wurde eine Wiederholungsanalyse mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

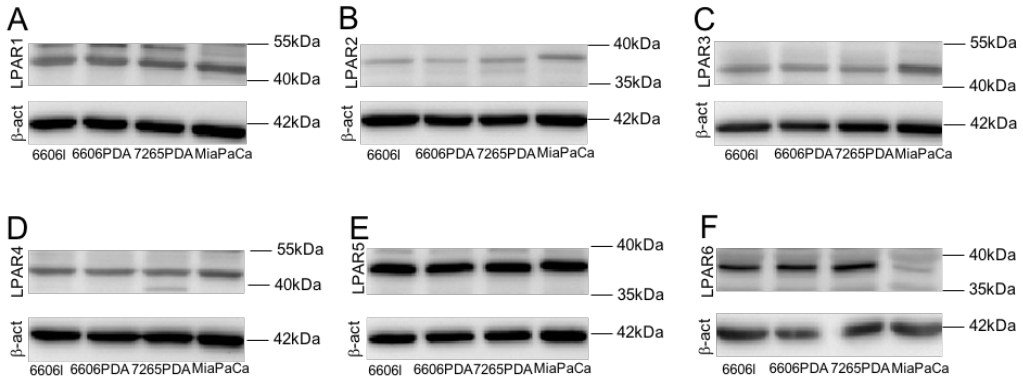

Abbildung 3: Expression der LPA1-6-Rezeptoren (A-F), Nachweis mittels Western Blot in den Ziellinien: 6606L, 6606PDA, 7265PDA, MIA PaCa-2, (n=2)

3.3. Evaluation der Zellmigration

3.3.1. Einfluss des Zellmediums auf die Zellmigration

Bei der Zellmigration handelt es sich um einen entscheidenden Schritt der Metastasierung. Durch Migration erfolgt die Lösung der Zelle aus dem Primärtumor mit anschließender Invasion weiterer Organe.

Um die Beeinflussung der Migration durch unterschiedliche Zellkulturbedingungen zu evaluieren, wurden Scratch-Assays durchgeführt. Dabei wurde die Geschwindigkeit,

mit der eine freie Fläche im Zellrasen verschlossen wird erfasst. Der Verschluss des Defektes erfolgt zum Teil durch Einwandern vorhandener Zellen vom Defektrand auf die freie Oberfläche und zum Teil durch die Proliferation der Zellen.

Um zu überprüfen, ob der verwendete Assay durch die Verwendung unterschiedlicher Zellmedien beeinflusst wird, erfolgte zunächst die Durchführung mit Standardzellmedium und Zellmedium ohne FCS. Die Geschwindigkeit, mit der sich der Scratch im Zellrasen der verwendeten 7265PDA-Zellen im beobachteten Zeitraum verschloss, betrug im Ansatz mit Medium ohne FCS im Mittel 5,19 µm/h. Bei Durchführung mit Standardmedium (mit 10 % FCS) betrug die Geschwindigkeit im Mittel 15,12 µm/h (Abbildung 4). FCS führte somit zu einer signifikanten Erhöhung der Geschwindigkeit, mit welcher die Zellfronten sich aufeinander zubewegen (n = 4, Man-Whitney Rank Sum Test, p= 0,029, Abbildung 4). Diese Verschlussgeschwindigkeit wird zumindest zu einem gewissen Anteil durch die Migration der Zellen erklärt. Es lässt sich feststellen, dass die Messung durch FCS haltiges Medium beeinflusst wird. Somit sollten Scratch Assays nach Möglichkeit unter Verwendung von FCS freiem Medium durchgeführt werden.

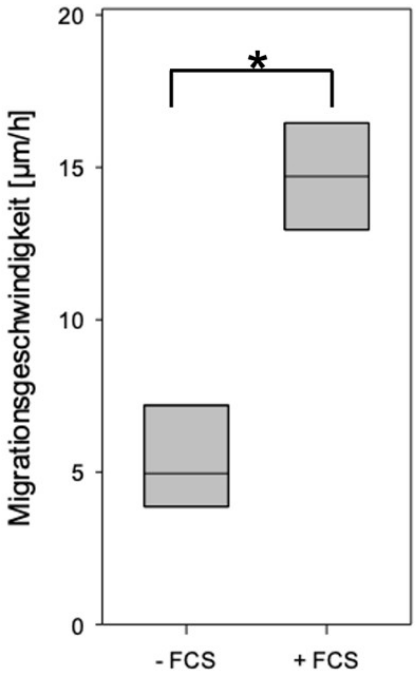

Abbildung 4: Der Verschluss des Zellrasens der 7265PDA-Zellen lässt sich durch FCS stimulieren. Durchführung eines Scratch-Assays und Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit mit und ohne Zugabe von FCS (p=0,029, (*) signifikanter Unterschied im Man-Whitney-Rank-Sum-Test; (n=4)

3.3.2. HEMMUNG DER MIGRATION DURCH CHEMOTHERAPEUTIKA

Um die Auswirkung einer Chemotherapie auf die Migration von Tumorzellen zu evaluieren, erfolgten Scratch Assays mit Zugabe der Therapeutika α-cyano-4-hydroxycinnamate (CHC) und Metformin. Um die Hypothese zu überprüfen, dass diese Therapeutika die Zellmigration hemmen, wurden die Migrationsassays an 6606PDA

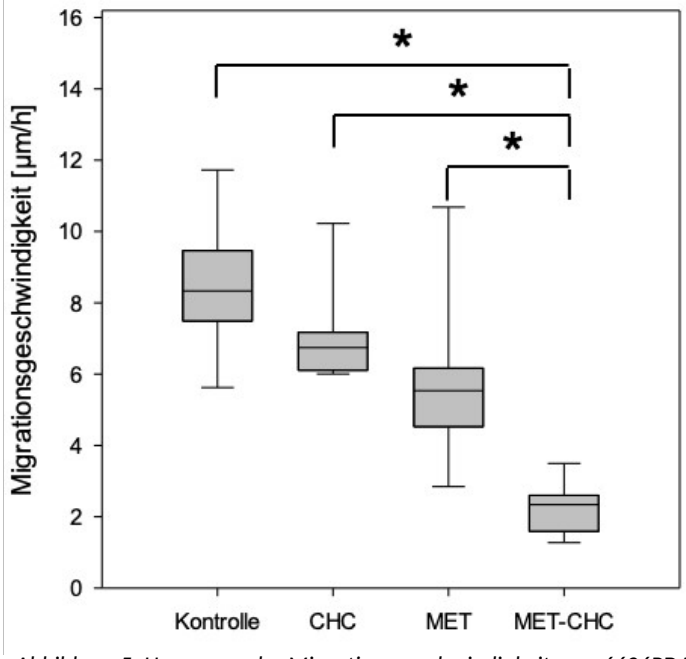

*Abbildung 5: Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit von 6606PDA Zellen durch Zugabe von Metformin und/ oder CHC. (n=6), p=0,002 für Metformin + CHC vs Kontrollgruppe,.*signifikante Unterschiede im Man-Whitney-Rank-Sum-Test (n=7), alle Ansätze mit FCS-haltigem Medium*

Zellen mit FCS im Medium durchgeführt. Diese Vorgehensweise verhinderte auch die Therapeutika induzierte Ablösung der Zellen vom Grund der Petrischale, wie sie bei Verwendung von FCS freien Medium beobachtet wurde. Im Kontrollansatz betrug die höchste Geschwindigkeit (9,68 µm/h), mit der sich die Zellfronten aufeinander zubewegten (Abbildung 5). CHC reduzierte die Geschwindigkeit auf 7,87 µm/h und nach Metformin Behandlung konnten wir eine mittlere Geschwindigkeit von 5,97 µm/h messen. Die Kombination aus CHC und Metformin reduzierte die Geschwindigkeit auf 2,73 µm/h. Damit sahen wir in sechs unabhängig durchgeführten Versuchen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und Metformin + CHC ($p<0,002$). Weiterhin führte die Kombinationstherapie zu einer ebenfalls signifikant geringeren Migrationsgeschwindigkeit als die Monotherapien ($p<0,002$).

3.3.3. EINFLUSS VON LPA AUF DIE MIGRATIONSGESCHWINDIGKEIT

Unter der Annahme, dass LPA die Zellmigration beschleunigt, wurden Migrationsassays ohne FCS aber mit Zugabe unterschiedlicher LPA-Konzentrationen an 7265PDA Zellen durchgeführt. Ohne LPA-Zugabe lag die mittlere Migrationsgeschwindigkeit bei 6,18 µm/h, bei Zugabe von LPA mit einer Konzentration von 2,5 µM erhöhte sich die Geschwindigkeit auf 10,86 µm/h (Abbildung 6A). Bei Zugabe von Medium mit einer LPA-Konzentration von 10 µM betrug die Geschwindigkeit 13,2 µm/h, bei der maximal verwendeten Konzentration von 40 µM wurde eine Geschwindigkeit von 13,88 µm/h erreicht. Somit führt bereits eine LPA-Konzentration von 2,5 µM zu einer signifikanten Steigerung der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle ohne LPA (Abbildung 6B).

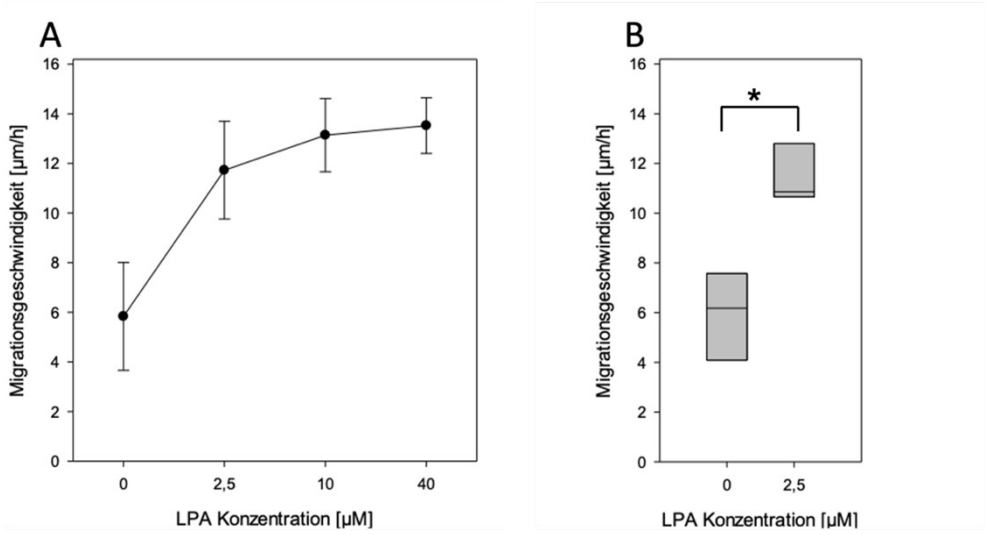

*Abbildung 6: LPA stimuliert die Migration von 7265PDA-Zellen. Durchführung eines Scratch-Assay zur Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dosisabhängig (A) und bereits bei einer Konzentration von 2,5 µmol LPA im Vergleich zu nicht mit LPA behandelten Zellen signifikant erhöht (B). Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch das Symbol * mit p=0,029 dargestellt. Anzahl der unabhängigen Scratch Assays: n=4.*

Weiterhin wurde überprüft, ob LPA auch die Migration der Zelllinie MIA PaCa-2 stimuliert. Identisch zum Versuch mit 7265PDA Zellen wurde LPA in den Konzentrationen 2,5 µM, 10 µM und 40 µM verwendet. Auch hier wurde FCS-freies Zellmedium verwendet.

Für die Kontrollgruppe ohne LPA-Zugabe betrug die gemessene Geschwindigkeit im Mittelwert 1,15 µm/h (Abbildung 7A). Für den Ansatz mit 2,5 µM LPA war die mittlere Migrationsgeschwindigkeit 1,79 µm/h, für 10 µM LPA 1,14 µm/h und für 40 µM LPA 1,21 µm/h. Für die Zelllinie MIA PaCa-2 konnte somit keine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Migrationsgeschwindigkeit beobachtet werden. Die geringfügige

Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit bei einer Konzentration von 2,5 µM LPA war im Vergleich zur Kontrolle statistisch nicht signifikant (Abbildung 7B).

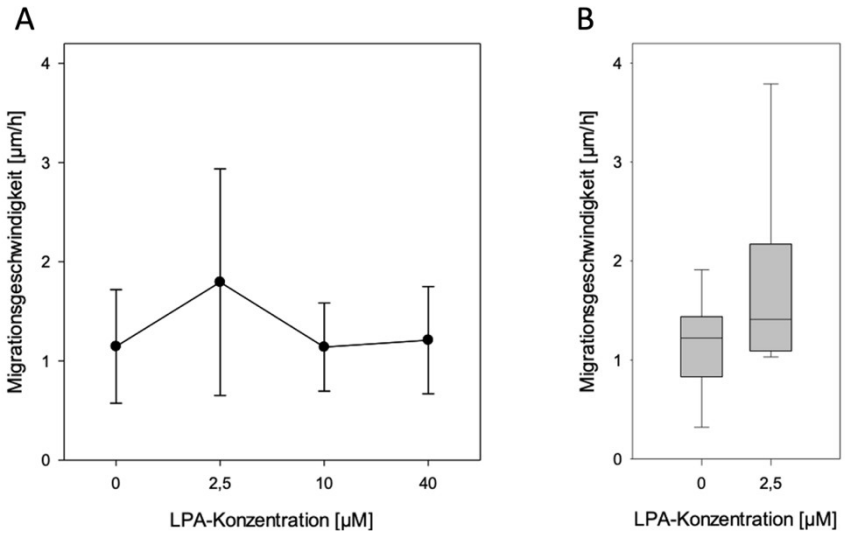

Abbildung 7: Die Migration von MIA PaCa-2-Zellen wird durch LPA nicht signifikant stimuliert. Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit mittels Scratch-Assay. Es lässt sich keine Dosisabhängigkeit nachweisen (A). Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit mit 2,5 µM vs. Kontrollgruppe waren nach Testung mit dem Man-Whitney-Rank-Sum-Test in fünf unabhängigen Messungen nicht signifikant (B).

3.3.4. Beeinflussung der Proliferation durch LPA

Um auszuschließen, dass LPA das Ergebnis des Scratch-Assays durch eine Stimulation der Zellproliferation anstatt der Induktion von Zellmigration beeinflusst, wurde der Einflusses von LPA auf die Zellproliferation von 7265PDA-Zellen mittels BrdU-Assay evaluiert. Um eine Stimulation der Proliferation durch FCS auszuschließen, wurde in diesem Experiment FCS-freies Medium verwendet. Bei der Kontrollgruppe lässt sich eine mittlere Absorption von 1,32 messen. Die Zugabe von 2,5 µM LPA führt zu einer leichten Steigerung auf 1,61, während 10 µM oder 40 µM LPA einen Absorptionswert von 1,58 bzw. 1,59 ergab. LPA führt damit zu einer geringfügigen Steigerung der Proliferation bei 7265PDA-Zellen, ohne dass hierbei eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu beobachten war (Abbildung 8A). Die Stimulation der Proliferation durch 2,5 µM LPA war hierbei nicht signifikant (Abbildung 8B).

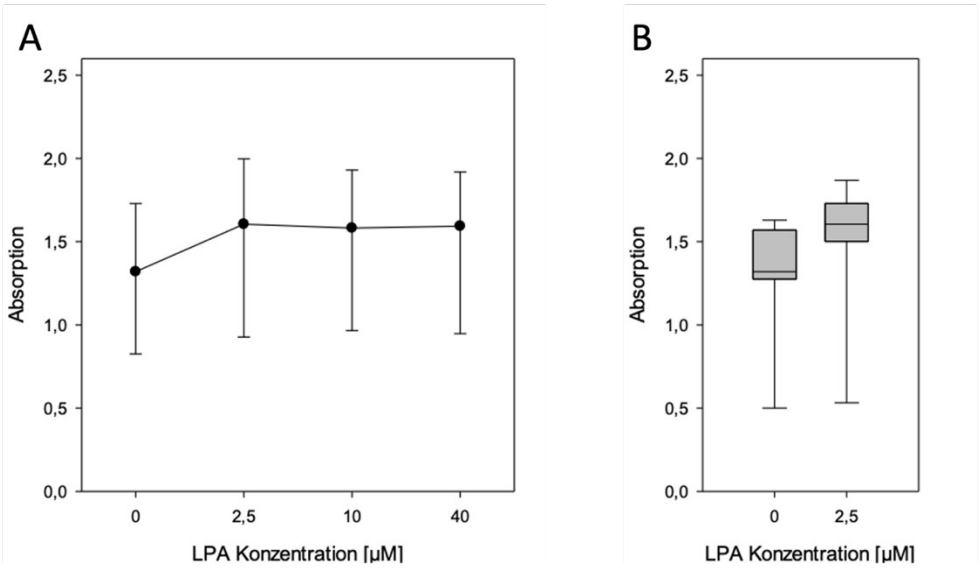

Abbildung 8: Die Proliferation von 7265PDA-Zellen wird durch LPA kaum stimuliert. Keine Dosisabhängigkeit der BrdU Inkorporation wurde nachgewiesen (A). Keine signifikant gesteigerte Proliferation wurde nach Zugabe von 2,5 µM LPA festgestellt; p>0,05; Man-Whitney-Rank-Sum-Test mit sieben unabhängigen Messungen.

