

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. D. Teupser

Die Rolle von Fibrin und NETs für die Bewegungen von Pankreaskarzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Magda-Lena Berchtold
aus Schongau
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Claudia Nußbaum
Prof. Dr. Fritz Krombach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2023

Inhalt

1	EINLEITUNG	6
1.1	Pankreaskarzinom	6
1.1.1	Epidemiologie und Überlebensraten	6
1.1.2	Ätiologie und Klinik	6
1.2	Metastasierungswege und -arten des Pankreaskarzinoms	8
1.2.1	Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	8
1.2.2	Migration der Tumorzellen in metastatische Organe	8
1.2.3	Immune Escape	9
1.2.3.1	Korrelation zwischen Tumor- und NK-Zellen	10
1.2.3.1	Interaktion der Tumorzellen mit Thrombozyten	10
1.2.3.2	Subpopulationen der Monozyten und ihre immunregulatorischen Eigenschaften bei Tumoren	10
1.2.3.3	Neutrophile Granulozyten und ihr Beitrag zur Metastasierung von Karzinomen	12
1.2.4	Tumorzellarrest und -extravasation zirkulierender Pankreaskarzinomzellen	13
1.2.4.1	Tumorzellarrest mittels tumorinduzierter Fibrinbildung und NETs	13
1.2.4.2	Tumorinduzierte Aktivierung der sekundären Hämostase	14
1.2.4.3	Prämetastatische Nische	14
1.2.4.4	Potentielle Mediatoren der Tumorzellextravasation	15
2	ZIELSETZUNG	16
3	MATERIALIEN UND METHODEN	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Gerätschaften und Apparaturen	17
3.1.2	Pankreaskarzinomzellreihe	17
3.1.3	Mausmodelle für Tierversuche	17
3.1.4	Verbrauchsmaterialien	18
3.1.5	Chemikalien und Reagenzien	19
3.1.6	Puffer	20
3.1.7	Antikörper	21
3.1.8	Labeling Kits	22
3.2	Methoden	22
3.2.1	Zellkulturen	22
3.2.1.1	Herstellung des Nährmediums	22
3.2.1.2	Die KPC-Zelllinie	22
3.2.1.3	Auftauen der Zelllinien	22
3.2.1.4	Mediumwechsel	23
3.2.1.5	Teilen von Zellkulturen	23
3.2.1.6	Zellzählung	23
3.2.1.7	Einfrieren der Pankreaskarzinomzellen	24
3.2.1.8	Färbung der Pankreaskarzinomzellen mittels langlebiger Fluorophore	24
3.2.1.9	Injektionsschemata und -protokolle	24
3.2.1.10	Entnahme und Fixierung der Organe	25
3.2.1.11	Anfertigung von Gefrierschnitten	26
3.2.1.12	Immunhistochemische Gewebefärbungen	26

3.2.1.12.1	In-vivo-Färbungen der Mäuseleber	26
3.2.1.12.2	Visualisierung und Analyse durch konfokale Mikroskopie	29
3.2.1.13	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen	30
3.2.2	Intravitale Mikroskopie	30
3.2.2.1	2-Photonen-Mikroskop	30
3.2.2.2	Präparation der Versuchstiere	31
3.2.3	Statistische Evaluation	32
4.	ERGEBNISSE	33
4.1	Adhäsion der Karzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber	33
4.2	Tumorzellarrest in der Mikrozirkulation der Leber	34
4.3	Quantitative Auswertung der intravitale Analysen von Tumorzellbewegungen	36
4.4	Tumorzellextravasation in diversen experimentellen Mausmodellen	39
4.4.1	Darstellung der Extravasation einer Pankreaskarzinomzelle mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie	39
4.4.2	Die Rolle des Fibrins für die Extravasation von Pankreaskarzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber	40
4.4.3	Unterschiedliche Einflüsse von NETs und Fibrin auf die Extravasation von Tumorzellen	41
4.5	Immobilisierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems und deren Interaktion mit Pankreaskarzinomzellen in vivo	42
4.5.1	Klassische und nicht-klassische Monozyten	42
4.5.2	Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in der frühen Phase der Metastasierung	45
4.6	Tumorinduzierte Bildung von NETs	46
4.7	Gefäßokklusion und Hypoxie	47
4.9	Angiopoietin1- und Angiopoietin2-Expressionen und mikrovaskulärer Tumorzellarrest	50
4.9.1	Expression von Angiopoietin2 in den Wirtszellen diverser Tiermodelle	50
4.9.2	Differenzierung der Ang2 ⁺ -Wirtszellen	51
4.9.3	Ang1-Expression in Mäusen in Wirtszellen nach Tumorzellinjektion	53
5	DISKUSSION	54
6	VIDEOS	60
7	ZUSAMMENFASSUNG	61
8	SUMMARY	62
9	LITERATURVERZEICHNIS	64
10	DANKSAGUNG	73

Abbildung 1	7
Abbildung 2	8
Abbildung 3	9
Abbildung 4	15
Abbildung 5	25
Abbildung 6	29
Abbildung 7	31
Abbildung 8	33
Abbildung 9	34
Abbildung 10	35
Abbildung 11	36
Abbildung 12	37
Abbildung 13	38
Abbildung 14	39
Abbildung 15	40
Abbildung 16	41
Abbildung 17	42
Abbildung 18	43
Abbildung 19	43
Abbildung 20	44
Abbildung 21	45
Abbildung 22	46
Abbildung 23	47
Abbildung 24	48
Abbildung 25	49
Abbildung 26	50
Abbildung 27	52
Abbildung 28	53
Abbildung 29	53
Abbildung 30	59

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Überlebensraten

Mit einer Inzidenz von 19.020 Fällen in Deutschland, was einen relativen Anteil von 3,9% aller Krebserkrankungen ausmacht, ist das Pankreaskarzinom ein maligner Tumor, der relativ selten, aber mit steigender Tendenz auftritt.¹ Die meisten Pankreaskarzinome sind duktale Adenokarzinome, also Karzinome des exokrinen Pankreas.^{2,3} Die 5-Jahres-Überlebensrate des Pankreaskarzinoms liegt bei 5-10% und hat sich trotz erheblicher Fortschritte und Entwicklungen in der Krebsforschung und Krebstherapie in den letzten Jahren kaum verändert.^{2,4} Dies liegt zum einen an der Heterogenität und dem umgebenden Stroma des Tumors, welche eine effektive Chemotherapie verhindern, zum anderen aber auch an der frühzeitigen, oft prädiagnostischen Metastasierung.⁴ Der einzige kurative Behandlungsansatz besteht in der vollständigen Resektion (R0) des Tumors. Auch hier ist die Erfolgsrate aber relativ gering.⁵ Sollte der Tumor bereits Metastasen gebildet haben oder aufgrund seiner Ausdehnung inoperabel sein, werden die Patienten palliativ betreut.

1.1.2 Ätiologie und Klinik

Als mögliche Ursachen und Risikofaktoren für Genese sowie Progression des Pankreaskarzinoms werden Rauchen, Alkoholmissbrauch, Übergewicht oder eine Pankreatitis genannt.⁶⁻⁸ Auch die genetische Disposition im Sinne einer hereditären Pankreatitis, eines familiär begründeten Pankreaskarzinoms oder beispielsweise des Peutz-Jeghers-Syndroms könnten ursächlich an der Tumorgenese beteiligt sein.^{9,10} Das Pankreaskarzinom tritt überwiegend im fortgeschrittenen Alter von 60 bis 80 Jahren sowie beim männlichen Geschlecht auf, wobei in der Mehrzahl aller Fälle der Kopfbereich der Bauchspeicheldrüse befallen ist.^{11,12} In über 90% der Fälle von Pankreaskarzinomen werden somatische Mutationen im KRAS-Gen beobachtet. Mutierte Azinarzellen metaplasieren zu einem proliferativen Zelltyp, der als Initiator die Entstehung einer nicht-invasiven, neoplastischen Läsion, einer PanIN, begünstigt und in Folge dessen die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms fördert.¹³

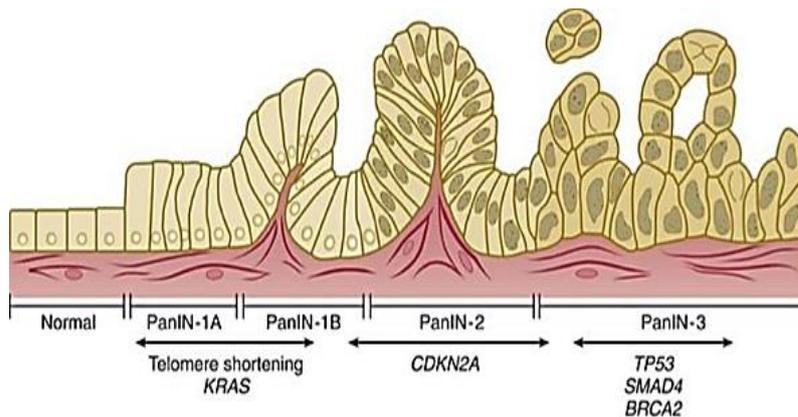


Abbildung 1

Die Entwicklungsstufen der PanIN-Läsion

Die Abbildung stellt die histologische, dreistufige Entwicklung des Epithels des Pankreas während der Genese der PanIN-Läsion dar. Diese gilt als Vorläuferläsion des Pankreaskarzinoms und steht in Verbindung mit den für das Karzinom typischen Mutationen.

Adaptiert aus Schneider, Siveke, Eckel & Schmid 2005¹³

Wie in Abbildung 1 dargestellt, charakterisieren drei Stufen die morphologische Entwicklung der PanIN-Läsion.

Die erste Stufe entwickelt sich in zwei Schritten, in denen es zunächst zu einem Längenwachstum der Epithelzellen kommt, wobei das zuvor flache Epithel papilläre Strukturen ausbildet. Angetrieben durch weitere, in dieser frühen Phase auftretende Mutationen wie beispielsweise einer CDKN2A-Mutation kommt es zu Anomalitäten in der Morphologie der Zellkerne, die nunmehr nicht mehr basal in den Epithelzellen lokalisiert sind. In der finalen Stufe der PanIN-Läsion entwickelt sich das vormals einschichtige Epithel zu einem mehrschichtigen Epithel, verbunden mit Abspaltungen von Zellen in das Lumen, Nekrosen und pathologischem Mitoseverhalten. Wichtige Mutationen, die diesen letzten Schritt fördern, sind genetische Veränderungen der Tumorsuppressorproteine p53 (TP53) sowie SMAD4.^{14,15} Trotz einer meist schnellen und aggressiven Progression der PanIN-Läsion hin zum metastasierenden Pankreaskarzinom, bleiben spezifische klinische Symptome und Beschwerden aus oder treten erst spät und bei bereits eingetretener Metastasierung auf.¹⁵ Ein weiteres diagnostisches wie auch prognostisches Indiz für die Metastasierung des Pankreaskarzinoms ist das Auftreten einer tiefen Beinvenenthrombose bzw. einer venösen Thromboembolie, insbesondere bei älteren Patienten mit unauffälliger Anamnese. Das Vorhandensein von Thromboembolien sollte bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom immer abgeklärt werden.¹⁶ Das Phänomen der tumorassoziierten Thromboembolien ist auch als Trousseau-Syndrom bekannt.¹⁷

1.2 Metastasierungswege und -arten des Pankreaskarzinoms

1.2.1 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Das Pankreaskarzinom bildet frühzeitig Metastasen, wobei sowohl lymphogene als auch hämatogene Übertragungswege beobachtet werden. Primär ist die Leber betroffen. Es finden sich jedoch auch Metastasen in Lunge, Knochenmark und Gehirn.¹²

Die hämatogene Metastasierung spielt im Rahmen der Fernmetastasierung die wichtigste Rolle.¹⁸ Zu Beginn des Metastasierungsprozesses ändern die Karzinomzellen des Primärtumors ihren Phänotyp. Hierbei machen sich die Karzinomzellen einen Mechanismus zunutze, der ursprünglich der Embryogenese dient: Sie wandeln sich von einem epithelialen in einen mesenchymalen Zelltyp (Abbildung 2), welcher durch seine erhöhte Motilität, Invasivität und sein Entartungspotential hervorsteicht.¹⁸ Diese Eigenschaften gehen Hand in Hand mit dem vorübergehenden Verlust der Tumorstammzeleigenschaften und damit der Fähigkeit, in den vom Primärtumor entfernten Geweben und Organen eine metastatische Kolonie zu bilden.¹⁹

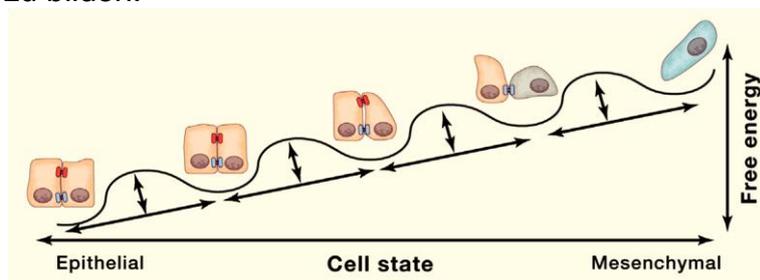


Abbildung 2

Veränderungen im Energielevel der Tumorzellen während einer EMT

Die Transition der Karzinomzellen von einem epithelialen (rot) zu einem mesenchymalen (blau) Zelltyp ermöglicht es den Zellen durch eine Erhöhung der freien Energie die Tight Junctions zu durchbrechen. Dies führt zudem zu einer Veränderung der Zellmorphologie. Die Tumorzelle verliert ihre rechteckige Form mit dem basal verankerten Zellkern und nimmt eine beinahe stromlinienförmige Gestalt an.

Adaptiert aus Lambert, Pattabiraman & Weinberg 2017¹⁷

Es wurde beobachtet, dass die Tumorzellen oftmals in einer Art Zwischenstadium der Transition verharren und sich somit Eigenschaften beider Zelltypen erhalten. Auch eine Rückwandlung einer mesenchymalen zu einer epithelialen Zellart ist möglich und zeigt die hohe Anpassungsfähigkeit der malignen Zellen an.^{20,21}

1.2.2 Migration der Tumorzellen in metastatische Organe

Nachdem die Karzinomzellen durch die neu erworbenen Migrationseigenschaften entweder als singuläre Zellen oder als Zellcluster aus dem Pankreasgewebe in ein

Blutgefäß intravasiert sind, werden sie vom Blutstrom in die Mikrovaskulation der metastatischen Organe transportiert. Dabei zeigt sich, dass Tumorzellcluster einen Vorteil sowohl im Überleben als auch in der Bildung einer metastatischen Kolonie gegenüber den singulären Zellen aufweisen. Inwiefern die Aggregation zu Clustern den Tumorzellen zum Vorteil gereicht, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch Gegenstand der Forschung.^{22,23}

1.2.3 Immune Escape

Um die Passage durch den Blutstrom unbeschadet zu überstehen, machen sich die Karzinomzellen durch Interaktionen mit immunsupprimierenden Zellen die Mechanismen des menschlichen Immunsystems zunutze (Abbildung 3).²⁴

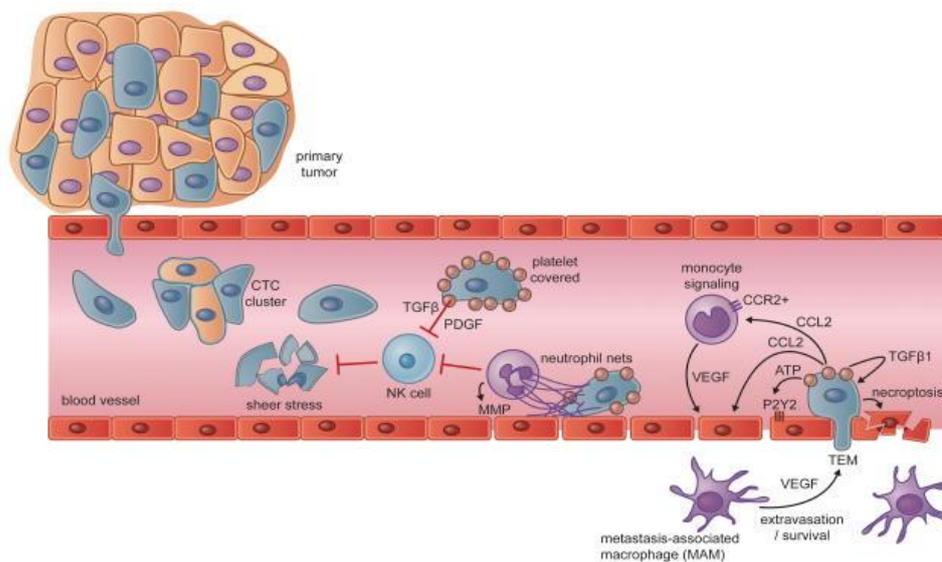


Abbildung 3

Das Verhalten zirkulierender Tumorzellen im Zusammenspiel mit dem intravasalen Immunsystem

Nach der Intravasation als singuläre Zellen oder als Zellcluster versuchen die Tumorzellen sich durch Interaktionen mit anderen Zellen der Blutzirkulation vor dem Angriff durch z.B. zytotoxische NK-Zellen zu schützen, um die Passage zum Zielorgan der Metastasierung unbeschadet zu überstehen.

Adaptiert aus Lambert, Pattabiraman & Weinberg 2017¹⁷

So schützen sich die Tumorzellen nicht nur vor Immunzellen wie beispielsweise den Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die die zirkulierenden Tumorzellen attackieren und eliminieren können, sondern auch vor physikalischen Kräften und Substratverlust, die mit dem Übergang in die Blutzirkulation einhergehen.^{18,25} Zu den Mechanismen des tumorinduzierten Immune Escape zählen die Interaktion, Bindung und Aktivierung von Thrombozyten sowie die Aktivierung Neutrophiler Granulozyten, um NK-Zellen in ihrer zytotoxischen Aktivität zu hemmen und den physikalischen Kräften des Blutstromes zu entfliehen.¹⁸ Am Ort der Metastasierung interagieren die Tumorzellen unter

anderem mit Monozyten mit dem Ziel, die Extravasation und die Bildung einer prämetastatischen Nische zu erleichtern.¹⁸

1.2.3.1 Korrelation zwischen Tumor- und NK-Zellen

Als Bestandteil der zellulären Komponente des Immunsystems spielen die NK-Zellen besonders in der initialen Phase der Immunantwort eine tragende Rolle in der Erkennung und Lyse von malignen Zellen. Die aktivierten NK-Zellen setzen Perforin sowie Granzyme frei und induzieren so eine Apoptose der Zielzelle.^{26,27} Zudem schreibt man ihnen auch eine immunregulatorische Funktion durch die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zu.²⁸ Im Zusammenhang mit malignen Zellen können aktivierte NK-Zellen die Liganden FAS und TRAIL an ihrer Zellmembran exprimieren, welche an Tumorzellen binden und sie mittels der Aktivierung der Caspase-Kaskade eliminieren.^{29,30} Im Gegenzug können Tumorzellen und rekrutierte supprimierende Immunzellen wie beispielsweise regulierende T-Zellen die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen inhibieren und dadurch den Tumorzellen zum Immune Escape verhelfen.³¹