Ebenso wurde der Einfluss von LPA auf die Proliferation der Zelllinie MIA PaCa-2 untersucht. In der Kontrollgruppe betrug die gemessene Absorption 0,8. Nach Zugabe von LPA in der Konzentration von 2,5 µM wurde eine Absorption von 0,72 gemessen. Somit kam es nur zu einer geringfügig verminderten Proliferation der Zellen. Die Zugaben von 10 µM LPA führte zu einer Zunahme der Absorption im Mittelwert auf 0,79 und bei 40 µM auf 0,88. So ergibt sich für die verschiedenen Konzentrationen keine klare Dosisabhängigkeit (Abbildung 9A). Im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Konzentration von 2,5 µM LPA wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (Abbildung 9B).

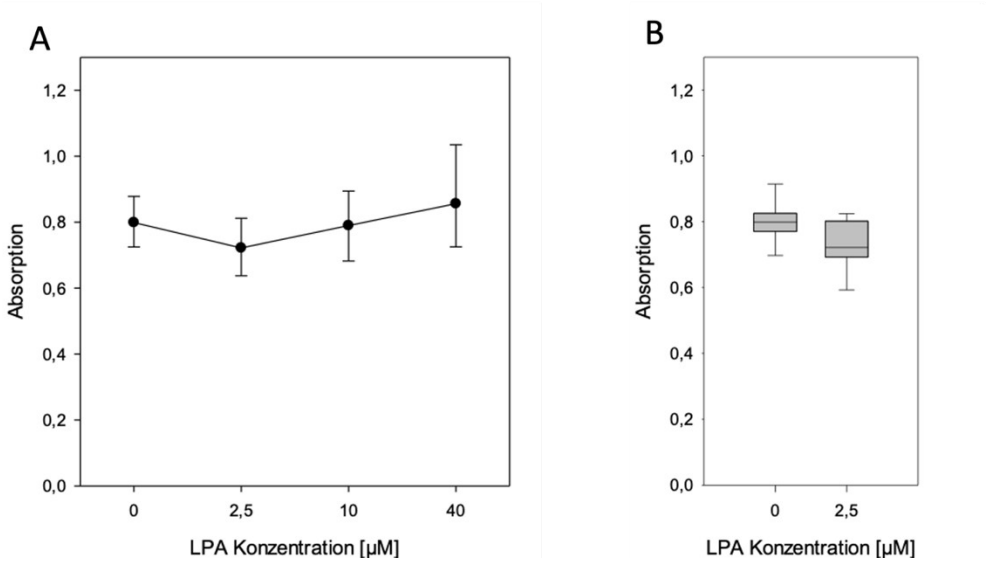

Abbildung 9: Proliferation von MIA PaCa-2-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von LPA. Im BrdU-Proliferationsassay wurde keine Dosisabhängigkeit zwischen Messung ohne LPA und verschiedenen LPA-Konzentrationen festgestellt (A). Die Inhibition der Proliferation durch Zugabe von 2,5 µM LPA war im Vergleich zur Kontrolle im Man-Whitney-Rank-Sum-Test mit sechs unabhängig durchgeführten Messungen statistisch nicht signifikant.

3.4. Einfluss von LPA auf Tumorgewicht und Metastasierung

3.4.1. Tumorinzidenz, Tumorgewicht & Metastasierung

Sowohl 7265PDA Zellen als auch MIA PaCa-2 Zellen wurden in Versuch 4 (V4) und 5 (V5) in die Bauspeicheldrüse von C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Mäusen injiziert und die Tumorinzidenz, das Tumorgewicht und die Metastasierungsrate ohne und mit LPA-Behandlung evaluiert (Tabelle 6). Einige Tiere wiesen im Versuchsverlauf eine progrediente Verschlechterung des Gesundheitszustandes auf, sodass, aufgrund der zuvor festgelegten Abbruchkriterien, die Euthanasie erfolgen musste. Weiterhin kam es auch zum plötzlichen, unvorhergesehenen Versterben von Tieren, sodass diese nicht in die Auswertung aufgenommen werden konnten, da eine zeitnahe Autopsie meist nicht möglich war. Kam es unmittelbar perioperativ (≤ 3 Tage nach Zellinjektion) zum Versterben der Tiere wurden diese ebenfalls aus der Auswertung ausgeschlossen. Diese Tiere sind in Spalte drei aufgeführt. Nach Injektion von 7265PDA ohne den Zusatz von LPA betrug die durchschnittliche Überlebenszeit der Mäuse 20 Tage (Tabelle 6 Zeile 1). Bei 100 % Tumorinzidenz wurde ein mittleres Gewicht der Tumoren von 411 mg beobachte. Bei allen Tieren konnte eine hepatische Metastasierung oder Peritonealkarzinose nachgewiesen werden. Bei zwei von dreien (67 %) außerdem eine pulmonale Metastasierung. Auch bei den sechs Tieren, welche mit 7265PDA und LPA injiziert wurden, musste aus gesundheitlichen Gründen eine vorzeitige Euthanasie mit Gewebeentnahme durchgeführt werden. Die Gewebeentnahme erfolgte durchschnittlich an Tag 20 (Tabelle 6 Zeile 2). Auch hier wurde bei allen Tieren ein Primärtumor mit einem durchschnittlichen Tumorgewicht von 181 mg identifiziert. In allen Fällen konnte eine hepatische Metastasierung oder Peritonealkarzinose nachgewiesen werden. In vier von sechs Fällen (67 %) konnten in der histologischen Untersuchung Lungenmetastasen beobachtet werden.

Tabelle 6: Einfluss von LPA auf Tumorentwicklung und Metastasen nach Injektion von 7265PDA und MIA PaCa-2 Zellen in das Pankreas

Mausstamm	Anzahl Versuchstiere	Perioperative Mortalität (≤3 d)	Überleben nach Tumorzell-injektion X±STABW [d]	Tumorinzidenz	Tumorgewicht [mg]	Hepatische Metastasierung oder Peritonealkarzinose	Metastasierung (Lunge)
Injektion von 1µl (0,5x10^5 Zellen) **7265PDA (Tumorentnahme Tag 26-27 n.I.) (V4)**							
129S4-Rag2Il2rg	3	0/3	20±0,47	100 % (3/3)	411±23	100 % (3/3)	67 % (2/3)
Injektion von 1µl (0,5x10^5 Zellen) **7265PDA + LPA (Tumorentnahme Tag 16-27 n.I.) (V4)**							
129S4-Rag2Il2rg	6	0/6	20,2±1,60	100 % (6/6)	181±73	100 % (6/6)	67 % (4/6)
Injektion von 1µl (0,5x10^5 Zellen) **MIA PaCa-2luc+PSCA (Tumorentnahme Tag 77-85 n.I.) (V4+5)**							
129S4-Rag2Il2rg	6	0/6	82±3,1	83 % (5/6)	917± 711	83 % (5/6)	33% (2/6)
Injektion von 1µl (0,5x10^5 Zellen) **MIA PaCa-2luc (Tumorentnahme Tag 43-72 n.I.) (V4+5)**							
129S4-Rag2Il2rg	7	1/7	62±10,3	100 % (6/6)	733±405	83 % (5/6)	83 % (5/6)
Injektion von 1µl (0,5x10^5 Zellen) **MIA PaCa-2luc+PSCA+LPA (Tumorentnahme Tag 61-85 n.I.) (V5)**							
129S4-Rag2Il2rg	7	1/7	54±33,5	80 % (4/5)	483±343	60 % (3/5)	60 % (3/5)
Injektion von 1µl (0,5x10^5 Zellen) **MIA PaCa-2luc+LPA (Tumorentnahme Tag 60-85 n.I.) (V5)**							
129S4-Rag2Il2rg	7	1/7	65±29,3	33 % (2/6)	899±221	33 % (2/6)	17 % (1/6)

Nach Injektion von unterschiedlichen MIA PaCa-2 Zelllinien in das Pankreas wurde die Tumorentwicklung und Metastasierung mit und ohne LPA-Administration analysiert. Nach Injektion der MIA PaCa-2luc+PSCA-Zelllinie und ohne zusätzliche LPA-Administration (V4 +5) betrug das durchschnittliche Überleben 82 Tage und das durchschnittliche Tumorgewicht lag bei 917 mg (Tabelle 6 Zeile 3). Bei fünf dieser sechs Tiere (83 %) konnte eine hepatische oder peritoneale Metastasierung nachgewiesen werden. Bei zwei der untersuchten Tiere zeigten sich außerdem pulmonale Metastasen nach einer histologischen Untersuchung der Lunge (33 %).
Die Injektion von MIA PaCa-2luc erfolgte in insgesamt sieben Tiere (V4+5). Ein Tier verstarb kurz nach der Zellinjektion. Die verbliebenen sechs Tiere überlebten

durchschnittlich 62 Tage. Bei deren Autopsie konnte bei jedem Tier ein pankreatischer Tumor asserviert werden. Das mittlere Tumorgewicht betrug 733 mg (Tabelle 6 Zeile 4). Fünf von sechs Mäusen (83 %) wiesen eine makroskopisch sichtbare hepatische Metastasierung oder Peritonealkarzinose auf, ferner konnte bei diesen auch eine pulmonale Metastasierung (83 %) in der histologischen Untersuchung nachgewiesen werden.

Nach der Injektion von MIA PaCa-2luc+PSCA und erfolgter LPA-Behandlung musste 1 von 7 Tieren wegen perioperativer Mortalität von der Auswertung ausgeschlossen werden. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 54 Tagen. Ein weiteres Tier verstarb plötzlich im Verlauf und konnte nicht analysiert werden. In der abschließenden Gewebeentnahme konnte bei vier der fünf verbliebenen Tiere ein abgrenzbarer Primärtumor isoliert werden (80 %). Das mittlere Tumorgewicht lag dabei bei 483 mg (Tabelle 6 Zeile 5). In drei der fünf Tiere kam es zu makroskopisch Lebermetastasen oder eine peritoneale Metastasierung (60 %). In den drei Fällen konnte auch in der histologischen Untersuchung eine pulmonale Metastasierung nachgewiesen werden (60 %). Bei dem Versuchsansatz MIA PaCa-2luc+LPA, welcher an insgesamt sieben Tieren durchgeführt wurde, verstarb ein Tier plötzlich und drei Tage nach Zellinjektion an vermutlich injektionsbedingten Folgen, sodass auf eine Gewebeasservierung verzichtet wurde (perioperatives Versterben 1/7, Tabelle 6 Zeile 6). Bei den verblieben sechs Tieren erfolgte die Asservierung im Durchschnitt 65 Tage nach der Injektion. Bei zwei der Tiere konnten abgrenzbare Tumoren asserviert werden (33 %). Der Mittelwert des Tumorgewichts lag bei 899 mg (Tabelle 6 Zeile 6). Bei diesen beiden Tieren kam es zu einer hepatischen oder peritonealen Metastasierung (33 % aller Tiere) und bei einer Maus konnte eine pulmonale Metastase detektiert werden (17 % aller Tiere).

Um einen Einfluss von LPA auf das Tumorwachstum übersichtlich darzustellen, wurde das Tumorgewicht der zwei MIA PaCa-2 Zelllinien mit und ohne LPA-Behandlung graphisch dargestellt (Abbildung 10). Bei MIA PaCa-2luc+PSCA-Zellen betrug das mediane Gewicht dieser Tumoren 745 mg (Mittelwert 745 mg zum Vergleich in Tabelle 6). Das mediane Tumorgewicht nach Injektion von MIA PaCa-2luc Zellen betrug 872 mg (der Mittelwert lag bei 733 mg). Bei den Tieren, welche eine Injektion mit MIA PaCa-2luc+PSCA erhielten, ergab sich ein medianes Tumorgewicht von 451 mg (Mittelwert: 483 mg). Bei sieben Tieren mit Injektion von MIA PaCa-2 luc Zellen und anschließender Injektion von LPA konnten nur zwei Tumoren isoliert werden. Das Gewicht der beiden entnommenen Tumoren betrug 1055 mg und 743 mg (Median und

Mittelwert 899 mg). Durch die Applikation von LPA war somit keine signifikante Beeinflussung des Tumorgewichts zu verzeichnen.

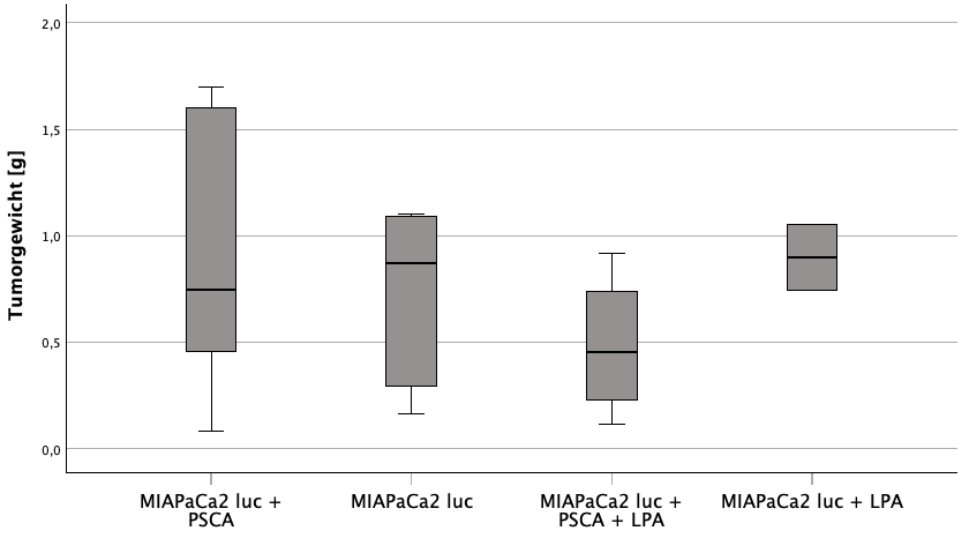

Abbildung 10: Einfluss von LPA auf das Tumorgewicht. Nach orthotoper Injektion zweier Luciferase-exprimierender MIA PaCa- 2-Zelllinien wurde jeweils ein Teil der Mäuse mit LPA oder einer Kontrolllösung (HBSS) injiziert. Darstellung mittels Boxplot. MIA PaCa-2luc+PSCA (n=5), MIA PaCa-2luc (n=6), MIA PaCa-2luc+PSCA und Injektion von LPA (n=4), MIA PaCa-2luc und Injektion von LPA (n=2),

3.4.2. Anwendung von Bildgebenden Verfahren

In Versuch 5 erfolgte die mehrfache Anwendung von bildgebenden Verfahren zur Detektion pankreatischer Tumoren und eventueller Metastasen. Hierfür wurden ^{18}FDG-PET/CT, MRT, und NightOwl-Imaging durchgeführt.

In den durchgeführten ^{18}FDG-PET/CT Untersuchungen erkennt man eine deutliche Traceranreicherung im abgebildeten Tumor, wie in Abbildung 11 vor allem in den axialen und koronaren Rekonstruktionen zu sehen ist. Die renale Exkretion des Tracers beim ^{18}FDG-PET/CT führte auch zu einer Tracer Anreicherung in Nieren und Harnblase. Durch die kardiale Verstoffwechslung kam es außerdem zu einer Signalanreicherung im Myokard. Somit wurden durch den PET-Tracer nicht nur der Tumor, sondern auch andere Organe markiert.