1.2.3.1 Interaktion der Tumorzellen mit Thrombozyten

Mittels Expression von Tissue Faktor (TF) können zirkulierende Tumorzellen die lokale Fibrinbildung induzieren und dadurch mit Thrombozyten interagieren. Die während dieses Prozesses aktivierten Blutplättchen vernetzen sich und bilden eine Art Schutzschild um die Tumorzelle. Zudem setzen Thrombozyten u.a. den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) frei und verhindern somit nicht nur, dass die NK-Zelle die Tumorzelle als solche erkennt, sondern unterdrücken auch die Zytotoxizität der NK-Zellen.³²⁻³⁴ Des Weiteren fördern Thrombozyten über TGF- β die EMT von Karzinomzellen, indem sie die ursprünglich vom Stroma ausgehenden Signale ersetzen.³⁵ Daneben trägt die Aktivierung der Thrombozyten zu Koagulations-Dysregulationen bei, wie z.B. die Bildung von Mikrothromben und von venösen Thromboembolien.³⁶

1.2.3.2 Subpopulationen der Monozyten und ihre immunregulatorischen Eigenschaften bei Tumoren

Klassische Monozyten, nicht-klassische Monozyten und zu Makrophagen differenzierte Monozyten stellen Subpopulationen bzw. Folgezellen der Monozyten dar. Sie spielen nicht nur eine tragende Rolle in der Immunantwort bei Entzündungen, sondern auch bei Wachstum, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Sie

unterscheiden sich nicht nur durch ihren Wirkungsort, sondern auch durch ihre pro- bzw. antimetastatischen Eigenschaften.

Den Hauptanteil der zirkulierenden Monozyten bilden die klassischen, inflammatorischen Monozyten (Ly6C⁺, CX3CR1⁻).^{37,38} Diese sind im Maussystem Ly6C⁺, aber Ly6G⁻, wodurch sie sich von Neutrophilen, die Ly6G⁺ sind, unterscheiden lassen.³⁹ Während eines tumorösen Geschehens werden die klassischen Monozyten u.a. über die CCL2-CCR2-Achse aus dem Knochenmark sowohl zu dem Primärtumor als auch zu der prämetastatischen Leber rekrutiert und fördern dort Wachstum und Metastasierung des Pankreaskarzinoms.⁴⁰ Als tumorassoziierte Makrophagen infiltrieren Monozyten das den Primärtumor umgebende Stroma und entfalten dort eine immunsupprimierende, angiogenetische Wirkung, die die Expansion und Invasion des Tumors in das umgebende Gewebe sowie in die Blutgefäße fördert.^{13,41,42} Sie sind zudem in der Lage, die Infiltration und zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen gegen den Primärtumor zu unterbinden.⁴³⁻⁴⁶ Auch am Ort der Fernmetastasierung werden Monozyten rekrutiert und differenziert, um als sogenannte metastasenassoziierte Makrophagen ein pro-metastatisches Milieu zu schaffen und so die Entwicklung einer metastatischen Kolonie zu erleichtern und zu fördern.⁴⁷

Myeloiden Suppressorzellen (MDSC) werden aufgrund ihrer immunsupprimierenden Eigenschaften und ihrem möglichen Beitrag zur Bildung einer prä-metastatischen Nische ebenfalls eine prometastatische Wirkung zugeschrieben.⁴¹ Da diese Vorläuferzellen nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, sollen sie hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Im Gegensatz zu den klassischen Monozyten (Ly6C⁺, CX3CR1⁻) wird den nicht-klassischen, patrouillierenden (Ly6C⁻, CX3CR1⁺) Monozyten eine anti-metastatische Wirkweise zugesprochen. Sie wurden zunächst im Zusammenhang mit Infektionen entdeckt, spielen aber erwiesenermaßen auch im tumorösen und metastatischen Geschehen eine nicht vernachlässigbare Rolle. Im Falle einer Entzündung gelangen nicht-klassische Monozyten mit dem Blutstrom zum Entzündungsherd, wo sie der Beseitigung von Fremdkörpern sowie des Detritus dienen.⁴⁸⁻⁵² Ein entsprechendes Verhalten konnte auch bei metastasierenden Tumorzellen nachgewiesen werden. Die patrouillierenden Monozyten werden demnach zunächst an den Ort der Metastasierung angelockt und nehmen dort Tumormaterial auf. Sie sind im Gegensatz zu den NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen nicht fähig, die malignen Zellen direkt zu töten,

locken jedoch durch die Freisetzung von Chemokinen wie CCL3, CCL4 und CCL5 NK-Zellen an und entfalten so u.a. ihre anti-metastatische Funktion.^{51,53}

Kupfferzellen bilden mit einem Anteil von 80-90% die Majorität der Makrophagen im menschlichen Körper. Dabei handelt es sich um sessile Makrophagen der Leber, die im Lumen der Sinusoide endothelständig angesiedelt sind.⁵⁴ Im Rahmen der Metastasierung eines Pankreaskarzinoms spielen Kupfferzellen eine als bedeutend einzuordnende Rolle. Sie wirken u.a. prometastatisch über die Interaktion mit Tumor-Exosomen, von Tumorzellen freigesetzte extrazelluläre Vesikel mit einem Durchmesser <150µm. Dies wird ermöglicht durch die TGFβ- sowie Fibronektin-gesteuerte Aktivierung hepatischer Sternzellen, welche wiederum nicht nur chemotaktisch wirkt, sondern auch zu einer Fibrosierung des Lebergewebes führt.⁵⁵⁻⁵⁷ Die Fibrose erleichtert den ankommenden Tumor- wie auch den Immunzellen die Arretierung und Extravasation.⁵⁸ Unterstützt werden die Kupfferzellen durch die aus dem Knochenmark rekrutierten klassischen Monozyten, die durch die Abgabe von Granulin die Sternzellen zusätzlich aktivieren und so eine zunehmende Fibrosierung der prämetastatischen Nische fördern.^{56,59}

1.2.3.3 Neutrophile Granulozyten und ihr Beitrag zur Metastasierung von Karzinomen

Neutrophile Granulozyten (Ly6C⁺, Ly6G⁺) sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die sich aus myeloischen Vorläuferzellen entwickeln und zu den Leukozyten gezählt werden. Als Effektorzelle in der initialen Phase der Immunabwehr beinhaltet ihr Zytosol Granula, die u.a. mit Proteasen und reaktiven Sauerstoffspezies angereichert sind.⁶⁰ Ihre Immuneigenschaften wie Exozytose der Granula, Phagozytose und NETose spielen nicht nur bei Infektionen, sondern auch in tumorösen Geschehen eine wichtige, teils noch nicht vollständig erforschte Rolle. Es gibt kontroverse Ergebnisse und Diskussionen über die Art des Beitrags von Neutrophilen zum Tumorwachstum und zur Tumormetastasierung. Diese widersprüchlichen Beobachtungen sind vermutlich abhängig von der Art des Karzinoms. Im Fall des Pankreaskarzinoms scheinen die Neutrophilen eine tumorfördernde Wirkung zu besitzen.^{61,62} Neutrophile, die aus den Blutgefäßen an den Ort des Primärtumors rekrutiert werden, werden als tumorassoziierte Neutrophile (TANs) bezeichnet. Diese TANs könnten protumorigen wirken, indem sie, ähnlich den

tumorassoziierte Monozyten (TAMs), Tumorinitiation sowie -progression und Angiogenese mittels der Freisetzung diverser Mediatoren fördern.^{60,63,64}

Aktiviert Neutrophile sind zudem in der Lage, neutrophil extracellular traps (NETs) zu bilden. Diese erleichtern erwiesenermaßen die Progression sowie Metastasierung von Karzinomen und können als prognostischer Marker dienen, zudem können NETs Gefäßverschlüsse initiieren und fördern.^{65–69,70} NETs entstehen durch die Freisetzung dekondensierter DNS-Fäden in Kombination mit Histonen und enzymatischen Proteinen, wie beispielsweise Elastase, und befähigen Neutrophile, Pathogene einzufangen und zu eliminieren. Durch die Anwesenheit von Tumorzellen können die Neutrophilen aktiviert und so die Bildung der NETs durch NETose induziert werden. In Folge dessen konnte bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom eine erhöhte Expression von Peptidylarginin Deiminase 4 (PAD4) in TANs nachgewiesen werden – einem Enzym, welches die NETose fördert.^{69,71} Hierbei wird posttranslational, katalysiert durch PAD4, Arginin im Bereich des N-Terminus von Histon H3 in Citrullin konvertiert. Dies reduziert die positive Ladung des Histons und schwächt dessen Bindung an die DNS. Infolgedessen dekondensiert die DNS und kann von den Neutrophilen in den Extrazellulärraum abgegeben werden.^{69,72–74} Mittels DNase I, einem Enzym, welches an der Spaltung von DNS beteiligt ist, können NETs abgebaut werden.⁷⁵

Es konnten bereits Interaktionen zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Neutrophilen nachgewiesen werden.^{67,76} Indem sie die metastasierenden Tumorzellen einfangen und so den Arrest dieser Zellen in der Mikrozirkulation der Zielorgane fördern, tragen sie erheblich zu einer erfolgreichen Metastasierung von Karzinomen bei.⁷⁷ Ob und inwiefern NETs die Extravasation von metastasierenden Pankreaskarzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber beeinflussen, ist u.a. Gegenstand der folgenden Arbeit.