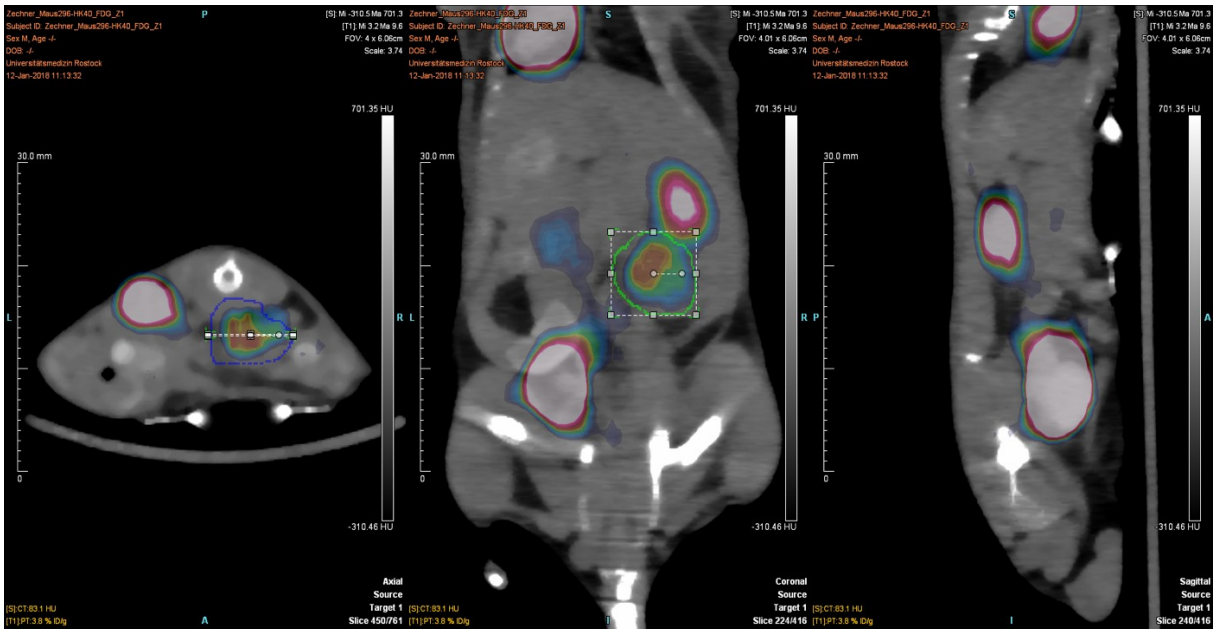

Abbildung 11: ^{18}FDG-PET/CT der Maus HK40 am Tag 60 nach Tumorzellinjektion. Anreicherung der 18Fluor-Desoxyglukose im Tumor, sowie ebenso Anreicherung im Herzmuskel und in den Nieren und Harnorganen. In der axialen und koronaren Schnittebene ist der Tumor markiert.

In der Durchgeführten MRT-Untersuchung konnte der Tumor klar vom umgebenden Gewebe abgegrenzt werden und auch eine Bestimmung des Tumorvolumens war ohne weiteres möglich. Beginnende oder sehr kleine Metastasen, liegen allerdings unter der Ortsauflösung oder können nur von geschulten Betrachtern nachgewiesen werden (Abbildung 12).

Abbildung 12: MRT in T2 Wichtung der Maus HK40 am Tag 60 nach Tumorzellinjektion. Koronarer Schnitt. Es zeigt sich abgrenzbar der Tumor im Bereich des Pankreas (roter Pfeil).

Durch die intraperitoneale Injektion von Luciferin gelang die Darstellung des Tumors mittels NightOwl-Imaging. Dabei wurde die Tumorausdehnung auf die Körperoberfläche des Tieres projiziert (Abbildung 13). Im Gegensatz zu ^{18}FDG-PET/CT konnte durch NightOwl-Imaging nur spezifisch der Tumor visualisiert werden. Diese hohe Spezifität lässt sich durch die exklusive Expression des Luciferasegens in den Tumorzellen begründen.

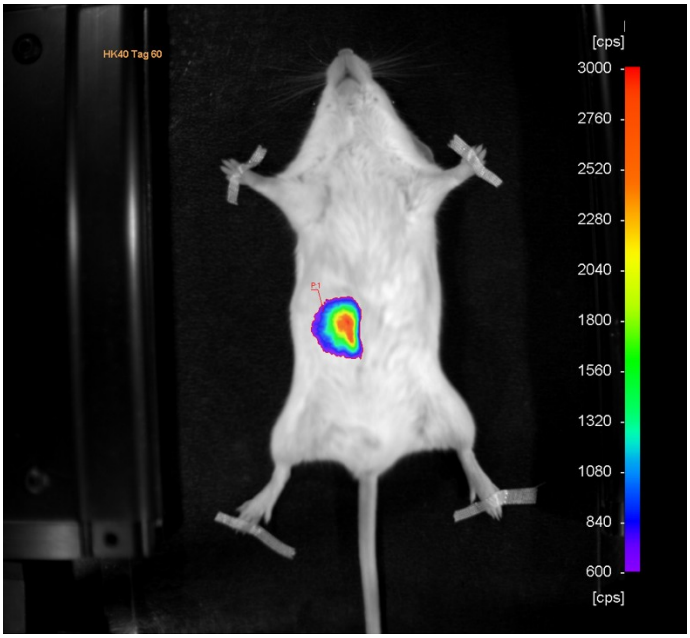

Abbildung 13: NightOwl-Imaging des lumineszierenden Tumors der HK40 Maus am Tag 60 nach intraperitonealer Injektion von Luciferin.

3.4.3. Sensitivität und Spezifität des Imaging mit Night-Owl

Die erste Bildgebung mittels Lumineszenz-Imaging erfolgte ca. 30 Tage nach Zellinjektion bei 24 Tieren, die zweite Bildgebung wurde an 23 Tieren nach ca. 60 Tage durchgeführt und die finale Bildgebung erfolgte noch an 10 Tieren nach ca. 90 Tagen. Durch die gesundheitliche Verschlechterung der Tiere und notwendige Euthanasie konnte die Bildgebung nicht bei allen Tieren im gesamten Verlauf durchgeführt werden. Im Verlauf über die drei Beobachtungszeitpunkte verstärkte sich die Lumineszenz (Abbildung 14). Dies wird vermutlich durch das Wachstum der Tumoren verursacht.

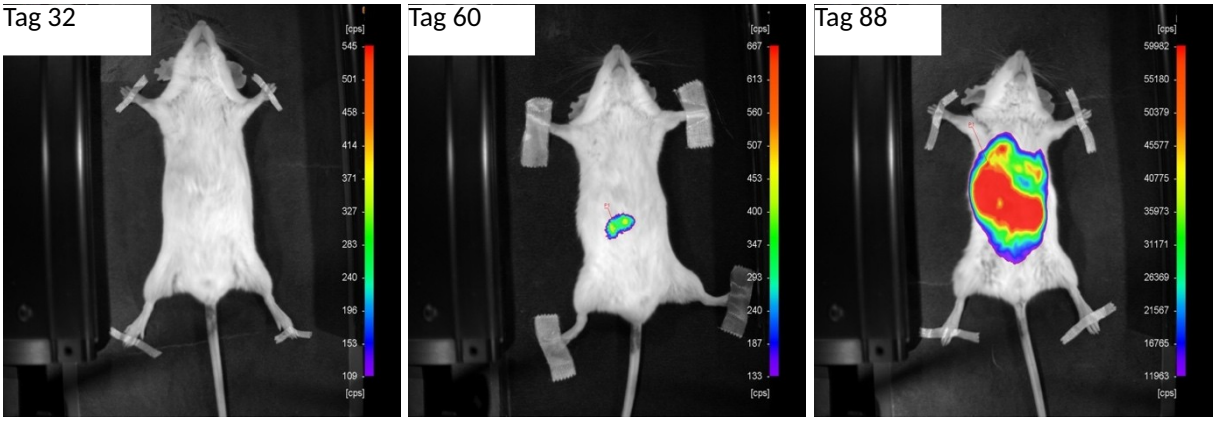

Abbildung 14: Tumorausdehnung MiaPaCa-2-luc im Verlauf des Experiments, Versuchsrunde 5, Darstellung mittels Night-Owl-Imaging.

In der ersten Bildgebung sah man bereits bei 11 von 24 Tieren ein Lumineszenzsignal, welches als Vorhandensein eines Tumors gewertet wurde. In der zweiten Bildgebung war dies bei 18 von 23 Tieren sichtbar, in der letzten durchgeführten Bildgebung war bei fünf von zehn Tieren ein Signal detektierbar (Tabelle 7).

Tabelle 7: Darstellung der Tumoren mittels Night-Owl

	1. Bildgebung	2. Bildgebung	3. Bildgebung
Durchgeführt	24	23	10
Lumineszenzsignal	11	18	5
kein Lumineszenzsignal	13	5	5

Setzt man die Bildgebung in Kontext zur Gewebeentnahme so konnte bei 16 Tieren ein Signal im Night-Owl Imaging und ein abgrenzbarer Tumor während der Gewebeentnahme gesehen werden. Ein Versuchstier wies in der abschließenden Autopsie einen makroskopisch sichtbaren Primärtumor auf, welcher bei allen drei bildgebenden Untersuchungen nicht detektiert werden konnte. Das Tumorgewicht betrug in diesem Fall jedoch lediglich 82 mg. Bei zwei Tieren ließ sich im Night-Owl Imaging ein Tumor erkennen, der bei der Gewebeentnahme jedoch nicht isoliert werden konnte (siehe Abbildung 15). Allerdings konnte nur ein Lumineszenz-Signal bei Rückenlage der Maus festgestellt werden. In Bauchlage (Aufnahme von dorsal) konnte kein Signal detektiert werden (Daten werden nicht gezeigt). Im Vergleich zu Tieren mit identifizierbarem Tumor war die Lumineszenz deutlich schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 15).

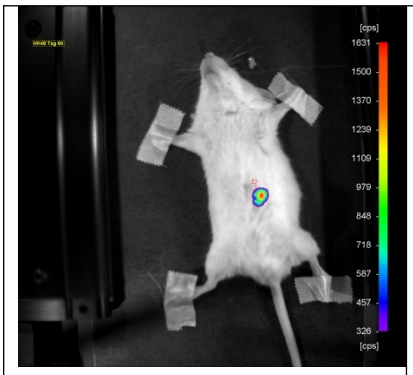	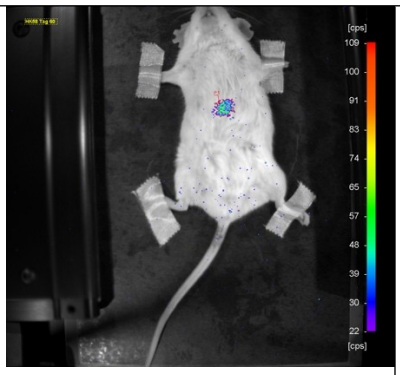	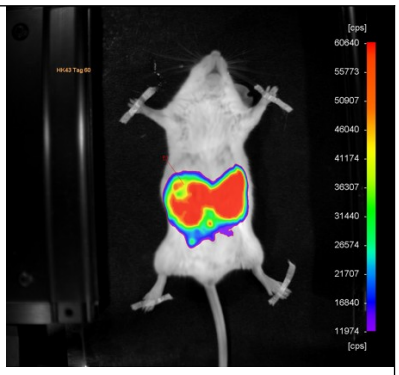
HK48 Tag 60 Kein Tumor Gewebeentnahme Tag 63	HK58 Tag 60 Kein Tumor Gewebeentnahme Tag 63	HK43 Tag 60 Tumorgewicht 0,9 g Gewebeentnahme Tag 65

Abbildung 15: Bildgebung mittels Night-Owl an Tag 60. Die Versuchstiere HK48 und HK58 zeigten nach Applikation von Luciferase ein schwaches Lumineszenzsignal, ohne dass bei der späteren Autopsie ein Pankreastumor identifiziert werden konnte. Bei makroskopisch sichtbarem Pankreastumor konnte eine deutlich stärker ausgeprägte Lumineszenz detektiert werden.

Bei vier Tieren konnte weder mittels Night-Owl-Imaging noch während der Gewebeentnahme ein Tumor festgestellt werden.

Stellt man zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifizität das Night-Owl-Imaging dem Goldstandard, die Identifizierung der Tumoren bei Gewebeentnahme, in einer Kreuztabelle (Tabelle 8) gegenüber, so ergibt sich eine Sensitivität von 0,94 und eine Spezifizität von 0,66. Dabei ist die Sensitivität der Quotient aus der Anzahl der Mäuse mit Tumor mit Lumineszenz Signal (16) durch alle Mäuse mit Tumor (17). Die Spezifität ergibt sich als Quotient der Anzahl der Mäuse ohne Tumor und ohne Lumineszenz Signal (4) durch die Zahl aller Tiere ohne Tumor (6).

Tabelle 8: Vergleich der Detektion von Tumoren mittels Night-Owl-Imaging vs. Gewebeentnahme

		Gewebeentnahme	
		Tumor (17)	Kein Tumor (6)
Night-Owl-Imaging	Lumineszenz (18)	16	2
	Keine Lumineszenz (5)	1	4

Um die Zunahme der Lumineszenz graphisch darzustellen, wurde die Photonenemission pro Sekunde an den unterschiedlichen Bildgebungszeitpunkten gemessen und für die einzelne Tiere mittels Linien in einem Graphen dargestellt (Abbildung 16). Zur besseren Darstellbarkeit der Verläufe der einzelnen Versuchstiere ist die Skalierung der Y-Achse in den Diagrammen A-D welche die verschiedenen

Versuchsgruppen darstellen unterschiedlich gewählt. T1-T3 stellen die verschiedenen Messzeitpunkte im Abstand von ca. 30 Tagen dar. Durch Ausbleiben eines Lumineszenzsignals kommt es teilweise zur Projektion des Graphen auf die X-Achse.

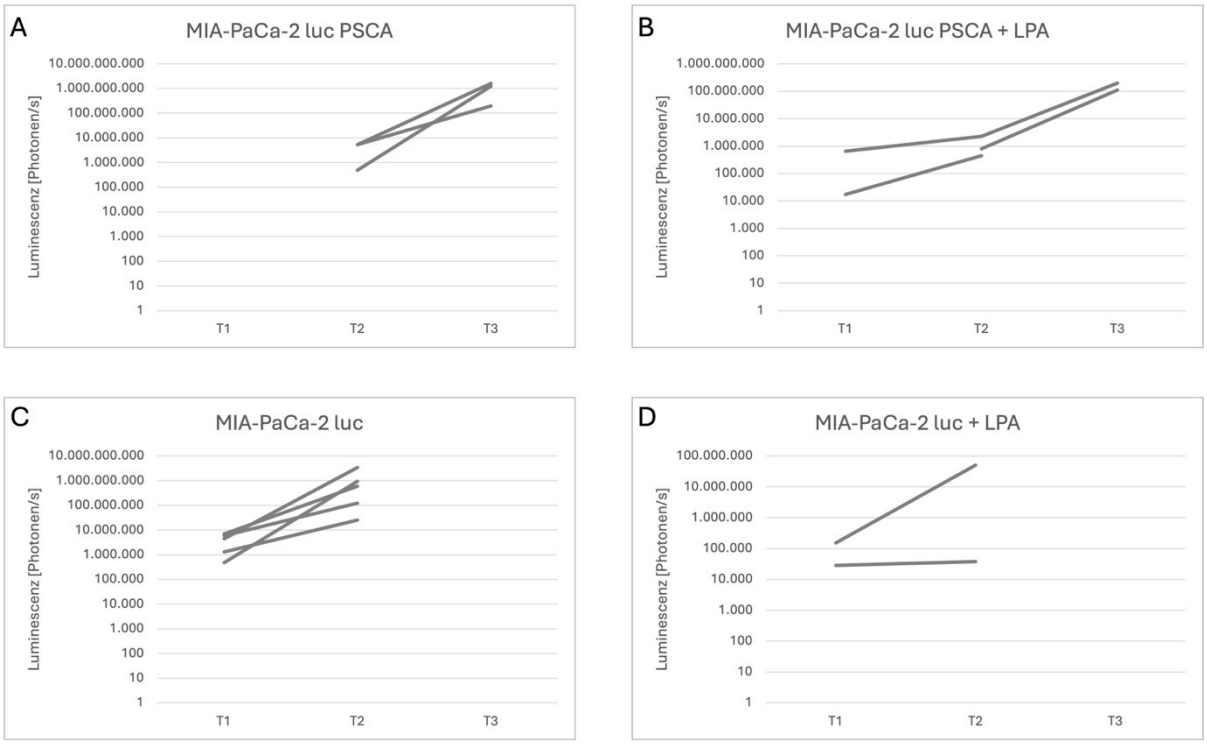

Abbildung 16: Messung des Lumineszenz Signals beim Night-Owl-Imaging. Auftragung der Lumineszenz in Photonen/s gegen die drei Messzeitpunkte für die verschiedenen Versuchsgruppen. Darstellung in Logarithmischer Darstellung (Dekadischer Logarithmus)

Nach Injektion von MIA PaCa-2-luc-Zellen mit PSCA-Expression wurde bei keinem der sechs Tiere bis zum Zeitpunkt T1 ein Lumineszenzsignal detektiert (Abbildung 16A). Am Zeitpunkt T2 zeigt sich bei vier Tieren ein Signal. Die Intensität des Signals nimmt bei allen Tieren bis zum Zeitpunkt T3 zu, wobei anzumerken ist, dass eine der Mäuse vor T3 euthanasiert werden musste (keine Linie gezeigt.)

Der Verlauf der Tiere, welche MIA PaCa-2 luc PSCA + LPA injiziert bekommen hatten ist in Abbildung 16B dargestellt. Am Zeitpunkt T1 wurde bei zwei der Tiere bereits ein Signal detektiert, dieses nahm zum Zeitpunkt T2 zu, danach musste ein Tier aufgrund gesundheitlicher Komplikationen aus dem Experiment genommen werden. Bei dem zweiten Tier sieht man eine Zunahme des Signals bis T3. Bei einem dritten Tier war an T2 ebenfalls ein Signal messbar und auch eine Zunahme bis T3. Zwei weitere Tiere zeigten an T2 ein Signal, schieden jedoch ebenfalls aufgrund Gesundheitsproblemen aus dem Experiment aus (fehlende Linie im Diagramm)

Abbildung 16C zeigt die Tiere nach Injektion von MIA PaCa-2 luc. Bei sechs der sieben Tiere konnte am Zeitpunkt T1 bereits ein Signal detektiert werden. Eines verstarb vor

T2, bei den fünf übrigen verstärkte sich das Signal bis T2. Da die Tiere danach aus dem Experiment entfernt wurden, erfolgte keine weitere Messung mehr. An einem Tier wurde lediglich an T2 Lumineszenz beobachtet, jedoch konnte keine weitere Bildgebung mehr durchgeführt werden (keine Linie).

Der Verlauf der Tiere nach Injektion von MIA PaCa-2 luc + LPA ist in Abbildung 16D dargestellt. Zum Zeitpunkt T1 wurde bei zwei Mäusen ein Signal detektiert, dieses nahm bis zum Zeitpunkt T2 zu. Am Zeitpunkt T2 zeigte sich bei weiteren zwei Tieren ein Signal. Bei allen Tieren wurde der Versuch abgebrochen, bevor eine weitere Messung stattfinden konnte (kein Verlauf für die beiden letzteren Tiere).

Mit Hilfe des Night-Owl Imaging konnten auch Metastasen in entnommenen Organen dargestellt werden (Abbildung 17). Dies konnte durch die im nächsten Kapitel beschriebenen histologischen Untersuchungen verifiziert werden.

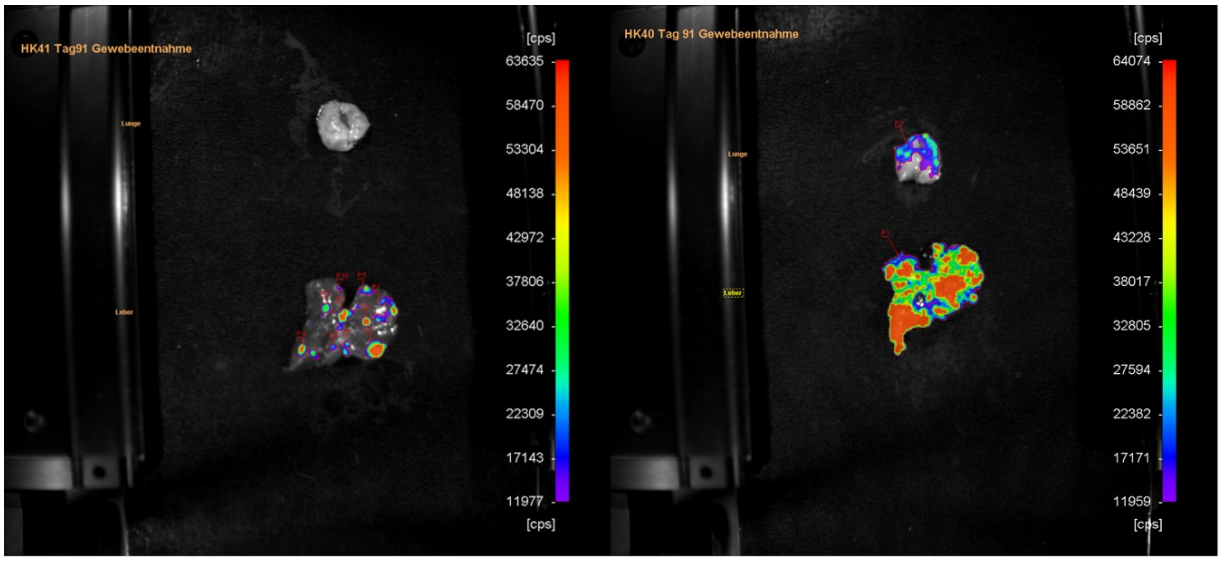

Abbildung 17: Night-Owl Imaging der Lunge (oben) und Leber (unten) kurz nach Gewebeentnahme nach Gabe von Luciferin. links: Lumineszenzsignal in der Leber bei Maus HK41, rechts: Lumineszenzsignal in Lunge und Leber bei Maus HK40.

3.4.4. HISTOLOGIE

Die histologische Untersuchung sowohl der Primärtumoren als auch der Leber- und Lungenmetastasen wurden nach H/E Färbung zuerst in Mäusen, die nicht mit LPA behandelt wurden, untersucht. Beispielhafte Gewebeschnitte werden in Abbildung 18 präsentiert. 7265PDA Zellen entwickeln sich zu gut abgrenzbaren Primärtumoren innerhalb des Pankreasgewebes. Dabei ist in den Randbereichen häufig eine desmoplastische Reaktion erkennbar (Abbildung 18A). Nach orthotoper Injektion von 7265PDA Zellen konnten gut abgrenzbare Lebermetastasen (Abbildung 18B) und

auch kleine Lungenmetastasen (Abbildung 18C) identifiziert werden. Nach orthotoper Injektion von MIA PaCa-2luc Zellen schien das Tumorgewebe eher infiltrativ in das umgebende Gewebe einzuwachsen (Abbildung 18D). Weiterhin konnten Lebermetastasen, die teils ein invasiveres Wachstum zeigten (Abbildung 18E), identifiziert werden. In der Lunge wurden teilweise sehr große, häufig peripher gelegene Metastasen beobachtet (Abbildung 18F). Auch nach orthotoper Injektion von MIA PaCa-2luc+PSCA-Zellen konnten Primärtumoren (Abbildung 18G) und Lebermetastasen nachgewiesen werden (Abbildung 18H). Weiterhin konnten in der histologischen Aufarbeitung der Lunge kleine, aber zahlreiche Lungenmetastasen nachgewiesen werden (Abbildung 18I).

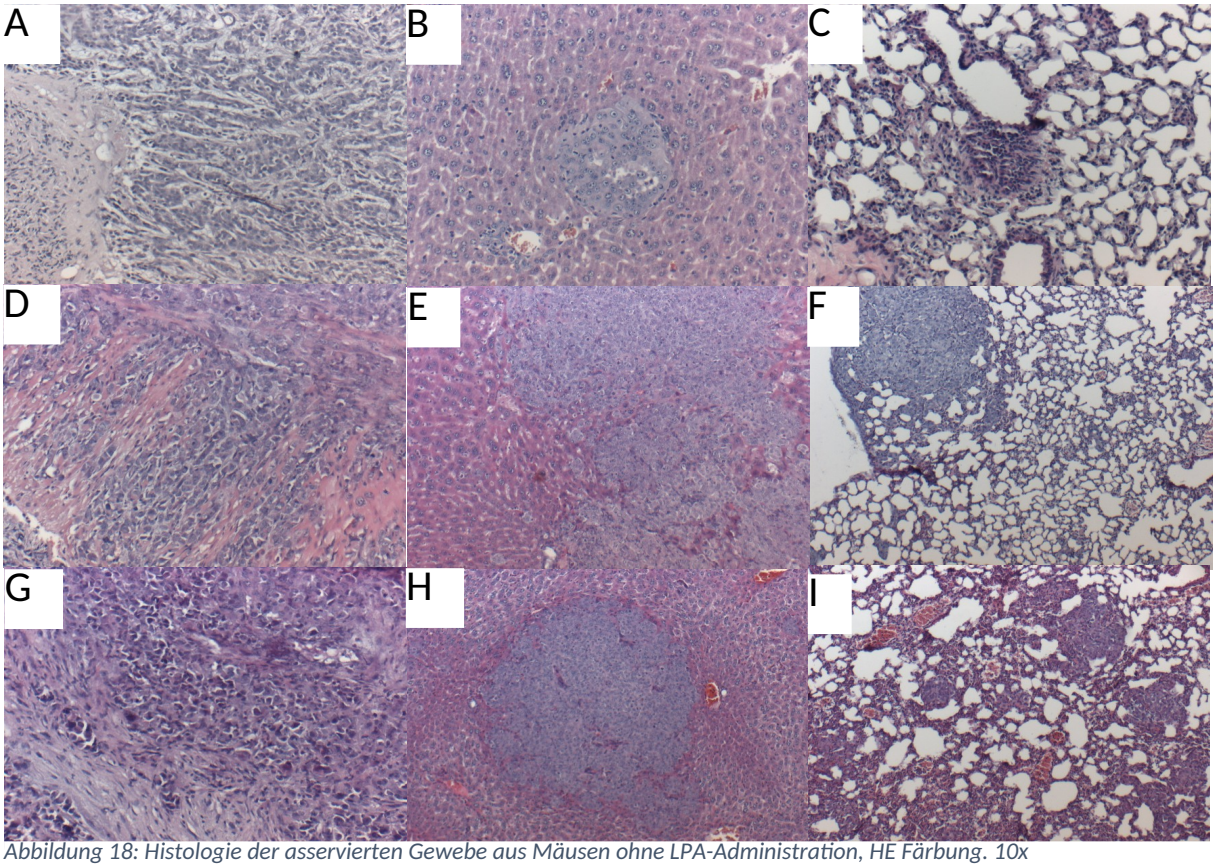

Abbildung 18: Histologie der asservierten Gewebe aus Mäusen ohne LPA-Administration, HE Färbung. 10x Objektivvergrößerung Zeile 1:7265PDA, Zeile 2: MIA PaCa-2luc, Zeile 3: MIA PaCa-2luc+PSCA. Beispielaufnahmen eines Primärtumors (A,D,G), Lebermetastasen (B,E,H) und Lungenmetasten (C,F,I)

Die Histologie der Primärtumoren und der Metastasen wurde auch in Mäusen, die mit LPA behandelt wurden, evaluiert (Abbildung 19). Nach Injektion von 7265PDA Zellen entwickelte sich ein asservierbarer Primärtumor (Abbildung 19A). In der überwiegenden Anzahl der Mäuse konnten Lebermetastasen (Abbildung 19B) und teils auch Lungenmetastasen (Abbildung 19C) identifiziert werden. Nach orthotoper Injektion von MIA PaCa-2luc Zellen mit Zugabe von LPA wurden ebenfalls Primärtumoren (Abbildung 19D) und Lebermetastasen (Abbildung 19E) identifiziert. In

einem Tier wurde in der Lunge eine Metastase identifiziert (Abbildung 19F). Nach orthotoper Injektion von MIA PaCa-2luc+PSCA-Zellen waren die Tumoren sehr heterogen und eine ausgeprägte Stromabildung wurde beobachtet (Abbildung 19G). Hepatische Metastasen waren klar abgrenzbar zum umgebenden Lebergewebe (Abbildung 19H) und in der Lunge wurden kleinen randständige Metastasen detektiert (Abbildung 19I).

Insgesamt konnten anhand der histologischen Untersuchung keine Unterschiede zwischen den Geweben von Tieren mit LPA-Behandlung zu denen ohne LPA-Behandlung beobachtet werden. Tumoren aus 7265PDA Zellen wiesen ein eher lockerer erscheinendes Tumorbild auf dabei bildete sich häufig ein bindegewebiger Randsaum zum umgebenden Gewebe. Die nachweisbaren Metastasen in Leber und Lunge waren klar identifizierbar und bis auf einige Fälle nach Injektion von MIA PaCa- 2luc (Abbildung 19E) klar vom umgebenden Lebergewebe abgrenzbar.

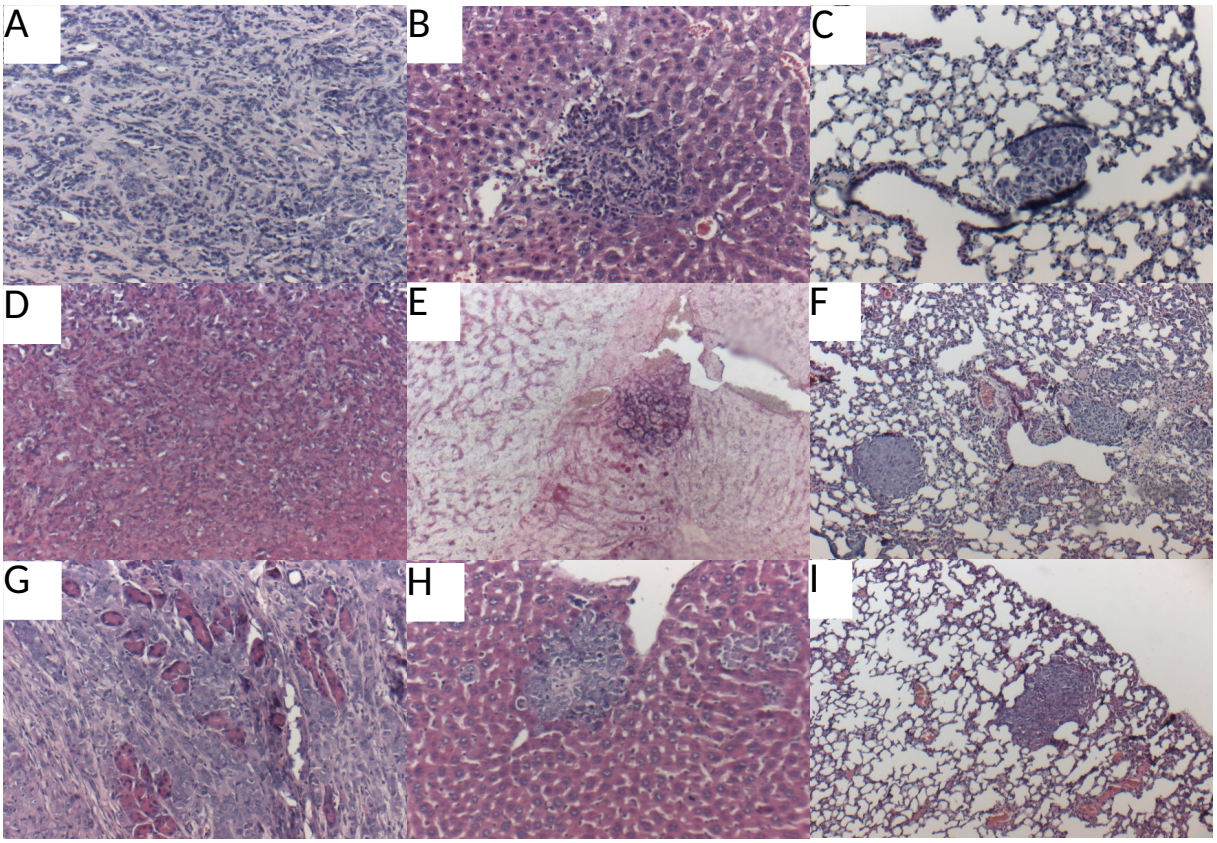

Abbildung 19: Histologische Schnitte der asservierten Gewebe bei Mäusen mit zusätzlicher LPA-Injektion. HE-Färbung. 10x Objektivvergrößerung Zeile 1:7265PDA, Zeile 2: MIA PaCa-2luc, Zeile 3: MIA PaCa-2luc+PSCA Primärtumoren (A,D,G) Leber (B,E,H) Lunge (C,F,I)

4. Diskussion

4.1. Diskussion von Material und Methoden

4.1.1. Vor- und Nachteile des Scratch-Assays

Um eine Aussage über die Migrationsfähigkeit der PDA-Zellen zu treffen, wurde zunächst *in vitro* untersucht inwiefern sich die Zellmigration durch die Zugabe verschiedener Therapeutika wie auch LPA beeinflussen lässt. Wir entschieden uns hier für den im Aufbau simplen Scratch-Assay, welcher auch als *Wound Healing Assay* bekannt ist(149). Trotz des einfachen Aufbaus und der unkomplizierten Durchführung lassen sich damit valide Messungen durchführen und einen Vergleich der Migrationsgeschwindigkeit von Zellen in den verschiedenen Versuchsansätzen bestimmen(149, 150). Im Vergleich zu anderen Migrations-Assays wie beispielweise dem Boyden-Chamber-Assay oder Transwell-Assay(151, 152), migrieren die Zellen eindimensional auf dem Untergrund einer Petrischale. Es handelt sich deshalb um einen reinen Migrations-Assay, der keine Aussage zur Invasionsfähigkeit der Tumorzellen treffen kann. Der Scratch-Assay überzeugt mit seiner leichten Durchführbarkeit, den geringen Kosten und auch der Anwenderfreundlichkeit, die einen hohen Durchsatz an Versuchsdurchführungen erlaubt. Durch Zusatz von Wachstumsfaktoren, wie sie auch in FCS-haltigem Zellmedium enthalten sind, kann die Zellmigration wie in Abbildung 4 dargestellt, gesteigert werden (153). Dies ermöglicht es den Experimentator die Stimulation der Migration (z.B. von LPA) zu evaluieren, indem man FCS freies Medium verwendet (Abbildung 7), aber auch die Hemmung von Zellmigration (z.B. durch CHC oder Metformin) zu evaluieren, indem man FCS im Medium verwendet (Abbildung 9). Dabei wird bewusst FCS haltiges Medium gewählt, um einerseits eine bessere Durchführung des Versuches zu ermöglichen. Durch CHC und Metformin kommt es ohne FCS-Zusatz zu einem vermehrten Ablösen der Zellen von der Petrischale und somit zu einer schlechteren Beurteilbarkeit der Zellmigration.