1.2.4 Tumorzellarrest und -extravasation zirkulierender Pankreaskarzinomzellen

1.2.4.1 Tumorzellarrest mittels tumorinduzierter Fibrinbildung und NETs

Damit ein metastatischer Tumor in der Leber entstehen kann, müssen die zirkulierenden Pankreaskarzinomzellen, die über die Pfortader in die Mikrozirkulation der Leber gelangt sind, zunächst dort arretieren, um in das umliegende Gewebe zu extravasieren, wo sie sich teilen und ausbreiten. Wie in Kapitel 1.2.3.3 bereits erörtert,

sind die von Neutrophilen stammenden NETs in der Lage, den Arrest und die Extravasation zirkulierender Tumorzellen zu fördern. Ergebnisse unserer Forschungsgruppe haben gezeigt, dass auch die Koagulation mit Fibrinbildung eine Rolle in der Metastasierung des Pankreaskarzinoms spielt. Es ist bekannt, dass das Auftreten eines Pankreaskarzinoms in einem engen Zusammenhang mit tiefen Beinvenenthrombosen und Thromboembolien steht⁷⁸ – inwieweit die Karzinomzellen diese Fähigkeit zur Beeinflussung der Hämostase zur Extravasation nutzen können oder ob die Koagulation dem Wirt als Abwehrmechanismus dient, soll anhand der folgenden Arbeit analysiert werden.

1.2.4.2 Tumorinduzierte Aktivierung der sekundären Hämostase

Die Koagulationskaskade im Zuge der sekundären Hämostase ist ein komplexer Vorgang, der nicht nur der Blutstillung und dem Wundverschluss, sondern auch der Immunabwehr dienlich ist.⁷⁹ Die Fibrinbildung kann durch zwei Pfade, den extrinsischen und den intrinsischen, initiiert werden. Beide Pfade konvergieren in der Aktivierung des Faktors X, woraus die Bildung und Vernetzung des Fibrins resultiert.⁸⁰ Pankreaskarzinomzellen tragen prokoagulatorische Moleküle wie bspw. TF oder Phosphatidylethanolamin auf ihrer Zellmembran, mit Hilfe derer sie den extrinsischen Pfad aktivieren.^{78,81} Jedoch auch der Wirt reagiert auf die zirkulierenden Tumorzellen mittels Aktivierung der Gerinnungskaskade.⁷⁸ Somit kommt es in der Mikrozirkulation der metastatischen Leber zu einer sowohl tumor- als auch wirtsinduzierten Fibrinbildung.

1.2.4.3 Prämetastatische Nische

Unter der prämetastatischen Nische versteht man die tumorinduzierte Konditionierung des Gewebes im Zielorgan der Metastasierung, um die Bildung von Metastasen vorzubereiten.⁸² Dies geschieht mutmaßlich schon in den frühen Phasen der Tumorgenese und vor dem Eintritt der Tumorzellen in den Blutstrom.⁸³ Als Mechanismen zur Schaffung einer prämetastatischen Nische werden von den Tumorzellen in die Blutzirkulation abgegebene extrazelluläre Vesikel, durch Thrombozytenaggregation ausgelöste Thromben sowie chemotaktisch rekrutierte Immunzellen genannt.^{55,56} Bei diesen Immunzellen handelt es sich im Besonderen um metastasenassoziierte Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, MDSCs und Kupfferzellen (siehe 1.2.3).^{56,83–85}

1.2.4.4 Potentielle Mediatoren der Tumorzellextravasation

Damit die arretierte Tumorzelle aus dem Gefäß in das Gewebe gelangen kann, sind Mechanismen zur Permeabilisierung der dichten Barriere des Endothels erforderlich. Daran sind vermutlich verschiedene Mechanismen beteiligt.

Aufgrund der Fibrin- bzw. NETs-Bildung in den Mikrogefäßen könnte es zu deren Verschluss kommen, wodurch das von dem Gefäß versorgte Gewebeareal hypoxisch werden könnte. Im Falle einer Hypoxie ist die Permeabilisation der Gefäße lokal gesteigert, wodurch die Tumorzelle extravasieren könnte. Primärtumore können bekannterweise derartige Hypoxien nutzen, um die Metastasierung voranzutreiben.⁸⁶ Zum Nachweis von Hypoxien werden Pimonidazol bzw. Antikörper gegen den durch Hypoxie induzierten Faktor HIF1 α verwendet. Pimonidazol (2-Nitroimidazol) ist ein Reagenz, welches, nachdem es der Maus intravenös injiziert wurde, an Proteine hypoxischer Gewebsareale bindet.^{87,88} HIF1 α stellt eine der beiden Untereinheiten des Transkriptionsfaktors HIF1 dar, welche in hypoxischen Geweben exprimiert wird, um dem Sauerstoffmangel der Zellen entgegenzuwirken.^{89,90}

Einen weiteren möglichen Mechanismus der Permeabilisierung, den die Tumorzellen zu ihren Zwecken nutzen könnten, könnten die Liganden des Thyrosinkinase-Rezeptors Tie2 darstellen: Angiopoietin1 und Angiopoietin2. Die Angiopoietine gehören zur Gruppe der Wachstumsfaktoren und spielen in der Angiogenese und Permeabilisierung von Blutgefäßen eine bedeutende Rolle.⁹¹

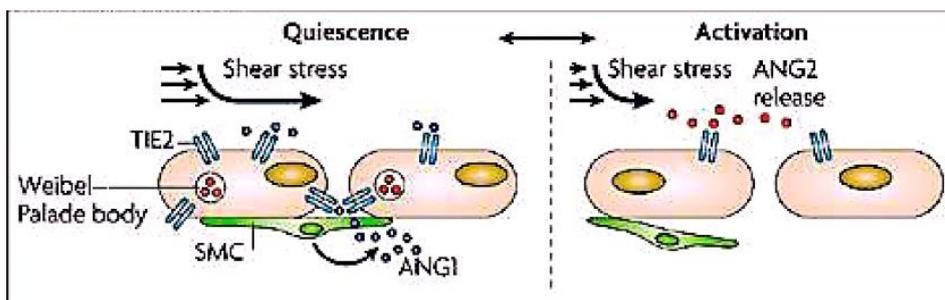


Abbildung 4

Funktionsweise des Angiopoietin-Tie-Systems

Angiopoietin2 wird in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Subendotheliale glatte Muskelzellen (SMC) scheitern die Freisetzung von Angiopoietin1 aus, welches an den Thyrosinkinase-Rezeptor Tie2 bindet und so die Stabilität des Endothels aufrechterhält. Die Aktivierung des Endothels fördert die Sekretion von Angiopoietin2. Dieses bindet als Antagonist an den Tie-Rezeptor und verdrängt so das Angiopoietin1. Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels.

Adaptiert nach Augustin, Youngh Koh, Thurston & Alitalo 2009⁸⁹

Während Angiopoietin1 durch Bindung und Aktivierung des Tie2-Rezeptors für die Stabilisierung der Gefäßwand sorgt und die Permeabilität herabsetzt, erhöht dessen kompetitiver Antagonist Angiopoietin2 die Permeabilität von Gefäßen, indem es die Zellverbindungen zwischen den Endothelzellen löst (Abbildung 4).⁹²⁻⁹⁴ Zudem fördert Angiopoietin2 in Kooperation mit den Wachstumsfaktoren VEGF die Angiogenese und Neovaskularisation bei Primärtumoren und unterstützt so die Tumorprogression und Tumormetastasierung.^{91,93} Angiopoietin2 wird in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert und kann bei Bedarf in den Extrazellullarraum abgegeben werden. Angiopoietin1 hingegen wird in perivaskulären Zellen exprimiert.^{93,95} Vor allem während einer Entzündung oder beim Auftreten eines Tumors wird vermehrt Angiopoietin2 von aktivierten Endothelzellen ausgeschüttet.^{93,96} Angiopoietin2 fördert die Apoptose der Endothelzellen, und es kommt zu einer Hypoxie des Versorgungsgebietes, welche durch die Hochregulierung von VEGF antagonisiert werden kann. Die Erhöhung der VEGF-Konzentration führt zur Angiogenese und Neovaskularisation des Tumorstromas.⁹¹ Der Tie2-Rezeptor wird vor allem auf Endothelzellen exprimiert, ist aber auch auf tumorassoziierten Makrophagen zu finden. Tie2+ Makrophagen können die Angiogenese von tumoralen Gefäßen sowie die Metastasierung fördern.^{93,97,98}

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden insbesondere die folgenden Fragestellungen zum Metastasierungsprozess des Pankreaskarzinoms in der Mikrozirkulation der Leber untersucht:

- Welche Zellen des angeborenen Immunsystems interagieren mit den arretierten Pankreaskarzinomzellen?
- Welche Rolle spielen Gefäßokklusionen und die daraus möglicherweise resultierende Hypoxie des Gewebes?
- Inwiefern beeinflussen lokal gebildetes Fibrin und NETs den Arrest und die Extravasation der Tumorzellen?
- Gibt es Hinweise auf die Beteiligung des Angiopoietin-Tie2-Systems auf die Extravasation der Tumorzellen?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Gerätschaften und Apparaturen