Zu beachten ist, dass der Scratch Assay auch durch Zellproliferation beeinflusst werden kann. Diese kann durch Steigerung der Zellzahl und den damit verbundenen erhöhten Platzbedarf der Zellen, eine falsch hohe Migrationsgeschwindigkeit suggerieren. Dass LPA-Signalwege prinzipiell auch die Proliferation regulieren können, wurde in mehreren Studien beschrieben (116, 154, 155). Eine sichere Methode, um die Proliferation als Störfaktor für den *Scratch-Assay* auszuschließen, wäre die Zugabe von Mitomycin C. Dieser Zell-Zyklus Antagonist unterbindet durch

Blockade des Zellzyklus die Proliferation (153), wodurch eine noch spezifischere Messung der Migration möglich wäre(153, 156). In der Literatur wird allerdings beschrieben, dass nicht alle Zelllinien auf die Behandlung mit Mitomycin ansprechen und auch die Dosis je nach Zelllinie unterschiedlich gewählt werden muss. Für die in dieser Arbeit verwendenden Zelllinien ist dabei noch keine optimale Konzentration von Mitomycin C beschrieben. Weiterhin stellt die Zugabe von Mitomycin C ein weiterer Eingriff in den Zellstoffwechsel dar, sodass sich hier gegen die Verwendung dieses Zytostatikums entschieden haben. Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Scratch Assays nicht durch eine Stimulation der Zellproliferation beeinflusst wurde, wurde eine mögliche Stimulation der Proliferation durch LPA überprüft (Abbildung 8 und 9). Da LPA die Proliferation von 7265PDA Zellen nicht signifikant verstärkte, aber das Schließen der Lücke im Zellrasen stimulierte, kann geschlussfolgert werden, dass LPA die Migration dieser Zellen stimuliert. Für MIA PaCa- 2 Zellen konnte hingegen im Scratch Assay keine Steigerung der Migration nachgewiesen werden. Auch wenn durch diese Ergebnisse gezeigt werden konnte, dass die Migration von 7265 PDA-Zellen *in vitro* stimulierbar ist, kann damit noch keine Schlussfolgerung über eine mögliche Beeinflussung der Invasionsfähigkeit dieser Zellen *in vivo* getroffen werden.

4.1.2. Eignung von Zelllinien, Mausstämmen

4.1.2.1. Eignung der Zelllinien

Um in einem *in vivo* Versuch die Metastasierung ausreichend beobachten zu können müssen einige Grundvoraussetzungen gewährleistet sein.

Eine Grundvoraussetzung für eine Stimulation der Metastasierung durch LPA ist, dass die Karzinomzellen LPA-Rezeptoren exprimieren. Mittels Western Blot konnte diesbezüglich jedoch keine Überlegenheit einer bestimmten Zelllinie gezeigt werde, da alle analysierten Zelllinien alle sechs LPA-Rezeptoren exprimierten (Abbildung 3). Jedoch konnte in den durchgeführten Scratch-Assays nur für die Zelllinie 7265PDA (Abbildung 6), nicht hingegen für MIA PaCa-2 (Abbildung 7) eine Stimulation der Migration durch LPA nachgewiesen werden.

Eine weitere Voraussetzung, um Metastasierung *in vivo* zu beobachten ist eine ausreichendes Überleben der Versuchstiere nach Intervention, sodass eine Metastasierung stattfinden kann. Das lokale Tumorwachstum darf daher nicht zu schnell und aggressiv erfolgen und lokale Komplikationen verursachen, die zum Tod

oder der frühzeitigen Euthanasie des Tieres führen. Deshalb erwiesen sich die 6606PDA Zellen als ungeeignet, da die Tiere sehr rasch einen kritischen Zustand erreichten (Tabelle 4). Auch bei den 7265PDA Zellen sahen man recht früh Komplikationen durch das Tumorwachstum. Durch die Reduktion der injizierten Zellzahl konnte dies jedoch verringert werden (Tabelle 5). Allerdings betrug das mittlere Überleben im Vorversuch weiterhin maximal 20 Tage. Nach Injektion von MIA PaCa-2 Zellen in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Mäusen beobachteten wir in 100 % der Mäuse einen Primärtumor, ohne dass Komplikationen ein frühes Abbrechen des Experimentes erforderlich machten (Tabelle 4).

Somit wurde in Abwägung der Vor- und Nachteile der verschiedenen Tumorzelllinien entschieden die Langzeitversuche mit MIA PaCa-2 Zellen durchzuführen. Dies geschah auch vor dem Hintergrund, dass mit den Luciferase-exprimierenden MIA PaCa-2 Zelllinien eine wenig invasive Möglichkeit zum Monitoring des Tumorwachstums in der Bildgebung zur Verfügung stand.

4.1.2.2. EIGNUNG DER MAUSSTÄMME

Als Mausstämme standen die Stämme C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J und Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI-Foxn1nu/nu}$ zur Auswahl. Bei den Tieren vom Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI-Foxn1nu/nu}$ Stamm konnte nach Injektion von MIA PaCa-2 nach 30 Tagen kein Primärtumor isoliert werden, nach Injektion von 6606PDA nur in 33 % (Tabelle 4). Somit schien dieser Stamm aufgrund der geringen Toleranz gegenüber allogenen bzw. xenogenen Tumorzellen für die Beobachtung der Metastasierung nicht geeignet.

Bei den Tieren vom C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Stamm, konnte eine deutlich höhere Tumorinzidenz beobachtet werden. Diese lag nach Injektion von MIA PaCa-2 und 7265PDA bei jeweils 100 %. Durch die hohe Inzidenz an Primärtumoren, die möglicher Weise durch die deutlich reduzierte Immunfunktion dieser Tiere verursacht wurde, schien der C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Stamm als geeignet für die weiteren geplanten Experimente. Auch in der Literatur werden zur Untersuchung von Metastasierung häufig ähnlich stark immunsupprimierte Tiere wie der gewählte Stamm herangezogen(98).

4.1.3. Eignung des orthotopen Tiermodells

Zur ganzheitlichen Beobachtung der Metastasierung ist es sinnvoll alle Schritte der Metastatischen Kaskade im Tiermodell zu betrachten. Dies ist nur gegeben, wenn dabei der Ausgang von einem orthotop gelegenen Primärtumor erfolgt. Die Injektion von Tumorzellen in die Milz oder die Blutbahn umgeht die ersten Schritte der Lösung der Tumorzellen aus dem Primärtumor. Bei subkutanen Modellen für das PDA können die natürlichen Drainagewege über Lymph- und Blutbahnen sowie das Mikromilieu des Gewebes, in dem der Primärtumor liegt, nicht simuliert werden und es findet meist keine Metastasierung statt. Somit ist von den Transplantationsmodellen das orthotope Modell das geeignetste, um alle Schritte der Metastasierung beobachten zu können. Dies ist von besonderer Relevanz, da noch nicht bekannt ist, in welchem Schritt die gegebenenfalls stimulierende Wirkung von LPA ansetzt.

4.1.4. Eignung von Night-Owl-Imaging zur Detektion von Primärtumoren und Metastasen

Die Bildgebung mittels Night Owl Imaging wurde im Abstand von zirka 30 Tagen an allen Versuchstieren durchgeführt und so auch kurz vor der Gewebeentnahme. Mit einer Sensitivität von 94 %, kann mit dem Night Owl Imaging ein vorhandener Tumor zuverlässig erkannt werden. Die berechnete Spezifizität von 66 % ergibt sich, da bei zwei Tieren trotz Lumineszenz Signal kein Tumor asserviert werden konnte. Hierbei bedarf es sicher weiterer Untersuchungen, wodurch die doch niedrige Spezifität zustande kommt und wie sich diese noch weiter verbessern ließe. So könnte beispielsweise eine noch genauere und strukturiertere Untersuchung der Bauchhöhle und ggf. des Lymphgewebes erfolgen, ob Tumorgewebe außerhalb der untersuchten Organe (Pankreas und Leber) das Signal verursacht. Alternativ könnten die Ergebnisse weiterer bildgebender Untersuchungen mit den Bildern des Night Owl Imaging verglichen werden, ob in MRT oder PET/CT ein Tumor sichtbar wäre und so auch schon eine Aussage zu Testgüte des Night Owl Imaging im Verlauf des Versuches und nicht erst zum Versuchsende möglich wäre. Jedoch ist dies aufgrund der Belastung durch die notwenige Anästhesie nicht ohne weiteres möglich. Weiterhin sind PET/CT und MRT dabei in Anbetracht der Verfügbarkeit und des materiellen und des logistischen Aufwandes als deutlich aufwändiger als das Night-Owl-Imaging anzusehen.

Die Darstellung von Metastasen im lebenden Tier gelang nicht, da das Signal des Primärtumors zum späten Zeitpunkt (Tag 88) nicht von eventuellen Metastasen unterschieden werden konnte (Abbildung 14). Leber und Pankreas waren aufgrund der geringen Ortsauflösung auch zu früheren Zeitpunkten (Tag 43) nicht differenzierbar (Abbildung 15). Zur Differenzierung zwischen abdominellen und thorakalen Herden ist die Ortsauflösung zu diesem Zeitpunkt eventuell ausreichend. In unseren Versuchen konnten wir am lebenden Tier allerdings keine thorakalen Metastasen mitttels Night Owl Imaging nachweisen. Die Detektion von Metastasen in Lunge oder Leber gelang nach Organentnahme in Einzelfällen (Abbildung 18), entscheidend ist hierbei die oberflächliche Lage, um das Lumineszenzsignal kleiner Herde mit dem Detektor nachzuweisen. Für den verwendeten Detektor sind nach Herstellerangaben zur Generierung eines Signals in Geweben eine Zellmenge von mindesten 10^3 Zellen notwendig. Da zudem auch ein Anstieg der Signalstärke proportional zur Menge der Zellen beschrieben wurde, ist zu vermuten, dass die Metastasen aus zu wenigen Luciferase-exprimierenden Zellen bestehen, um diese *in vivo* Detektieren zu können (156),.

4.1.5. Optimierung der Versuchsdauer für die Beobachtung von Metastasen

In den Vorversuchen betrug die maximale Versuchsdauer nach der Tumorzellinjektion unterschiedlicher Zelllinien 29 Tage bis zur finalen Gewebeentnahme. Dabei konnte bei Verwendung von 7265PDA Zellen und einer Injektion von 0,5 x10^5 Zellen bereits bei allen Tieren makroskopisch ein metastatischer Befall der Leberoberfläche beobachtet werden. Damit erfolgt schnell eine Metastasierung, die jedoch auch rasch zu einer Einschränkung der Gesundheit durch lokale Komplikationen führt. Dies erschwert eine kontrollierte Versuchsdurchführung und die potenzielle Testung von Therapeutika. In diesem Vorversuch wurde auf die Untersuchung des Lungengewebes verzichtet. Im Langzeitversuch wurden MIA PaCa-2 Zellen ausschließlich in den Mausstamm C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J injiziert. Ziel war eine möglichst lange Überlebensdauer der Versuchstiere, um so eine Metastasierung zu ermöglichen. Zu diesem Zweck erfolgte auch hier die Injektion mit der reduzierten Anzahl an Tumorzellen (0,5 x 10^5 Zellen) um die lokalen Auswirkungen durch ein schnelles verdrängendes Tumorwachstum zu verringern. Bei insgesamt 23 untersuchten Tieren, welche MIA PaCa-2 injiziert bekommen hatten (unabhängig der Therapie mit LPA), zeigten 17 einen Primärtumor (74 %). Bei Mäusen mit nachweisbarem Primarius

konnte in 15 Fällen eine hepatische Metastasierung und in 10 Fällen Lungenmetastasen nachgewiesen werden (Tabelle 6). Somit ergibt bei Nachweis eines Primärtumors eine 88 prozentige hepatische und 59 prozentige pulmonale Metastasierungsrate. Somit ist der 90-tägige Versuchsansatz ausreichend um in den meisten Fällen eine Metastasierung zur erreichen. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben in welchem Zeitraum es nach orthotoper Implantation zu einer Metastasierung kommt. Tseng et. al. konnten nach 6-8 Wochen nach Implantation Lebermetastasen nachweisen(157). Kettler et. al. sahen diese nach 41 Tagen (6 Wochen) (158). Im orthotopen Modell von Purohit et. al. lagen bei Gewebeentnahme nach acht Wochen ebenfalls regelhaft Lebermetastasen vor(159). Somit lässt sich zusammenfassen, dass bei orthotopen Modellen nach ca. 6-8 Wochen mit einer Metastasierung in die Leber gerechnet werden kann. In den oben genannten Publikationen wurden dabei auch weitgehend immuninkompetente Tiere verwendet.
Im Vergleich dazu ist bei den genetischen Mausmodellen wie dem KPC-Modell in der 8-10 Lebenswoche mit ersten Läsionen im Pankreas zu rechnen, Lebermetastasen treten im Median in der 24. Lebenswoche auf(98). Somit besteht in diesem Modell eine Latenz von 16 Wochen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Stimulation der Zellmigration durch LPA

Während LPA die Migration von 7265PDA Zellen stimulierte, hatte es wenig Einfluss auf die Migration von MIA PaCa-2-Zellen (Abbildung 7). Beide Zelllinien exprimierten jedoch die sechs bekannten LPA-Rezeptoren. Laut aktueller Literatur steuern vor allem die Rezeptoren LPA_{1-4} und LPA_6 die Migration von Zellen (Tabelle 9). Abhängig von den unterschiedlichen Signalkaskaden kann es hier zu einer eher hemmenden oder die Migration stimulierenden Wirkung kommen. Besonders LPA_1 und LPA_3 wird eine die Migration stimulierende Wirkung zugeschrieben(118). Dies erfolgt vor allem über die G_i-Rezeptor-vermittelte Wirkung über *Rac* und die Ausbildung von Lamellipodien. Eine weitere Signaltranduktionskaskade führt über $G_{12/13}$ und *RhoA* zur Kontraktion des Cytoskeletts. Mit *Ki16425* steht ein Antagonist an $LPA_{1/3}$ zur Verfügung, durch welchen eine Hemmung der LPA vermittelten Migration erreicht werden kann(118). Somit kann ein Einfluss auf die Migration über diese Rezeptoren als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Für LPA_2 gibt es unterschiedliche

Angaben in der Literatur. Bezüglich der Expression des Rezeptors ist eine gesteigerte Expression in verschieden Tumorgeweben im Vergleich zum gesunden Gewebe beschrieben, dies gilt vor allem für das Ovarialkarzinom, Magenkarzinom und das postmenopausale Mammakarzinom. Jedoch wird für LPA_2 in Anwesenheit von Wachstumshormonen wie EGF eine hemmende LPA-Wirkung auf die Migration von Pankreaskarzinomzellen beschrieben(127).

Eine weitere migrationshemmende Wirkung von LPA ist für LPA_4 beschrieben. Dabei konnten Lee *et al.*(129) zeigen, dass bei Kolonkarzinomzellen, welche LPA_1 und LPA_2 exprimieren, eine durch LPA deutlich gesteigerte Migration erfolgt. LPA_4 wird in diesen Zellen nicht exprimiert. Durch Gen-Transduktion wurde den Zellen das *lpa4*-Gen hinzugefügt, sodass es zu einer Expression von LPA_4 kam und nun bei LPA-Zugabe eine Hemmung der Migration beobachtet werden konnte.