Produkt	Firma
Analysenwaage, LA 214i	VWR International (Radnor, USA)
Biologische Sicherheitswerkbank MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)
Elektronische Pipettierhilfe	Integra-Bioscience AG (Biebertal, D)
Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen, D)
Kryostat CM3050	Leica Biosystems AG (Wetzlar, D)
Lichtmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss GmbH (Jena, D)
LSM 510 Meta	Carl Zeiss GmbH (Jena, D)
Magnetrührer RCT	IKA GmbH & Co. KG (Staufen, D)
Mikropipetten (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG (Hamburg, D)
pH Meter HI221	HANNA instruments (Québec, Canada)
Thromboelastograph ROTEM	RoTEG Dynabyte GmbH
Vortexer	Satorius (Göttingen, D)
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik GmbH (Allentown, USA)
Zählkammer Neubauer Improved	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D)
Zentrifuge (Rotina 22R, 35R)	Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, D)

3.1.2 Pankreaskarzinomzellreihe

Bezeichnung	Herkunft	Ansprechpartner
KPC	Pankreaskarzinomzellen der Maus	Dr. Hana Algül, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der TU München

3.1.3 Mausmodelle für Tierversuche

Gattung	
C57BL/6, M/F, 20-35 g, ca. 8-12 Wochen alt	Charles River (Wilmington, USA)
LysM-eGFP	
CX3CR1-eGFP	

FXII-/-	
---------	--

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma	Katalognummer
500ml Vakuum Filter System (0,22µm Polyethersulfon)	Corning Inc. (New York, USA)	431097
DAKO Pen	Agilent Dako (Santa Clara, USA)	S200230-2
Deckgläser 24 x 50mm	Menzel-Gläser	
Einwegskalpell, No. 10	Feather	
Zellkulturflasche (gerader Hals, 175cm ²)	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	353112
Zellkulturflasche (gerader Hals, 25cm ²)	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	353107
Multiwell 24 Well	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	353226
µ-Platte 96 Well Schwarz	Ibidi GmbH (Martinsried, D)	89626
Objektträger SuperFrost plus	Omnilab GmbH & Co. KG (Bremen, D)	5161155
Pipette (serol, Wattestopf, 10ml)	Omnilab GmbH & Co. KG (Bremen, D)	CORN4488
Pipette (serol, Wattestopf, 5ml)	Omnilab GmbH & Co. KG (Bremen, D)	CORN4487
Pipettenspitzen Towerpack 100-1000µl	Gilson International B.V. (Limburg, D)	F167104
Pipettenspitzen Towerpack 1-10µl	Gilson International B.V. (Limburg, D)	F167101
Pipettenspitzen Towerpack 2-200µl	Gilson International B.V. (Limburg, D)	F167103
Reaktionsgefäß Safe-Lock (1,5 ml, farblos)	Omnilab GmbH & Co. KG (Bremen, D)	5283517
Reaktionsgefäß Safe-Lock (2 ml, farblos)	Omnilab GmbH & Co. KG (Bremen, D)	5283518
ROTEM Cup und Pin pro	Tem Innovations GmbH (München, D)	200011
Safety-Multifly Kanüle	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)	
Spritzen zweiteilig (5ml)	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	309050
Spritzen zweiteilig (10ml)	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	309110
Tissue Tek O.C.T Compound	Sakura	1825902828
Zentrifugenröhrchen, Falcon® 15 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)	10773501

Zentrifugenröhrchen, Falcon® 50 ml	Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, D)	10788561
------------------------------------	--	----------

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Firma	Produktnummer
Aceton 99,8%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	9372.2
Bovine Serum Albumin, heat shock fraction, pH 7, 98%	Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg, D)	A7906-100G
Calciumchlorid-Dihydrat 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	HNO4.1
CMTPIX (Zell-Tracker, rot)	Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, USA)	C34552
CTI (Corn Trypsin Inhibitor)	Calbiochem	650345
DMSO (Dimethylsulfoxid) 99,8%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	4720.2
DMEM 1g/l Glucose, D-Glucose, LGlutamine, Pyruvat-frei	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	31885-023
DMEM 4,5g/l Glucose, D-Glucose, LGlutamine, Pyruvat-frei	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	41965-039
DNase I	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)	11284932001
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg, D)	E-9884
Eosin G	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	7089.1
Ethanol vergällt 99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	K928.3
FBS (Fetal Bovine Serum), qualified, heat inactivated	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	10500-064
Fentanyl Piramal (0,5mg)	Piramal Critical Care GmbH (Hallbergmoos, D)	
Formalin	Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg, D)	F-8775
Freezing Medium	Ibidi GmbH (Martinsried, D)	80023
Glycerol	Calbiochem	356350-1000ML
Hepes 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	9105.4
Isofluran CP (1ml/ml)	cp-Pharma (Burgdorf, D)	1214
Kaliumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, D)	4936

Kaliumdihydrogenphosphat, 99%, p.a., ACS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	3904.1
Mayer´s Hematoxylin	Science Service GmbH	26381-02
MEM NEAA (100X)	PAN Biotech GmbH (Aidenbach, D)	P08-32100
Medetomidinhydrochlorid Dorbene vet (1mg/ml)	Zoetis	
Midazolam (5mg/ml)	B. Braun (Melsungen, D)	2007152
Natriumchlorid 99%, PhEur., USP	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	P029.2
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, 99,5%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	4984.1
Natronlauge mind. 32%	Merck KGaA (Darmstadt, D)	5590
Nuclease freies Wasser	QIAGEN N.V. (Venlo, Niederlande)	129114
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg, D)	P6148.500G
PBS (phosphat buffered saline)	Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg, D)	D8537
Penicillin/Streptomycin (100X)	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	15140-122
Pimonidazol Hydrochlorid	Hypoxypore (Burlington, USA)	HP10-100mg
Rivaroxaban	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)	sc-208311
Salzsäure 37%, reinst	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	9277.1
TNC (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	Merck KGaA (Darmstadt, D)	1.12005
Trypsin-EDTA Solution (10X)	Sigma-Aldrich GmbH (Hamburg, D)	59418C-100ML
Vitamine (MEM-Vitaminmix 100X)	Merck/Millipore	K0373

3.1.6 Puffer

Ca/Hepes (TEG)	10mM Hepes 100mM CaCl ₂ ddH ₂ O pH 7,4
PBS (Phosphate Buffered Saline)	8g NaCl 0,2g KH ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O 0,2g KCl 1L ddH ₂ O pH 7,4

TNC (tri-Natrium-Citrat zur Blutabnahme)	3,68g TNC 100ml ddH ₂ O Steril gefiltert
--	---

3.1.7 Antikörper

Produkt	Firma	Produktnummer
Anti-Angiopoietin1	Abcam (Cambridge, GB)	Ab8451
Anti-Angiopoietin2	Abcam (Cambridge, GB)	Ab8452
Anti-Biotin FITC	Milteny Biotec (Bergisch Gladbach, D)	130-090-857
Anti-CD45	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)	MCA1031GA
Anti-CX3CR1	Bioss antibodies (Woburn, USA)	bs-1728R
Anti-CX3CR1	Novus Biologicals (Centennial, USA)	NBP1-76949
Anti-F4/80	Biolegend (San Diego, USA)	123102
Anti-H2A-H2B-DNA		
Anti-HIF1 α	Novus Biologicals (Centennial, USA)	NB100-479
Anti-Histon H3 (citrulline R2+R8+R17) – CHIP Grade	Abcam (Cambridge, GB)	ab5103
Anti-Ly6C (ER-MP20)	Abcam (Cambridge, GB)	ab15627
Anti-Ly6G	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	551459
Anti-Myeloperoxidase	Abcam (Cambridge, GB)	ab9535
Anti-Pimonidazol Biotin-konjugiert (aus Kit)	Hypoxyprobe (Burlington, USA)	HP10-100mg
Anti-Stabilin-2		
Anti-Stabilin-2	Biozol Diagnostica GmbH (Eching, D)	D317-3
Donkey anti-Mouse, Alexa Fluor 488	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	A21202
Goat anti-Mouse, Alexa Fluor 546	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	A11003
Goat anti-Rabbit, Alexa Fluor 488	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	A11034
Goat anti-Rabbit, Alexa Fluor 546	Life Technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)	A11035

Goat anti-Rat, Alexa Fluor 488	Life Technologies/Thermo (Waltham, USA)	Fisher	A11006
Goat anti-Rat, Alexa Fluor 546	Life Technologies/Thermo (Waltham, USA)	Fisher	A11081

3.1.8 Labeling Kits

Produkt	Firma	Produktnummer
Alexa Fluor 546 Antibody Labeling Kit	Invitrogen/Thermo Fisher (Waltham, USA)	A20183
Lightning-Link R-PE Labeling Kit	Expedeon (San Diego, USA)	703-0010
Lightning-Link R-PE Labeling Kit	Innova Biosciences (Cambridge, UK)	703-0010

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

3.2.1.1 Herstellung des Nährmediums

Die Grundlage der Medien für Zellkulturen bildete DMEM high glucose bzw. DMEM low glucose. Für die KPC-Zellreihe verwendeten wir ein DMEM high glucose Medium (4,5 g/l) mit 50ml Fetal bovine serum (FBS), 5ml Penicillin-Streptomycin sowie 12ml MEM Non-essential amino acid solution (NEAA). Das FBS wurde zuvor bei 56°C für 30 Min. im Wasserbad hitzeinaktiviert und anschließend mit Hilfe eines Vakuum Filter Systems steril gefiltert, bevor es dem DMEM hinzugefügt wurde.