Tabelle 9: In der Literatur beschriebene Effekte von LPA auf die Zellmigration

Zellen.	Effekt auf Migration	Beteiligter Rezeptor	Studie
PANC-1 (Pankreas-Ca)	Steigerung Hemmung	LPA_6 $LPA_{4/5}$	*Ishii et al. (160)*
YAPC-PD (Pankreas-Ca)	Steigerung	LPA_1	*Yamada et al. (126)*
F-2 Zellen (Endothel)	Hemmung Steigerung	LPA_1 $LPA_{2/3}$	*Mori et al.(161)*
B103 (Neuroblastom)	Hemmung Steigerung	LPA_1 $LPA_{2/3}$	*Hyashi et al. (162)*
DLD1/ HCT116 Zellen (Kolon-Ca)	Steigerung Hemmung	LPA_1 $LPA_{4/6}$	*Takahashi et al. (163)*
HPD1NR (Hamster Pankreas-Ca)	Steigerung Hemmung	LPA_3 LPA_1	*Kato et al.(162)*
R128 (Ovarial-Ca)	Steigerung	LPA_1	*Jeong et al.(119)*
HEK293 (Ovarial-Ca)	Steigerung	LPA_3	*Cai et al.(164)*

In der oben genannten Publikation von Lee et al. wurde in den durchgeführten Migrationsassays eine durch LPA vermittelte Hemmung der Migration über LPA_4 gezeigt (129). In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte nicht klar

gezeigt werden, welche Rezeptoren für die Migration der 7265PDA und für die ausbleibende Steigerung der Migration bei den verwendeten MIA PaCa-2-Zellen verantwortlich sind. Beide Zellen exprimieren alle untersuchten Rezeptoren. Unterschiedliche Ausprägungen der Expression, sowie Unterschiede im Bereich der Signalkaskade oder des Zytoskeletts könnten für die Unterschiede in der LPA-stimulierten Migration verantwortlich sein. Diese Hypothese wird durch die Arbeit von Yamada et al(126) gestützt, welche nachweisen konnte, dass die LPA_1-Rezeptoren in MIA PaCa-2 deutlich geringer vorhanden sind als in anderen Zelllinien. Jedoch sind die LPA_2 und LPA_3 Rezeptoren in diesen Zellen vermehrt exprimiert. Dadurch überwiegt die migrationshemmende Wirkung von LPA_2 die promigratorischen Signale der spärlich exprimierten LPA_1-Rezeptoren.

Neben den bekannten sechs LPA-Rezeptoren sind in der Literatur momentan keine weiteren Rezeptoren beschrieben. Allerdings werden Nicht-LPA-Rezeptor-vermittelte Wirkungen durch LPA beschrieben. Dazu zählen unter anderem epigenetische Veränderungen und auch eine Beeinflussung der Genexpression wie *Cai et al.* (164) beschreiben. Dies sind langfristige Änderungen in der Genexpression von Ovarial-Karzinom-Zellen durch LPA. Dies führt über den *Hippo-YAK-Signalweg* zu Änderungen in der Proteinsynthese, was zu einer verzögerten Steigerung der Migration der Zellen führt(164, 165). Die präsentierten *in vitro* Ergebnisse könnten den Schluss zulassen, dass die Metastasierung von 7265PDA Zellen durch LPA stimulierbar sein kann, während die MIA PaCa-2 Zellen ungeeignet sind, um eine LPA stimulierte Metastasierung zu beobachten. Die alternative Hypothese ist, dass der Scratch Assay zu Ergebnissen führt, die *in vivo* nicht reproduzierbar sind. Dies wird auch tatsächlich in einigen Studien beobachtet. So beschrieben Shellard et al. dass es zellmorphologische Unterschiede zwischen der Migration *in vitro* und der *in vivo* gibt(166). Palm et al. postulieren, dass die Migration von Zellen nur bei gleichzeitiger Beurteilung anhand eines *in vitro* Instruments wie dem Scratch Assay und eines *in vivo* Modelles mit genauem Scoring der Metastasen erfolgen sollte, um suffiziente Schlüsse zu generieren(167). Somit ist es nicht ohne weiteres möglich die Ergebnisse *in vitro* auf die Annahmen *in vivo* zu übertragen.

4.2.2. Fehlende Stimulation der Metastasierung durch LPA

Nach Injektion von MIA PaCa-2 Zellen, die Luziferase exprimieren, entwickeln 83 % der C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Mäuse eine hepatogene Metastasierung. 83 % dieser Tiere entwickeln auch pulmonale Metastasen (Tabelle 6). Die Injektion von LPA führte jedoch nicht zu einem signifikant erhöhten Tumorgewicht oder mehr hepatischen oder pulmonalen Metastasen. Bei Verwendung einer weiteren MIA PaCa- 2 Zelllinie, eine Zelllinie die zusätzlich PSCA exprimiert, wurde ebenfalls keine signifikante Induktion von Metastasen bei LPA-Administration beobachtet (Tabelle 6). Auch bei Verwendung von 7265PDA Zellen, führte die Administration von LPA zu keiner Steigerung der Metastasierung (Tabelle 6). Dieses Ergebnis ist somit äußerst robust und es kann geschlussfolgert werden, dass LPA die Metastasierung nicht stimuliert, zumindest nicht bei der angewandten Dosis.

In unseren Versuchen erfolgte die Injektion von 0,02 µmol LPA in 100 µl alle zwei Tage, in Anlehnung an das Protokoll von Paul et al., in dessen Arbeit die Migration von Prostatakarzinomzellen durch LPA gesteigert werden konnte(168). Allerdings finden sich in der Literatur auch deutlich höhere Dosen. Komachi et al. verwendeten in ihrer Arbeit eine tägliche intraperitoneale Injektion (durchgeführt über sieben Tage) von 0,4 µmol LPA in 100 µl Lösungsmittel (169). Somit liegt die in dieser Dissertation verwendete Konzentration deutlich unter der von Komachi et al. beschriebenen. Eventuell könnte eine Steigerung der Dosis zu einer Induktion der Metastasierung führen.

Die Injektion von LPA erfolgte intraperitoneal. Dies ist bei murinen Karzinommodellen eine gängige Methode, um Therapeutika zu applizieren. Die intraperitoneale Injektion wird gut toleriert, führt selten zu Verletzungen und durch das Peritoneum werden die Medikamente schnell ins Blut aufgenommen. Weiterhin ist in der Literatur häufig beschrieben, dass der Aszites von PDA-Patienten eine erhöhte Konzentration an LPA im Vergleich zu nicht-neoplastischem Aszites aufweist. Durch das im Aszites enthaltene LPA wird eine stimulierende Wirkung auf Pankreastumorzellen vermutet (170). Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch intraperitoneal injiziertes LPA einen Effekt hervorrufen könnte. Darüber hinaus sollte dem Umstand Rechnung getragen werden, dass das hier verwendete Tiermodell bereits ohne LPA-Injektion eine ausgeprägte Metastasierungsrate aufweist. Möglicherweise wird der Einfluss von LPA auf die Metastasierung durch dieses ausgeprägte „Hintergrundrauschen“ überdeckt.

4.2.3. Ein metastasierendes Pankreaskarzinommodell für zukünftige Studien

Während eine Induktion der Metastasierung mit LPA nicht vielversprechend erscheint, war es auffällig, dass nach Injektion von 7265PDA Zellen in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Mäuse innerhalb von 20 Tagen 100% hepatische und zu 66% pulmonale Metastasen beobachtet wurden (Tabelle 5 und 6)

Auch die Injektion von MIA PaCa-2 Zellen führte in diesen Mäusen zu einer hohen Metastasierungsrate (Tabelle 5 und 6), während keine Metastasierung nach Injektion in Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI-Foxn1nu/nu}$ -Mäuse beobachtet wurde (Tabelle 4).

Dabei ist zu bedenken, dass die Immunsuppression beim C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J deutlich stärker ausgeprägt ist als im Rj:NMRI-Foxn1$^{Rj:NMRI-Foxn1nu/nu}$ Stamm, wodurch eine Metastasierung leichter erfolgen kann. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich bei beiden verwendeten Ziellinien eine zuverlässige Ausbildung eines Primärtumors und nachfolgende Metastasierung. Bei den 7265PDA Zellen zeigte sich dabei das Wachstums etwas schneller und mutmaßlich invasiver, was zu einem verfrühten Versterben der Tiere führte. Einerseits scheint ein schneller Krankheitsprozess mit früher Metastasierung und invasivem Tumorwachstum wünschenswert, da dies auch charakteristisch für die humane Erkrankung ist, andererseits ergibt sich hierdurch, auch vor dem Hintergrund der tierschutzrechtlichen Bestimmungen, eine schwierigere Evaluation von Therapie oder Interventionen. Falls mit humanen Zellen gearbeitet werden soll, ist die Verwendung von MIA PaCa-2 Zellen daher eine gute Alternative. Durch die Transfektion mit dem Luciferasegen steht hier mit der Lumineszenzbildgebung ein weiteres Tool zum Monitoring der Erkrankung und Auswertung zur Verfügung. Je nach Fragestellung haben somit beide Zelllinien als orthotopes Pankreaskarzinommodell in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Mäusen eine mögliche Anwendung.

5. Relevanz der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sowohl die Zelllinie MIA PaCa-2 als humane Zelllinie, als auch 7265PDA in C;129S4-Rag2$^{tm1.1Flv}$Il2rg$^{tm1.1Flv}$/J Mäusen als Metastasierungsmodell für zukünftige Studien angewendet werden kann. Dabei ist die hier vorgeschlagene Injektionstechnik mit einer Zellzahl von 0,5x10^5 Zellen und einem Zusatz von Methylenblau zur Kontrolle der Injektionsgüte gut geeignet. Durch die geringere Zellzahl wird das lokale Tumorwachstum für eine gewisse Zeit begrenzt. Es kommt anfangs zu keinen Komplikationen durch das lokale verdrängende Wachstum, die einen Abbruch des Versuches notwendig machen würden. Eine Metastasierung kann also stattfinden. Weiterhin machen MIA PaCa-2 mit Luciferase-Expression ein Monitoring des Wachstums von Tumor und Metastasen möglich und mit dem Night-Owl-Imaging auch leicht durchführbar. Dieses Modell könnte relevant sein für die Evaluation von Chemotherapien im Mausmodell oder für die Erforschung der Mechanismen, die zur Metastasierung führen.

6. AUSBLICK

Auch in Zukunft wird die Notwendigkeit bestehen neue Therapien im Mausmodell zu testen. Das hier vorgestellte Modell ist dabei prinzipiell gut geeignet, um das metastasierende Pankreaskarzinom abzubilden. Natürlich sollten dabei noch weitere Untersuchungen zu Mausstamm und Zellzahl ergänzt werden. Generell ist es wichtig die Kleintierbildgebung weiter einzusetzen und zu verbessern, sodass dies schneller und mit weniger Aufwand eingesetzt werden kann. So kann eine bessere Verlaufsbeobachtung ermöglicht werden. Die gezeigte Möglichkeit der Lumineszenzbildgebung ist ein Tool, welches hier einen zusätzlichen Nutzen verspricht. Dafür sollten weitere Zelllinien wie beispielsweise die 7265PDA Linien mit dem Luciferasegen transfiziert werden. Somit könne auch diese Zellen genauer gemonitort werden und das Tumorwachstum und die Ausbildung von Metastasen verfolgt werden. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, humane Primärtumoren oder Zellen, welche als Biopsien aus diesen Tumoren gewonnen wurden, in der Zellkultur zu etablieren mit dem Luciferasegen zu transfizieren und daraus ein Mausmodell zu generieren, an welchem das Ansprechen geplanter Therapien überprüft werden kann. Dadurch kann es gelingen eine personalisierte Therapie mit verbesserter Ansprechrate zu ermöglichen.

- Das Pankreaskarzinom gehört weiterhin zu den Krebserkrankungen mit der schlechtesten Prognose.

- Die frühe und ausgeprägte Metastasierung ist ein Grund für die schlechte Prognose für Menschen mit Pankreaskarzinom

- Für die Evaluation von Therapien gegen das Pankreaskarzinom im Mausmodell und grundwissenschaftliche Fragestellungen sollte auch die Metastasierung im Tiermodell mit abgebildet werden.

- Die meisten murinen Pankreaskarzinommodelle bilden die Metastasierung nicht ausreichend ab.

- Die Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen hängt von deren Fähigkeit zur Migration und evtl. von der Migrationsgeschwindigkeit ab.

- LPA steigert die Migrationsgeschwindigkeit von Pankreaskarzinomzellen *in vitro*.

- Durch LPA lässt sich *in vivo* jedoch keine Steigerung und Beschleunigung der Metastasierung der getesteten PDA-Zelllinien erreichen.

- Lumineszenz Imaging stellt eine leicht durchführbare zusätzliche Bildgebungsmodalität zum Monitoring des Tumorwachstums und der Metastasierung dar.

Tabelle 10 Zusammensetzung Lysispuffer

100 µl Tris (1M) ph 7,5 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
20 µl NaCl (5 M) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
4 µl EDTA (250 mM) (Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland)
500 µl Triton-X-100 10% (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
50 µl NaN3 4% (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

Im Western Blot verwendete Pufferlösung, Bestandteile Sammelgel

- Ladepuffer: 250 mM (pH6,8), 8 % SDS, 40 % Glycin, 100 mM DTT, 0,02 % Bromphenolblau in Waser (A.dest.)
- Sammelgel: 150 mM Tris (pH 6,8), 5 % Acrylamid/bis-Acrylamid, 0,083 % SDS, 0,083 % APS, 0,083 % TEMED in A.dest.

Tabellen

Tabelle 1: Verschiedene LPA-Wirkungen und beteiligte Rezeptoren.....30

Tabelle 2 Antikörperverdünnung, Proteinkonzentration und Belichtungszeit beim Western Blot.....38

Tabelle 3: Injektionsschema Versuchsrunde 5.....44

Tabelle 4 Ergebnisse Versuchsdurchgänge 1 und 2 unter Verwendung unterschiedlicher Mausstämme und Zelllinien.....50

Tabelle 5 Tumorinzidenz bei Verringerung der injizierten Zellzahl (Versuch 3).....51

Tabelle 6: Einfluss von LPA auf Tumorentwicklung und Metastasen nach Injektion von 7265PDA und MIA PaCa-2 Zellen in das Pankreas.....59

Tabelle 7: Darstellung der Tumorenmittels Night-Owl.....64

Tabelle 8: Vergleich der Detektion von Tumoren mittels Night-Owl-Imaging vs. Gewebeentnahme.....65

Tabelle 9: In der Literatur beschriebene Effekte von LPA auf die Zellmigration.....76

Tabelle 10 Zusammensetzung Lysispuffer.....83

Abbildungen

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Vorversuche (Versuch 1-3). 0: Tag 0, Ohrmarkierung, Blutentnahme; 7: Tag 7, Tag der Zellinjektion; 36: Tag 36 des Versuchs, 29 Tage nach Zellinjektion, geplante Gewebeentnahme.....41

Abbildung 2: Zeitlicher Ablauf der Langzeitversuche (Versuch 4-5). 0: Tag 0, Ohrmarkierung, Blutentnahme; 7: Tag 7, Tag der Zellinjektion; 30/60/90: Tage mit geplanter Bildgebung; 96: Tag 96 des Versuchs, 89 Tage nach Injektion der Zelllinie.....43

Abbildung 3: Expression der LPA1-6-Rezeptoren (A-F), Nachweis mittels Western Blot in den Ziellinien: 6606L, 6606PDA, 7265PDA, MIA PaCa-2, (n=2).....52

Abbildung 4: Der Verschluss des Zellrasens der 7265PDA-Zellen lässt sich durch FCS stimulieren. Durchführung eines Scratch-Assays und Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit mit und ohne Zugabe von FCS (p=0,029, (*) signifikanter Unterschied im Man-Whitney-Rank-Sum-Test; (n=4).....53

*Abbildung 5: Hemmung der Migrationsgeschwindigkeit von 6606PDA Zellen durch Zugabe von Metformin und/ oder CHC. (n=6), p=0,002 für Metformin + CHC vs Kontrollgruppe,.*signifikante Unterschiede im Man-Whitney-Rank-Sum-Test (n=7), alle Ansätze mit FCS-haltigem Medium.....54*

*Abbildung 6: LPA stimuliert die Migration von 7265PDA-Zellen. Durchführung eines Scratch-Assay zur Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dosisabhängig (A) und bereits bei einer Konzentration von 2,5 µmol LPA im Vergleich zu nicht mit LPA behandelten Zellen signifikant erhöht (B). Signifikante Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Rank Sum Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt und sind durch das Symbol * mit p=0,029 dargestellt. Anzahl der unabhängigen Scratch Assays: n=4.....55*

Abbildung 7: Die Migration von MIA PaCa-2-Zellen wird durch LPA nicht signifikant stimuliert. Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit mittels Scratch-Assay. Es lässt sich keine Dosisabhängigkeit nachweisen (A). Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit mit 2,5 µM vs. Kontrollgruppe waren nach Testung mit dem Man-Whitney-Rank-Sum-Test in fünf unabhängigen Messungen nicht signifikant (B).....56

Abbildung 8: Die Proliferation von 7265PDA-Zellen wird durch LPA kaum stimuliert. Keine Dosisabhängigkeit der BrdU Inkorporation wurde nachgewiesen (A). Keine signifikant gesteigerte Proliferation wurde nach Zugabe von 2,5 µM LPA festgestellt; p>0,05; Man-Whitney-Rank-Sum-Test mit sieben unabhängigen Messungen.....57