3.2.1.2 Die KPC-Zelllinie

Die KPC-Zelllinie entstammt dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas und weist die beim humanen Pankreaskarzinom typischerweise auftretende LSL-KRAS^{G12D/+} Punktmutation sowie LSL-Trp53^{R172H/+} Deletionsmutanten auf. Die Expression der Mutationen ist abhängig von PDX1 und einer Cre-Rekombinase, wodurch das Auftreten des Karzinoms in der Pankreas gezielt gesteuert werden kann. Zudem besitzt die Zelllinie die Fähigkeit, spontan zu metastasieren. Diese Eigenschaften machen diese Zelllinie geeignet für Experimente an Mäusen.

3.2.1.3 Auftauen der Zelllinien

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Pankreaskarzinomzellen für 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das

Zellpellet in 800µl Medium vorsichtig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die im Medium suspendierten Zellen in eine Zellkulturflasche mit 10-20ml Medium überführt. Die Zellen adhärten am Boden der Flasche und teilen sich danach.

3.2.1.4 Mediumwechsel

Die Zellteilung und das Zellwachstum können nicht nur mit Hilfe eines Lichtmikroskops beobachtet werden, sondern zeichnen sich auch im Farbwechsel des Mediums ab. Wechselt die Farbe des Mediums von Lila-Rot zu einem Gelb-Orange sollte das Medium gewechselt werden. Hierfür wurde das Medium abpipettiert und der Boden der Flasche mit 5ml sterilem PBS gespült, danach wurde frisches Medium zugegeben.

3.2.1.5 Teilen von Zellkulturen

War der Boden der Zellkulturflasche zu 80 bis 90% mit adhärten Zellen bedeckt, wurde die Zellkultur getrennt. Dazu wurde vorgegangen, wie bereits beim Mediumwechsel beschrieben. Allerdings wurde nach dem Spülen der Flasche mit PBS 1ml Trypsin in die Flasche gegeben. Ein vorsichtiges Schwenken der Flasche stellte sicher, dass das Trypsin sich über den Boden verteilt hatte. Dann wurde die Flasche für 7 Min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Trypsin bewirkt eine Trennung der Zellen untereinander sowie das Ablösen der Zellen vom Boden der Flasche.⁹⁹ Um eine Schädigung der Zellmembran zu vermeiden, betrug die Inkubationszeit mit Trypsin maximal 10 Min. Anschließend wurde die Flasche zweimal mit 5ml PBS gespült, um die abgelösten Zellen aufzunehmen und danach die Zellen in einem 50ml Falcon-Röhrchen zu sammeln. Die Flasche wurde zum Abschluss mit 10ml Medium gespült. Das Falcon-Röhrchen wurde bei 1500rpm für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1ml PBS resuspendiert. Zwischen 5000 und 10.000 Zellen wurden danach zurück in die mit frischem Medium versehenen Zellkulturflasche gegeben.

3.2.1.6 Zellzählung

Die nach der Teilung in PBS resuspendierten Zellen wurden zusammen mit PBS und 5µl Trypanblau in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und sorgfältig resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde auf eine Neubauer Improved Zählkammer appliziert, mit deren Hilfe die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden konnten. Hierfür wurden die Zellen auf beiden Seiten der Zählkammer ausgezählt. Anschließend verrechnet man das Ergebnis mit folgender Formel, um die Menge an

Zellen pro μl zu bestimmen: $(\text{Zellzahl}/2) * 50 * \text{Verdünnung}$. Der Faktor 50 in der Gleichung berücksichtigt das Volumen der Quadrate von $0,1\mu\text{l}$.

3.2.1.7 Einfrieren der Pankreaskarzinomzellen

Aus einer Flasche mit konfluierenden Zellen konnten 5×10^6 Zellen gewonnen werden.¹⁰⁰ Nach dem oben beschriebenen Splitten wurden die in PBS suspendierten Zellen auf 4 Violen verteilt und abermals bei 1500rpm für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand musste sorgfältig mit Hilfe einer Pipette entfernt werden. Die Zellen wurden anschließend in 1ml Einfrier-Medium resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.1.8 Färbung der Pankreaskarzinomzellen mittels langlebiger Fluorophore

Um den Vorgang der frühen Metastasierung des Pankreaskarzinoms in der Leber und die damit einhergehenden Immunreaktionen nachzuvollziehen, wurden Maus-Pankreaskarzinomzellen (2×10^6) in die Schwanzvene von Mäusen injiziert.

Die Tumorzellen wurden zuvor mit dem langlebigen Zelltracker CMTPX, dessen Maxima des Excitations- und Emissionsspektrums im roten Bereich (577 bzw. 602nm) liegen, markiert. Hierfür wurde der Fluorophor zunächst als 10mM Lösung in DMSO gelöst. Hieraus wurde eine $40\mu\text{M}$ Lösung mit PBS hergestellt. Diese wurde für 10 Min. bei 37°C vorgewärmt und dann mit einer Verdünnung von 1:1 der Zellsuspension zugegeben. Somit entstand letzten Endes eine Suspension mit einer CMTPX-Konzentration von $20\mu\text{M}$, die bei 37°C und 5% CO_2 für 20 Min. mit den Zellen inkubiert wurde. Im Anschluss daran wurden die markierten Zellen von dem nicht gebundenen Fluorophor durch wiederholtes Zentrifugieren bei 1500rpm für 5 Min. bei Raumtemperatur getrennt. Die gewaschenen und markierten Zellen resuspendierten wir abschließend in $350\mu\text{l}$ PBS.

3.2.1.9 Injektionsschemata und -protokolle

Alle Experimente wurden unter Beachtung des Tierschutzgesetzes der Regierung von Oberbayern und dessen Richtlinien durchgeführt. C57BL/6-Mäuse wurden in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums unter keimfreien Bedingungen gehalten und versorgt. Für die vorgenommenen Versuche wurden 10-14 Wochen alte Mäuse verwendet. 6 Std. bzw. 9 Std. nach Karzinomzellinjektion wurden die Mäuse nach fachgemäßer Anästhesie durch Isofluran und MMF, einer Mixtur aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl, mittels Genickbruch getötet und die Organe entnommen.

Neben den C57BL/6 Mäusen, den sogenannten „Wildtyp-Tieren“, wurden die Karzinomzellen auch in Faktor XII^{-/-} Mäuse injiziert.

Ergänzend wurden auch Versuche mit Rivaroxaban durchgeführt, einem direkten Faktor Xa-Inhibitor.¹⁰¹ Rivaroxaban (3mg/kg Körpergewicht) wurde 4 Std. vor der Tumorzell-Injektion intravenös verabreicht. Da der Koagulationsinhibitor in DMSO gelöst wurde, das eine pharmakologische Wirkung aufweist, wurde zur Kontrolle DMSO zusammen mit den Tumorzellen injiziert.

Neben der Koagulationshemmung untersuchten wir auch die Bedeutung von NETs auf die Bewegungen der metastasierenden Zellen. Hierfür wurde den Mäusen 30 Min. vor der Tumorzell-Injektion 10µg DNase I intravenös sowie 50µg intraperitoneal injiziert.

Um die Möglichkeit der Entstehung eines hypoxischen Areal durch Tumorzellarrest mit darauffolgender Fibrin- und NETs-Bildung zu erforschen, wurde Pimonidazol in tumorsupplementierte Mäuse nach dem in Abbildung 5 dargestellten Schema injiziert.



Abbildung 5

Injektionsschema des Metastasierungsmodells zusammen mit einem Reagenz zur Hypoxiedetektion

Durch eine immunhistochemische Gewebefärbung kann Pimonidazol dann unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert und quantifiziert werden. Die Menge an detektiertem Pimonidazol ist direkt proportional zu dem Ausmaß an Hypoxie in einem Gewebe.

Die Detektion von tumorassoziierte Hypoxie in vivo wurde zusätzlich mit DNase I und Rivaroxaban nach den o.g. Schemata durchgeführt.

3.2.1.10 Entnahme und Fixierung der Organe

Den getöteten Mäusen wurden Leber, Milz, beide Nieren, Herz und Lungen entnommen und in verschließbaren Mikroreagenzgefäßen für 1 Std. in 2% Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Organe wurden anschließend über Nacht in einer 30%igen Saccharose-Lösung bei 4°C aufbewahrt, bevor sie ohne Flüssigkeit bei -80°C eingefroren wurden. Durch die Behandlung des entnommenen Gewebes mittels Saccharose werden Gefrierschäden, wie sie beispielsweise durch die Entstehung von Eiskristallen auftreten können, verhindert und Zelldeformationen vermieden.^{102,103} Die Gewebe müssen für mindestens 24 Std.

eingefroren bleiben, bevor sie zum Schneiden wieder aus dem Gefrierschrank entnommen werden können.

3.2.1.11 Anfertigung von Gefrierschnitten

Da das Pankreaskarzinom überwiegend in der Leber Metastasen bildet, wurde in unseren Experimenten die Leber der tumorsupplementierten Mäuse untersucht.

Um das Schneiden des Gewebes zu erleichtern, war es von Vorteil, die Leber bzw. andere Organe vor dem Einfrieren in kleinere Stücke zu zerteilen. Die eingefrorenen Organe wurden auf einem Stempel mittels Tissue-Tek, einem OCT Compound, fixiert. Dieser Stempel war in der dafür vorgesehenen Halterung angebracht, so dass das Gewebe durch Auf- und Abbewegung der Halterung samt Stempel in ca. 10µm dicke Scheiben geschnitten werden konnte. Die Innentemperatur des Kryostates sollte dabei -20°C, die des Messers -25°C betragen. Je drei Gewebeschnitte wurden auf einen SuperFrost-Plus-Objektträger übertragen, der mit den Daten des jeweiligen Tieres, wie z.B. Tiernummer und -art, beschriftet war. Die fertigen Objektträger wurden bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C gelagert, die Organe hingegen wurden nach dem Schneiden wieder bei -80°C aufbewahrt werden.

3.2.1.12 Immunhistochemische Gewebefärbungen

3.2.1.12.1 In-vivo-Färbungen der Mäuseleber

Die Immunhistochemie eröffnet die Möglichkeit, bestimmte Zell- oder Gewebestandteile durch gezielte Markierungen mittels Antikörper darzustellen. Der primäre Antikörper bindet sich spezifisch an das gewünschte Antigen. Der Antikörper kann entweder selbst bereits Träger eines fluoreszierenden Farbstoffes und damit primär-gelabelt sein oder er kann mit Hilfe eines weiteren, sekundären Antikörpers sichtbar gemacht werden. Durch Bindung des sekundären Antikörpers an den primären kann das gesuchte Antigen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert werden.

Zunächst wurden die vorgefertigten Gewebeschnitte auf den Objektträgern auf Raumtemperatur akklimatisiert, dann fixiert. Die Fixierung diente während des gesamten Färbeprozesses dem Anheften des Gewebes auf der Glasoberfläche des Objektträgers. Hierzu wurden 2% Paraformaldehyd (PFA) für 10 Min. oder eiskaltes Methanol-Aceton bzw. Aceton für 90 Sek. verwendet.

Anschließend wurden die Schnitte für je 3 Min. 3x in PBS gewaschen, dann erfolgte das Blockieren, um die unspezifische Bindung des Antikörpers zu minimieren. Mithilfe von Bovinem Serum Albumin (BSA), das in einer 2%-Lösung in PBS vorlag und für 35 bis 40 Min. bei Raumtemperatur auf die Gewebeschnitte einwirkte, wurden unspezifische Bindungsstellen besetzt, so dass diese dem Antikörper nicht mehr zur Verfügung standen. Um die Diffusion und die Bindung des primären Antikörpers im Gewebe zu erleichtern und zu verbessern, wurde je nach Antikörper statt der üblichen 2%-BSA-Lösung zum Blockieren 1% BSA mit 0,3% Triton in PBS gelöst verwendet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 40 Min. bei Raumtemperatur. Nach dem Blockieren wurde erneut 3x mit PBS gewaschen.

Bevor der Antikörper auf die einzelnen Gewebe pipettiert wurde, wurden diese mit einem wasserabweisenden Dako-Stift umkreist. Dies diente nicht nur dem konzentrierten Einwirken des Antikörpers auf das Gewebe, sondern verhinderte auch eine Austrocknung des Gewebes, da die Antikörperlösung tropfenförmig aufgebracht werden konnte und ein Verlaufen der Lösung vermieden wurde. Zudem wird bei der Benutzung mehrerer verschiedener Antikörper eine Vermischung ausgeschlossen. Der primäre Antikörper wurde in PBS gelöst auf das Gewebe pipettiert und konnte so über Nacht in einer lichtundurchlässigen, feuchten Inkubationsbox bei 4°C mit dem Antigen reagieren. Tabelle 1 gibt die Konzentrationen der verwendeten primären Antikörper an.

Antikörper	Hersteller	Art der Blockierung	Konzentration
Anti-Angiopoietin1	Abcam (Cambridge, GB)	1%BSA + 0,3%Triton	200µg/ml
Anti-Angiopoietin2	Abcam (Cambridge, GB)	1%BSA + 0,3%Triton	200µg/ml
Anti-CD45	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)	2% BSA	5µg/ml
Anti-CX3CR1	Bioss antibodies (Woburn, USA)	2% BSA	10µg/ml
Anti-CX3CR1	Novus Biologicals (Centennial, USA)	2% BSA	10µg/ml
Anti-F4/80	Biolegend (San Diego, USA)	2% BSA	1,25µg/ml
Anti-H2A-H2B-DNA		2% BSA	20µg/ml
Anti-HIF1α	Novus Biologicals (Centennial, USA)	2% BSA	5µg/ml

Anti-Histon H3 (citrulline R2+R8+R17) – CHIP Grade	Abcam (Cambridge, GB)	2% BSA	6,67µg/ml
Anti-Ly6C (ER-MP20)	Abcam (Cambridge, GB)	2% BSA	1µg/ml
Anti-Ly6G	BD Pharmingen (Franklin Lakes, USA)	2% BSA	10µg/ml
Anti-Myeloperoxidase	Abcam (Cambridge, GB)	2% BSA	10µg/ml
Anti-Pimonidazol Biotin-konjugiert (aus Kit)	Hypoxyprome (Burlington, USA)	2% BSA	5µg/ml
Anti-Stabilin-2		2% BSA	16,5µg/ml
Anti-Stabilin-2	Biozol Diagnostica GmbH (Eching, D)	2% BSA	2,5µg/ml

Tab. 1: Für die Immunhistochemie verwendete Antikörper

Nach abermaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper in PBS gelöst auf die Schnitte gegeben. Dieser sollte bei 4°C und für 1 Std. in der Inkubationsbox verbleiben. In Anschluss daran konnte nach erneutem Waschen ein weiterer primärer Antikörper w.o. beschrieben hinzugefügt werden. Zum Abschluss der Färbung wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Verdünnung von 1:5000 (in PBS) auf die Schnitte pipettiert und dort für 5 Min. bei Raumtemperatur belassen, bevor die Gewebe ein letztes Mal gewaschen werden. DAPI ist ein im blauen Frequenzspektrum emittierender DNA-Fluoreszenzfarbstoff, der zur Zellkernfärbung verwendet wird. Zuletzt wurde Glycerol als sogenanntes „mounting medium“ auf die Objektträger pipettiert und die Schnitte mit einem Deckglas zugedeckt. Dieses wurde mit Hilfe von Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

3.2.1.12.2 Visualisierung und Analyse durch konfokale Mikroskopie

Während bei der Fluoreszenzmikroskopie das gesamte Gewebe durchleuchtet und damit optisch erfasst wird, ermöglicht das konfokale Mikroskop durch den Zusatz einer Lochblende vor dem Detektor einen bestimmten Punkt bzw. eine Schicht im Gewebe zu fokussieren. Durch die Lochblende werden Lichtstrahlen, die nicht im Fokus sind, herausgefiltert, was sich in einem schärferen, kontrastreicherem Bild niederschlägt. Eine Aufnahme der verschiedenen Schichten des Gewebes ist nur möglich durch die Bewegung des Objektträgers in Z-Richtung mit anschließender 3D-Rekonstruktion der aufgenommenen Bilder (Abbildung 6).

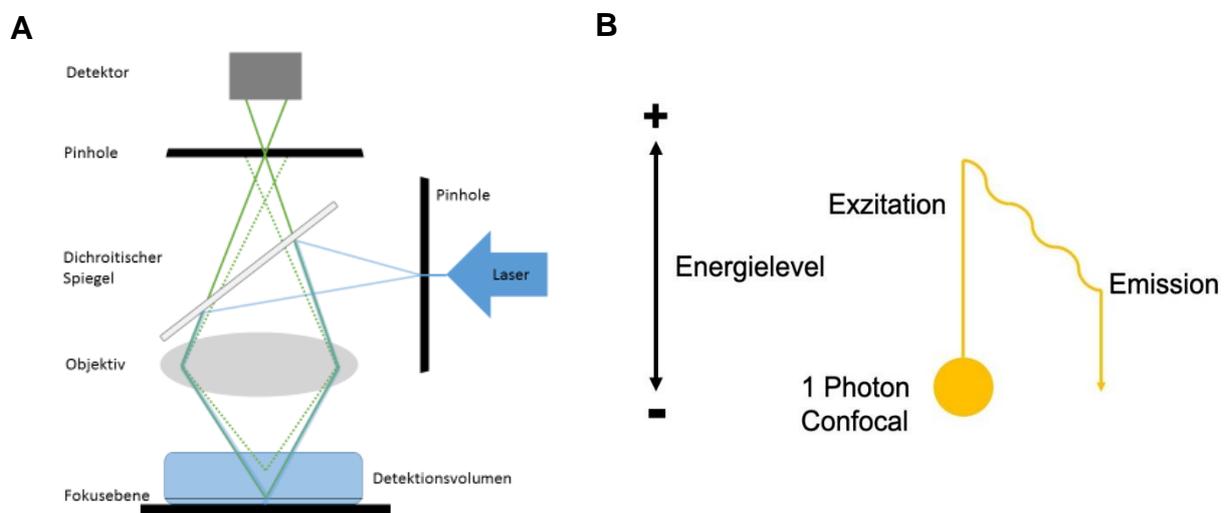


Abbildung 6

Funktionsweise eines Konfokalmikroskops

(A) Aufbau und Strahlengang eines Konfokalmikroskops

(B) Änderungen im Energielevel eines Photons während des Vorgangs der Fluoreszenz