Abbildung 9: Proliferation von MIA PaCa-2-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von LPA. Im BrdU-Proliferationsassay wurde keine Dosisabhängigkeit zwischen Messung ohne LPA und verschiedenen LPA-Konzentrationen festgestellt (A). Die

Inhibition der Proliferation durch Zugabe von 2,5 µM LPA war im Vergleich zur Kontrolle im Man-Whitney-Rank-Sum-Test mit sechs unabhängig durchgeführten Messungen statistisch nicht signifikant.....57

Abbildung 10: Einfluss von LPA auf das Tumorgewicht. Nach orthotoper Injektion zweier Luciferase-exprimierender MIA PaCa-2-Zelllinien wurde jeweils ein Teil der Mäuse mit LPA oder einer Kontrolllösung (HBSS) injiziert. Darstellung mittels Boxplot. MIA PaCa-2luc+PSCA (n=5), MIA PaCa-2luc (n=6), MIA PaCa-2luc+PSCA und Injektion von LPA (n=4), MIA PaCa-2luc und Injektion von LPA (n=2),.....61

Abbildung 11: ^{18}FDG-PET/CT der Maus HK40 am Tag 60 nach Tumorzellinjektion. Anreicherung der 18Fluor-Desoxyglukose im Tumor, sowie ebenso Anreicherung im Herzmuskel und in den Nieren und Harnorganen. In der axialen und koronaren Schnittebene ist der Tumor markiert.....62

Abbildung 12: MRT in T2 Wichtung der Maus HK40 am Tag 60 nach Tumorzellinjektion. Koronarer Schnitt. Es zeigt sich abgrenzbar der Tumor im Bereich des Pankreas (roter Pfeil).....62

Abbildung 13: NightOwl-Imaging des lumineszierenden Tumors der HK40 Maus am Tag 60 nach intraperitonealer Injektion von Luciferin.....63

Abbildung 14: Tumorausdehnung MiaPaCa-2-luc im Verlauf des Experiments, Versuchsrunde 5, Darstellung mittels Night-Owl-Imaging.....64

Abbildung 15: Bildgebung mittels Night-Owl an Tag 60. Die Versuchstiere HK48 und HK58 zeigten nach Applikation von Luciferase ein schwaches Lumineszenzsignal, ohne dass bei der späteren Autopsie ein Pankreastumor identifiziert werden konnte. Bei makroskopisch sichtbarem Pankreastumor konnte eine deutlich stärker ausgeprägte Lumineszenz detektiert werden.....65

Abbildung 16: Messung des Lumineszenz Signals beim Night-Owl-Imaging. Auftragung der Lumineszenz in Photonen/s gegen die drei Messzeitpunkte für die verschiedenen Versuchsgruppen. Darstellung in Logarithmischer Darstellung (Dekadischer Logarithmus).....66

Abbildung 17: Night-Owl Imaging der Lunge (oben) und Leber (unten) kurz nach Gewebeentnahme nach Gabe von Luciferin. links: Lumineszenzsignal in der Leber bei Maus HK41, rechts: Lumineszenzsignal in Lunge und Leber bei Maus HK40.....67

Abbildung 18: Histologie der asservierten Gewebe aus Mäusen ohne LPA-Administration, HE Färbung. 10x Objektivvergrößerung Zeile 1:7265PDA, Zeile 2: MIA PaCa-2luc, Zeile 3: MIA PaCa-2luc+PSCA. Beispielaufnahmen eines Primärtumors (A,D,G), Lebermetastasen (B,E,H) und Lungenmetasten (C,F,I).....68

Abbildung 19: Histologische Schnitte der asservierten Gewebe bei Mäusen mit zusätzlicher LPA-Injektion. HE-Färbung. 10x Objektivvergrößerung Zeile 1:7265PDA, Zeile 2: MIA PaCa-2luc, Zeile 3: MIA PaCa-2luc+PSCA Primärtumoren (A,D,G) Leber (B,E,H) Lunge (C,F,I).....69

1. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G. Duale Reihe Anatomie: Thieme; 2020.
2. Welsch U, Deller T, Elsberger S. Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller: Elsevier Health Sciences Germany; 2011.
3. Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S. Physiologie: Georg Thieme Verlag; 2009.
4. Zhu W, Tanday N, Flatt PR, Irwin N. Pancreatic polypeptide revisited: Potential therapeutic effects in obesity-diabetes. Peptides. 2023;160:170923.
5. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 2.01: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF); 2021 [Available from: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/pankreaskarzinom/.
6. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, et al. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut; 2021. p. 172.
7. Esposito I, Segler A, Steiger K, Klöppel G. Pathology, genetics and precursors of human and experimental pancreatic neoplasms: An update. Pancreatology. 2015;15(6):598-610.
8. Klöppel G, Esposito I, Kasajima A, Konukiewitz B, Lüttges J, Sipos B. Solide und zystische nichtendokrine Tumoren des Pankreas. In: Tannapfel A, Klöppel G, editors. Pathologie: Leber, Gallenwege und Pankreas. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. p. 707-74.
9. Schlitter AM, Konukiewitz B, Kasajima A, Reichert M, Klöppel G. [Ductal adenocarcinoma of the pancreas: subtypes and molecular pathology]. Pathologe. 2021;42(5):464-71.
10. Luchini C, Capelli P, Scarpa A. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Variants. Surg Pathol Clin. 2016;9(4):547-60.
11. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. Int J Epidemiol. 2015;44(1):186-98.
12. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. Langenbeck's archives of surgery. 2008;393(4):535-45.
13. Wittel UA, Momi N, Seifert G, Wiech T, Hopt UT, Batra SK. The pathobiological impact of cigarette smoke on pancreatic cancer development (review). International journal of oncology. 2012;41(1):5-14.
14. Murphy SE. Biochemistry of nicotine metabolism and its relevance to lung cancer. J Biol Chem. 2021;296:100722.
15. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, et al. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(3):765-76.
16. Klein AP. Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021;18(7):493-502.
17. Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer--mechanisms underlying tumour progression and recurrence. Nat Rev Endocrinol. 2014;10(8):455-65.
18. Zhao Z, Liu W. Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. Technol Cancer Res Treat. 2020;19:1533033820962117.
19. Bosetti C, Rosato V, Li D, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, et al. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. Ann Oncol. 2014;25(10):2065-72.
20. Andersen DK, Korc M, Petersen GM, Eibl G, Li D, Rickels MR, et al. Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. Diabetes. 2017;66(5):1103-10.

21. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. Gastroenterology. 2013;144(6):1252-61.
22. Singhi AD, Koay EJ, Chari ST, Maitra A. Early Detection of Pancreatic Cancer: Opportunities and Challenges. Gastroenterology. 2019;156(7):2024-40.
23. Partyka O, Pajewska M, Kwaśniewska D, Czerw A, Deptała A, Budzik M, et al. Overview of Pancreatic Cancer Epidemiology in Europe and Recommendations for Screening in High-Risk Populations. Cancers (Basel). 2023;15(14).
24. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. World journal of gastroenterology. 2014;20(32):11182-98.
25. Ren B, Liu X, Suriawinata AA. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Precursor Lesions: Histopathology, Cytopathology, and Molecular Pathology. Am J Pathol. 2019;189(1):9-21.
26. Keane MG, Horsfall L, Rait G, Pereira SP. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. BMJ open. 2014;4(11):e005720-e.
27. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. World journal of gastroenterology. 2018;24(43):4846-61.
28. Strobel O, Büchler MW. Borderline-Resektabilität beim Pankreaskarzinom: Konsensus-Statement der ISGPS. Der Chirurg. 2014;85(11):1014-.
29. Hartwig W, Vollmer CM, Fingerhut A, Yeo CJ, Neoptolemos JP, Adham M, et al. Extended pancreatectomy in pancreatic ductal adenocarcinoma: definition and consensus of the International Study Group for Pancreatic Surgery (ISGPS). Surgery. 2014;156(1):1-14.
30. Katz MHG, Shi Q, Meyers J, Herman JM, Chuong M, Wolpin BM, et al. Efficacy of Preoperative mFOLFIRINOX vs mFOLFIRINOX Plus Hypofractionated Radiotherapy for Borderline Resectable Adenocarcinoma of the Pancreas: The A021501 Phase 2 Randomized Clinical Trial. JAMA Oncol. 2022;8(9):1263-70.
31. Conroy T, Hammel P, Hebbar M, Ben Abdelghani M, Wei AC, Raoul JL, et al. FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. N Engl J Med. 2018;379(25):2395-406.
32. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, et al. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet. 2017;389(10073):1011-24.
33. Sultana A, Smith CT, Cunningham D, Starling N, Neoptolemos JP, Ghaneh P. Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2007;25(18):2607-15.
34. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. N Engl J Med. 2011;364(19):1817-25.
35. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic CancerA Randomized Controlled Trial. JAMA. 2007;297(3):267-77.
36. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis. Am Surg. 1995;61(12):1065-6.
37. Vanharanta S, Massagué J. Origins of metastatic traits. Cancer Cell. 2013;24(4):410-21.

38. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. Science. 2011;331(6024):1559-64.
39. Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. J Natl Cancer Inst. 1995;87(21):1588-92.
40. Nussinov R, Tsai CJ, Jang H. Anticancer drug resistance: An update and perspective. Drug Resist Updat. 2021;59:100796.
41. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature. 2016;529(7586):298-306.
42. Nieszporek A, Skrzypek K, Adamek G, Majka M. Molecular mechanisms of epithelial to mesenchymal transition in tumor metastasis. Acta Biochim Pol. 2019;66(4):509-20.
43. Behrens J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. Biochem Soc Trans. 2005;33(Pt 4):672-5.
44. Wu ZQ, Li XY, Hu CY, Ford M, Kleer CG, Weiss SJ. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(41):16654-9.
45. Saad S, Stanners SR, Yong R, Tang O, Pollock CA. Notch mediated epithelial to mesenchymal transformation is associated with increased expression of the Snail transcription factor. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42(7):1115-22.
46. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, et al. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. J Natl Cancer Inst. 2000;92(7):569-73.
47. McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A, Feinberg AP. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(8):867-74.
48. Serrano-Gomez SJ, Maziveyi M, Alahari SK. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. Mol Cancer. 2016;15:18.
49. Expósito-Villén A, A EA, Franco D. Functional Role of Non-Coding RNAs during Epithelial-To-Mesenchymal Transition. Noncoding RNA. 2018;4(2).
50. Machesky LM. Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion. FEBS Lett. 2008;582(14):2102-11.
51. García-Jiménez C, Goding CR. Starvation and Pseudo-Starvation as Drivers of Cancer Metastasis through Translation Reprogramming. Cell Metab. 2019;29(2):254-67.
52. Tang Q, Su Z, Gu W, Rustgi AK. Mutant p53 on the Path to Metastasis. Trends Cancer. 2020;6(1):62-73.
53. Wheeler LJ, Watson ZL, Qamar L, Yamamoto TM, Sawyer BT, Sullivan KD, et al. Multi-Omic Approaches Identify Metabolic and Autophagy Regulators Important in Ovarian Cancer Dissemination. iScience. 2019;19:474-91.
54. Follain G, Herrmann D, Harlepp S, Hyenne V, Osmani N, Warren SC, et al. Fluids and their mechanics in tumour transit: shaping metastasis. Nature reviews Cancer. 2020;20(2):107-24.
55. Strilic B, Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. Cancer Cell. 2017;32(3):282-93.
56. Marcolino E, Siddiqui YH, van den Bosch M, Poole AW, Jayaraman PS, Gaston K. Blood platelets stimulate cancer extravasation through TGFβ-mediated downregulation of PRH/HHEX. Oncogenesis. 2020;9(2):10.
57. Gaertner F, Massberg S. Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer. Nat Rev Immunol. 2019;19(12):747-60.

58. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. Signal Transduct Target Ther. 2021;6(1):404.
59. Lo HC, Xu Z, Kim IS, Pingel B, Aguirre S, Kodali S, et al. Resistance to natural killer cell immunosurveillance confers a selective advantage to polyclonal metastasis. Nat Cancer. 2020;1(7):709-22.
60. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell. 2017;168(4):670-91.
61. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15(5):325-40.
62. Bersini S, Miermont A, Pavesi A, Kamm RD, Thiery JP, Moretti M, et al. A combined microfluidic-transcriptomic approach to characterize the extravasation potential of cancer cells. Oncotarget. 2018;9(90):36110-25.
63. Li J, King MR. Adhesion receptors as therapeutic targets for circulating tumor cells. Front Oncol. 2012;2:79.
64. Osmani N, Follain G, García León MJ, Lefebvre O, Busnelli I, Larnicol A, et al. Metastatic Tumor Cells Exploit Their Adhesion Repertoire to Counteract Shear Forces during Intravascular Arrest. Cell Rep. 2019;28(10):2491-500.e5.
65. Leong HS, Robertson AE, Stoletov K, Leith SJ, Chin CA, Chien AE, et al. Invadopodia are required for cancer cell extravasation and are a therapeutic target for metastasis. Cell Rep. 2014;8(5):1558-70.
66. Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova, II. The role of exosomes in cancer metastasis. Semin Cancer Biol. 2017;44:170-81.
67. Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? Curr Opin Cell Biol. 2016;43:7-13.
68. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer metastasis reviews. 1989;8(2):98-101.
69. Fidler IJ, Poste G. The "seed and soil" hypothesis revisited. Lancet Oncol. 2008;9(8):808.
70. Neophytou CM, Panagi M, Stylianopoulos T, Papageorgis P. The Role of Tumor Microenvironment in Cancer Metastasis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. Cancers (Basel). 2021;13(9).
71. Smith HA, Kang Y. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. Journal of Molecular Medicine. 2013;91(4):411-29.
72. Sanchez LR, Borriello L, Entenberg D, Condeelis JS, Oktay MH, Karagiannis GS. The emerging roles of macrophages in cancer metastasis and response to chemotherapy. Journal of Leukocyte Biology. 2019;106(2):259-74.
73. Farhood B, Najafi M, Salehi E, Hashemi Goradel N, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Disruption of the redox balance with either oxidative or anti-oxidative overloading as a promising target for cancer therapy. Journal of cellular biochemistry. 2019;120(1):71-6.
74. Mortezaee K. Immune escape: A critical hallmark in solid tumors. Life Sci. 2020;258:118110.
75. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K, Kharazinejad E, Majidpoor J, Ahadi R. Hypoxia in solid tumors: a key promoter of cancer stem cell (CSC) resistance. J Cancer Res Clin Oncol. 2020;146(1):19-31.
76. Mortezaee K, Najafi M, Farhood B, Ahmadi A, Shabeeb D, Musa AE. NF-κB targeting for overcoming tumor resistance and normal tissues toxicity. J Cell Physiol. 2019;234(10):17187-204.

77. Zhang L, Yao J, Wei Y, Zhou Z, Li P, Qu J, et al. Blocking immunosuppressive neutrophils deters pY696-EZH2-driven brain metastases. Sci Transl Med. 2020;12(545).
78. Miarka L, Hauser C, Helm O, Holdhof D, Beckinger S, Egberts JH, et al. The Hepatic Microenvironment and TRAIL-R2 Impact Outgrowth of Liver Metastases in Pancreatic Cancer after Surgical Resection. Cancers (Basel). 2019;11(6).
79. Buscail L, Bournet B, Cordelier P. Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020;17(3):153-68.
80. Wang WC, Zhang XF, Peng J, Li XF, Wang AL, Bie YQ, et al. Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. Biomed Res Int. 2018;2018:6304701.
81. Chen X, Liu F, Xue Q, Weng X, Xu F. Metastatic pancreatic cancer: Mechanisms and detection (Review). Oncol Rep. 2021;46(5).
82. Chang CH, Pauklin S. ROS and TGFβ: from pancreatic tumour growth to metastasis. J Exp Clin Cancer Res. 2021;40(1):152.
83. Häberle L, Braren R, Schlitter AM, Esposito I. [Metastasis of pancreatic tumors]. Pathologe. 2015;36 Suppl 2:176-80.
84. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. Immunity. 2019;50(4):924-40.
85. Esposito I, Penzel R, Chaib-Harrireche M, Barcena U, Bergmann F, Riedl S, et al. Tenascin C and annexin II expression in the process of pancreatic carcinogenesis. J Pathol. 2006;208(5):673-85.
86. Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA. Participation of tenascin and transforming growth factor-beta in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. Cancer research. 1989;49(15):4322-5.
87. Booth C, Harnden P, Selby PJ, Southgate J. Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFbeta-1 in the normal and neoplastic urinary bladder. J Pathol. 2002;198(3):359-68.
88. Wang S, Chen J, Guo XZ. KAI1/CD82 gene and autotaxin-lysophosphatidic acid axis in gastrointestinal cancers. World J Gastrointest Oncol. 2022;14(8):1388-405.
89. Fujii K, Hayakawa T, Kikuchi M. Tumor induction in mice administered neonatally with bis(2-oxopropyl)nitrosamine. Tohoku J Exp Med. 1994;174(4):361-8.
90. Scarpelli DG, Rao MS, Reddy JK. Studies of pancreatic carcinogenesis in different animal models. Environ Health Perspect. 1984;56:219-27.
91. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. J Mol Biol. 1981;150(4):467-86.
92. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. Cancer Cell. 2005;7(5):469-83.
93. DeCant BT, Principe DR, Guerra C, Pasca di Magliano M, Grippo PJ. Utilizing past and present mouse systems to engineer more relevant pancreatic cancer models. Front Physiol. 2014;5:464.
94. Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, et al. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes Dev. 2003;17(24):3112-26.
95. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, et al. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. Genes Dev. 2006;20(22):3147-60.

96. Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, et al. Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. Cancer Cell. 2007;11(3):229-43.
97. Krempley BD, Yu KH. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. Chin Clin Oncol. 2017;6(3):25.
98. Mallya K, Gautam SK, Aithal A, Batra SK, Jain M. Modeling pancreatic cancer in mice for experimental therapeutics. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2021;1876(1):188554.
99. Marincola FM, Drucker BJ, Siao DY, Hough KL, Holder WD, Jr. The nude mouse as a model for the study of human pancreatic cancer. The Journal of surgical research. 1989;47(6):520-9.
100. Schwarz RE, McCarty TM, Peralta EA, Diamond DJ, Ellenhorn JD. An orthotopic in vivo model of human pancreatic cancer. Surgery. 1999;126(3):562-7.
101. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. 2002;100(9):3175-82.
102. Yang G, Guan W, Cao Z, Guo W, Xiong G, Zhao F, et al. Integrative Genomic Analysis of Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer by Patient-derived Xenograft Models. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2021;27(12):3383-96.
103. Chen Q, Wei T, Wang J, Zhang Q, Li J, Zhang J, et al. Patient-derived xenograft model engraftment predicts poor prognosis after surgery in patients with pancreatic cancer. Pancreatology. 2020;20(3):485-92.
104. He Q, Wang X, Zhang X, Han H, Han B, Xu J, et al. A tissue-engineered subcutaneous pancreatic cancer model for antitumor drug evaluation. International journal of nanomedicine. 2013;8:1167-76.
105. Zheng L, Xue J, Jaffee EM, Habtezion A. Role of immune cells and immune-based therapies in pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. Gastroenterology. 2013;144(6):1230-40.
106. Arndt T. Luciferin-Luciferase-System. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1535-.
107. Genevois C, Loiseau H, Couillaud F. In Vivo Follow-up of Brain Tumor Growth via Bioluminescence Imaging and Fluorescence Tomography. International journal of molecular sciences. 2016;17(11).
108. Zhao ZX, Li X, Liu WD, Liu XZ, Wu SJ, Hu XH. Inhibition of Growth and Metastasis of Tumor in Nude Mice after Intraperitoneal Injection of Bevacizumab. Orthop Surg. 2016;8(2):234-40.
109. Hotz HG, Reber HA, Hotz B, Yu T, Foitzik T, Buhr HJ, et al. An orthotopic nude mouse model for evaluating pathophysiology and therapy of pancreatic cancer. Pancreas. 2003;26(4):e89-98.
110. Saluja AK, Dudeja V. Relevance of animal models of pancreatic cancer and pancreatitis to human disease. Gastroenterology. 2013;144(6):1194-8.
111. Majumder K, Arora N, Modi S, Chugh R, Nomura A, Giri B, et al. A Novel Immunocompetent Mouse Model of Pancreatic Cancer with Robust Stroma: a Valuable Tool for Preclinical Evaluation of New Therapies. Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract. 2016;20(1):53-65; discussion
112. Ahlering TE, Dubeau L, Jones PA. A new in vivo model to study invasion and metastasis of human bladder carcinoma. Cancer research. 1987;47(24 Pt 1):6660-5.

113. Pettaway CA, Pathak S, Greene G, Ramirez E, Wilson MR, Killion JJ, et al. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 1996;2(9):1627-36.
114. Giavazzi R, Campbell DE, Jessup JM, Cleary K, Fidler IJ. Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. Cancer research. 1986;46(4 Pt 2):1928-33.
115. Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. The Journal of Biochemistry. 2015;157(2):81-9.
116. Liao Y, Liu L, Yang J, Shi Z. ATX/LPA axis regulates FAK activation, cell proliferation, apoptosis, and motility in human pancreatic cancer cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2022;58(4):307-15.
117. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. Annu Rev Biochem. 2004;73:321-54.
118. Lv GM, Li P, Wang WD, Wang Sh K, Chen JF, Gong YL. Lysophosphatidic acid (LPA) and endothelial differentiation gene (Edg) receptors in human pancreatic cancer. J Surg Oncol. 2011;104(6):685-91.
119. Jeong GO, Shin SH, Seo EJ, Kwon YW, Heo SC, Kim KH, et al. TAZ mediates lysophosphatidic acid-induced migration and proliferation of epithelial ovarian cancer cells. Cell Physiol Biochem. 2013;32(2):253-63.
120. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. J Lipid Res. 2014;55(7):1192-214.
121. Khandoga AL, Pandey D, Welsch U, Brandl R, Siess W. GPR92/LPA_5 lysophosphatidate receptor mediates megakaryocytic cell shape change induced by human atherosclerotic plaques. Cardiovasc Res. 2011;90(1):157-64.
122. Lin S, Yeruva S, He P, Singh AK, Zhang H, Chen M, et al. Lysophosphatidic acid stimulates the intestinal brush border Na(+)/H(+) exchanger 3 and fluid absorption via LPA(5) and NHERF2. Gastroenterology. 2010;138(2):649-58.
123. Jongsma M, Matas-Rico E, Rzadkowski A, Jalink K, Moolenaar WH. LPA is a chemorepellent for B16 melanoma cells: action through the cAMP-elevating LPA5 receptor. PloS one. 2011;6(12):e29260.
124. Lei L, Su J, Chen J, Chen W, Chen X, Peng C. The role of lysophosphatidic acid in the physiology and pathology of the skin. Life Sciences. 2019;220:194-200.
125. Enooku K, Uranbileg B, Ikeda H, Kurano M, Sato M, Kudo H, et al. Higher LPA2 and LPA6 mRNA Levels in Hepatocellular Carcinoma Are Associated with Poorer Differentiation, Microvascular Invasion and Earlier Recurrence with Higher Serum Autotaxin Levels. PloS one. 2016;11(9):e0161825.
126. Yamada T, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Tobo M, Kimura T, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) in malignant ascites stimulates motility of human pancreatic cancer cells through LPA1. J Biol Chem. 2004;279(8):6595-605.
127. Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, Yamada T, et al. LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites. Carcinogenesis. 2009;30(3):457-65.
128. Jeong KJ, Park SY, Seo JH, Lee KB, Choi WS, Han JW, et al. Lysophosphatidic acid receptor 2 and Gi/Src pathway mediate cell motility through cyclooxygenase 2 expression in CAOV-3 ovarian cancer cells. Experimental & Molecular Medicine. 2008;40(6):607-16.

129. Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, et al. Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. Mol Biol Cell. 2008;19(12):5435-45.
130. Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, et al. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. Biochimica et biophysica acta. 2002;1582(1-3):257-64.
131. Fang X, Gaudette D, Furui T, Mao M, Estrella V, Eder A, et al. Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases, and management of ovarian cancer. Ann N Y Acad Sci. 2000;905:188-208.
132. Pustilnik TB, Estrella V, Wiener JR, Mao M, Eder A, Watt MA, et al. Lysophosphatidic acid induces urokinase secretion by ovarian cancer cells. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 1999;5(11):3704-10.
133. Hu YL, Tee MK, Goetzl EJ, Auersperg N, Mills GB, Ferrara N, et al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. J Natl Cancer Inst. 2001;93(10):762-8.
134. Schwartz BM, Hong G, Morrison BH, Wu W, Baudhuin LM, Xiao YJ, et al. Lysophospholipids increase interleukin-8 expression in ovarian cancer cells. Gynecol Oncol. 2001;81(2):291-300.
135. Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Sasaki T, Saito K, Hamada T, et al. Pancreatic cancer with malignant ascites: clinical features and outcomes. Pancreas. 2015;44(3):380-5.
136. Yang M, Zhong WW, Srivastava N, Slavin A, Yang J, Hoey T, et al. G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(17):6027-32.
137. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. Bmj. 2005;330(7503):1304-5.
138. Hu J, Fan HD, Gong JP, Mao QS. The relationship between the use of metformin and the risk of pancreatic cancer in patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. BMC Gastroenterol. 2023;23(1):50.
139. Kisfalvi K, Eibl G, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. Cancer research. 2009;69(16):6539-45.
140. Wang LW, Li ZS, Zou DW, Jin ZD, Gao J, Xu GM. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. World journal of gastroenterology. 2008;14(47):7192-8.
141. Parks SK, Chiche J, Pouysségur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. Nature reviews Cancer. 2013;13(9):611-23.
142. Jones RS, Morris ME. Monocarboxylate Transporters: Therapeutic Targets and Prognostic Factors in Disease. Clin Pharmacol Ther. 2016;100(5):454-63.
143. Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann KH, Marx M, Gschwend JE, Bucholz M, et al. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. Gut. 2009;58(10):1391-8.
144. Baek G, Tse YF, Hu Z, Cox D, Buboltz N, McCue P, et al. MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. Cell Rep. 2014;9(6):2233-49.
145. Hanson DJ, Nakamura S, Amachi R, Hiasa M, Oda A, Tsuji D, et al. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of monocarboxylate transportation. Oncotarget. 2015;6(32):33568-86.
146. Kong SC, Nøhr-Nielsen A, Zeeberg K, Reshkin SJ, Hoffmann EK, Novak I, et al. Monocarboxylate Transporters MCT1 and MCT4 Regulate Migration and Invasion of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. Pancreas. 2016;45(7):1036-47.

147. Zechner D, Bürtin F, Amme J, Lindner T, Radecke T, Hadlich S, et al. Characterization of novel carcinoma cell lines for the analysis of therapeutical strategies fighting pancreatic cancer. Cell & Bioscience. 2015;5(1):51.
148. Yong KSM, Her Z, Chen Q. Humanized Mice as Unique Tools for Human-Specific Studies. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2018;66(4):245-66.
149. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2020;2109:225-9.
150. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. J Invest Dermatol. 2017;137(2):e11-e6.
151. Chen HC. Boyden chamber assay. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2005;294:15-22.
152. Au - Guy J-B, Au - Espenel S, Au - Vallard A, Au - Battiston-Montagne P, Au - Wozny A-S, Au - Ardail D, et al. Evaluation of the Cell Invasion and Migration Process: A Comparison of the Video Microscope-based Scratch Wound Assay and the Boyden Chamber Assay. JoVE. 2017(129):e56337.
153. Glenn HL, Messner J, Meldrum DR. A simple non-perturbing cell migration assay insensitive to proliferation effects. Sci Rep. 2016;6:31694.
154. Kim D, Li HY, Lee JH, Oh YS, Jun HS. Lysophosphatidic acid increases mesangial cell proliferation in models of diabetic nephropathy via Rac1/MAPK/KLF5 signaling. Exp Mol Med. 2019;51(2):1-10.
155. Leve F, Peres-Moreira RJ, Binato R, Abdelhay E, Morgado-Díaz JA. LPA Induces Colon Cancer Cell Proliferation through a Cooperation between the ROCK and STAT-3 Pathways. PloS one. 2015;10(9):e0139094.
156. Vang Mouritzen M, Jenssen H. Optimized Scratch Assay for In Vitro Testing of Cell Migration with an Automated Optical Camera. J Vis Exp. 2018(138).
157. Tseng WW, Winer D, Kenkel JA, Choi O, Shain AH, Pollack JR, et al. Development of an orthotopic model of invasive pancreatic cancer in an immunocompetent murine host. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2010;16(14):3684-95.
158. Kettler B, Trauzold A, Röder C, Egberts JH, Kalthoff H. Topology impacts TRAIL therapy: Differences in primary cancer growth and liver metastasis between orthotopic and subcutaneous xenotransplants of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2021;20(3):279-84.
159. Purohit A, Saxena S, Varney M, Prajapati DR, Kozel JA, Lazenby A, et al. Host Cxcr2-Dependent Regulation of Pancreatic Cancer Growth, Angiogenesis, and Metastasis. Am J Pathol. 2021;191(4):759-71.
160. Ishii S, Hirane M, Fukushima K, Tomimatsu A, Fukushima N, Tsujiuchi T. Diverse effects of LPA4, LPA5 and LPA6 on the activation of tumor progression in pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2015;461(1):59-64.
161. Mori S, Araki M, Ishii S, Hirane M, Fukushima K, Tomimatsu A, et al. LPA signaling through LPA receptors regulates cellular functions of endothelial cells treated with anticancer drugs. Mol Cell Biochem. 2015;408(1-2):147-54.
162. Hayashi M, Okabe K, Kato K, Okumura M, Fukui R, Fukushima N, et al. Differential function of lysophosphatidic acid receptors in cell proliferation and migration of neuroblastoma cells. Cancer letters. 2012;316(1):91-6.

163. Takahashi K, Fukushima K, Onishi Y, Inui K, Node Y, Fukushima N, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling via LPA(4) and LPA(6) negatively regulates cell motile activities of colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2017;483(1):652-7.
164. Cai H, Xu Y. The role of LPA and YAP signaling in long-term migration of human ovarian cancer cells. Cell Commun Signal. 2013;11(1):31.
165. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. Cell. 2012;150(4):780-91.
166. Shellard A, Mayor R. Durotaxis: The Hard Path from In Vitro to In Vivo. Dev Cell. 2021;56(2):227-39.
167. Palm D, Lang K, Brandt B, Zaenker KS, Entschladen F. In vitro and in vivo imaging of cell migration: two interdepending methods to unravel metastasis formation. Semin Cancer Biol. 2005;15(5):396-404.
168. Lindholm PF, Hwang YS. LPA increases tumor growth and bone destruction through enhancement of osteoclastogenic cytokines. Anticancer research. 2016;36(1):61-70.
169. Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, et al. Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. Cancer Sci. 2012;103(6):1099-104.
170. Jinno N, Yoshida M, Hayashi K, Naitoh I, Hori Y, Natsume M, et al. Autotaxin in ascites promotes peritoneal dissemination in pancreatic cancer. Cancer Sci. 2021;112(2):668-78.

DANKSAGUNG

Aus Datenschutzgründen entfernt

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Aus Datenschutzgründen entfernt

Aus Datenschutzgründen entfernt

Zhang X, Liu P, Shang Y, **Kerndl H**, Kumstel S, Gong P, Vollmar B, Zechner D. Metformin and LW6 impairs pancreatic cancer cells and reduces nuclear localization of YAP1. J Cancer. 2020 Jan 1;11(2):479-487. doi: 10.7150/jca.33029. PMID: 31897243; PMCID: PMC6930432.

Schönrogge M, **Kerndl H**, Zhang X, Kumstel S, Vollmar B, Zechner D. α-cyano-4-hydroxycinnamate impairs pancreatic cancer cells by stimulating the p38 signaling pathway. Cell Signal. 2018 Jul;47:101-108. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.03.015. Epub 2018 Mar 30. PMID: 29609037.

Kumstel S, Tang G, Zhang X, **Kerndl H**, Vollmar B, Zechner D. Grading Distress of Different Animal Models for Gastrointestinal Diseases Based on Plasma Corticosterone Kinetics. Animals (Basel). 2019 Apr 3;9(4):145. doi: 10.3390/ani9040145. PMID: 30987232; PMCID: PMC6523747.

Kerndl H, Liebetrau D, Zerwes S, Römmele C, Hyhlik-Dürr A. Ressourcenbedarf bei der chirurgischen Behandlung von COVID-19-Patienten in der universitären Maximalversorgung [Resource requirements in the surgical treatment of COVID-19 patients at a university clinic of maximum care]. Chirurg. 2022 Jan;93(1):64-71. German. doi: 10.1007/s00104-021-01547-x. Epub 2021 Dec 10. PMID: 34889961; PMCID: PMC8661830.

Liebetrau D, Zerwes S, **Kerndl H**, Schaal J, Hyhlik-Dürr A. Technical aspects of percutaneous endovascular arteriovenous fistula creation with the Ellipsys® Vascular Access System. Preliminary results after 16 patients. Langenbecks Arch Surg. 2023 Feb 15;408(1):91. doi: 10.1007/s00423-023-02812-9. PMID: 36790592; PMCID: PMC9931805.

Souri Y, Hernandez Cancino EF, **Kerndl H**, Hyhlik-Duerr A, Gosslau Y. Clinical evaluation of the PowerGlide Pro midline catheter- dwell time, complications and outcomes for various medications including prostaglandins. Langenbecks Arch Surg. 2024 Nov 27;409(1):363. doi: 10.1007/s00423-024-03546-y. PMID: 39601869; PMCID: PMC11602871.