Wie Abbildung 6A zeigt, werden die vom Laser ausgesandten Lichtstrahlen durch eine „Pinhole“, eine erste Blende, und über einen dichroitischen Spiegel zu dem Objektiv geleitet. Dieses fokussiert die Strahlen auf eine Ebene der Probe. Durch die einfallenden elektromagnetischen Lichtstrahlen wird der Energielevel der Elektronen im Objekt angehoben und diese in einen angeregten Zustand versetzt (Abbildung 6B). Dieser Vorgang wird als Exzitation bezeichnet. Sobald das Elektron wieder auf seinen ursprünglichen Energielevel zurückfällt, wird Energie in Form von Licht frei, die sog. Emission. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist energieärmer und dadurch langwelliger als die des absorbierten Lichts. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die emittierten Lichtstrahlen können den dichroitischen Spiegel passieren und treffen auf die zweite, eine für die Funktionsweise des konfokalen Mikroskops

entscheidende Lochblende. Je schärfer das Bild sein soll, desto kleiner muss die Größe der Blende gewählt werden. Somit gelangen nur diejenigen Lichtstrahlen zum Detektor, die aus der Fokusebene emittiert werden.¹⁰⁴

3.2.1.13 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Unterstützend zur Immunhistochemie wurde auch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angewandt. Während bei immunhistochemischen Färbungen gezielt bestimmte Zellbestandteile veranschaulicht und quantifiziert werden können, ermöglicht die HE-Färbung, die Morphologie eines Gewebes zu bewerten. Mit Hilfe des Hämatoxylins, eines eosinophilen, blauen Farbstoffs, werden die Kerne dargestellt, während der Antagonist, das Eosin, als basophiler Farbstoff vor allem Strukturen in Zytoplasma, Kollagen und Keratin rot färbt.^{105,106}

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden nach Entnahme aus dem Gefrierschrank auf Raumtemperatur akklimatisiert, bevor das Gewebe mit 4% Formalin für 30 Min. bei 4°C fixiert wurden. Anschließend wurden die Träger vorsichtig für 10 Min. unter fließendem destilliertem Wasser gespült, bevor sie für 6 Min. bei Raumtemperatur in eine Hämalaulösung gegeben wurden. Dann erfolgt das sogenannte „Bläuen“, ein Vorgang, bei dem durch das Spülen der Schnitte mit Leitungswasser ein pH-Wert von über 7 eingestellt wird und bei dem der im stark sauren Milieu bindende Farbstoff ein blau-violettes Signal gibt. Nach dem Bläuen wurden die Schnitte kurze Zeit (ca. 1 Min.) in 70% Ethanol getaucht, was zu einer Verdrängung des Wassers und damit zum Abbruch des Bläuens führt.¹⁰⁷ Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung mittels Eosin für 5 Min. bei Raumtemperatur. Bevor die Gewebe mit Hilfe von Glycerol eingedeckelt wurden, mussten sie abermals unter fließendem Wasser für 10 Min. gespült werden. Anschließend konnte das angefärbte Gewebe unter einem Durchlichtmikroskop betrachtet werden.

3.2.2 Intravitale Mikroskopie

3.2.2.1 2-Photonen-Mikroskop

Die Methode der Intravitalmikroskopie mittels 2-Photonen-Mikroskop wird für die Visualisierung von Gewebestrukturen in einem lebenden Organismus eingesetzt.

Bei dieser Methode der Bildgebung wird im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie ein Laser verwendet, der im langwelligen, niederenergetischen Bereich emittiert. Indem dieser gepulste Laser mittels zweier gleichzeitig absorbiertes Photonen das Elektron anregt, kommt es zu einer Verdoppelung der Schwingungsfrequenz des ausgesandten Lichts, und in Folge dessen können Photonen mit niedrigerer Frequenz und größerer Wellenlänge abgegeben werden (Abbildung 7).

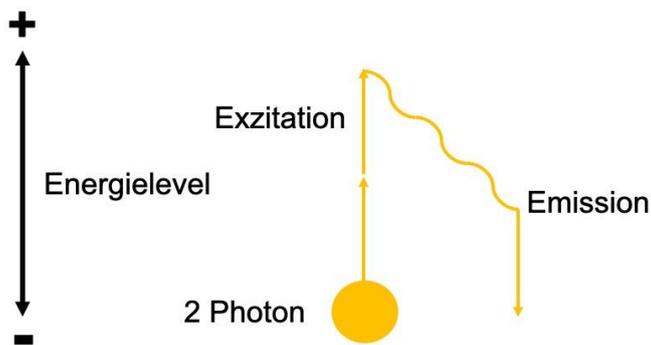


Abbildung 7

Funktionsprinzipien und Energielevel des 2-Photonen-Mikroskops

Dies bewirkt, dass die Laserstrahlen tiefer in das Gewebe eindringen und gleichzeitig weniger absorbiert sowie weniger gestreut werden. Dadurch erfährt das untersuchte Gewebe keine Exzitation und damit auch kein Ausbleichen außerhalb des Fokus, was eine Detektorblende entbehrlich macht. Die höhere Penetration der Laserstrahlen durch das Gewebe schafft die Voraussetzung, um dickere Gewebe zu untersuchen und Aufnahmen an lebenden Tieren durchführen zu können. Zudem ist durch eine 3D- und 4D-Rekonstruktion der Aufnahmen eine genauere und effiziente Analyse der Zellbewegungen möglich.

3.2.2.2 Präparation der Versuchstiere

Den Mäusen wurden zunächst die mit dem in Rot fluoreszierenden Zellmarker CMTPX markierten Karzinomzellen intravenös injiziert. Nach 7 Std. Zirkulation der Tumorzellen wurden die Versuchstiere mit Isofluran und MMF anästhesiert. Nach Überprüfung der Schmerzfreiheit wurden das Peritoneum der Maus eröffnet und die Leber freigelegt. Um eine optimale Bildgebung zu gewährleisten, wurde ein ausgewählter Lappen der Leber an einer lupenförmigen Fixierung mit Unterdruck festgesaugt. Diese Fixierung besteht aus einem runden Glasplättchen, das auf einer entsprechenden Halterung mittels viskösen Silikons befestigt wird. Eine elektronische Pumpe erzeugt einen

Unterdruck, so dass der Leberlappen an der Unterseite des Glasplättchens haftet. Die Halterung kann dann leicht angehoben und in der gewünschten Stellung fixiert werden. Das Anheben dient der Vermeidung von Störbewegungen durch Atmung und Herzschlag der Maus. Zur Darstellung des Blutflusses in der Leber wurde der Maus unmittelbar vor der Aufnahme Dextran Cascade Blue bzw. Fluorescein Isothiocyanate-Dextran (FITC-Dextran) intravenös injiziert. Zuletzt wurde ein Ultraschallgel auf die Oberseite der Glasscheibe gegeben, um die Übertragung der Bilder zu optimieren. Der fixierte Teil der Leber konnte nun im 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.2.3 Statistische Evaluation

Die erhobenen Daten und Resultate der vorgenommenen Experimente sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (S.E.M.) dargestellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe der Prism Software (Graphpad, USA) mittels ungepaartem, zweiseitigem t-test bzw. one way ANOVA. Unterschiede der Mittelwerte mit $p < 0,05$ wurden als signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1 Adhäsion der Karzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber

In den in-vivo-Experimenten an Mäusen wurde die hämatogene Metastasierung des Pankreaskarzinoms imitiert, indem die mit CMTPIX markierten Tumorzellen in die Schwanzvene der Maus injiziert wurden. Dabei wurden in Mikrogefäßen arretierte Tumorzellen von bereits extravasierten Tumorzellen unterschieden. Mittels α -Stabilin-2 Antikörper wurde die sinusoidale Gefäßwand markiert.

Abbildung 8 zeigt, dass die Gesamtzahl an leberassoziierten Karzinomzellen sich nach 2 Std. und 6 Std. nicht unterscheidet und nach 9 Std. gegenüber 2 und 6 Std. erhöht ist.

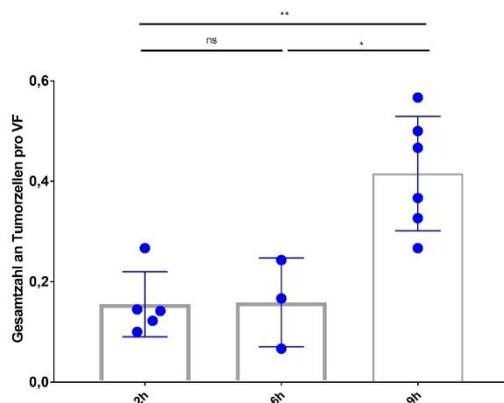


Abbildung 8

Zeitabhängigkeit der Menge an leberassoziierten Tumorzellen

Gesamtzahl leberassoziierteter Tumorzellen pro visuellem Feld (VF) zu diversen Zeitpunkten. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der Versuchstiere. Pro Tier wurden 30 aneinander anschließende VF analysiert. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass nach Injektion der Tumorzellen die Fibrinbildung in der Mikrozirkulation der Leber nach 6 Std. ihren Höhepunkt erreicht, die Extravasation der Tumorzellen jedoch weiter ansteigt¹⁰⁸. Dies deutet auf weitere Akteure neben Fibrin in der Tumorzelleextravasation hin. Um zunächst herauszufinden, ob und inwiefern sich die Fibrinbildung und die Bildung von NETs auf die Adhäsion der Tumorzellen, welche der Tumorextravasation vorausgeht⁵⁶, auswirken, setzten wir drei verschiedene experimentelle Gruppen ein. Basierend auf den Ergebnissen hinsichtlich der Tumorzellzahl in der Leber, injizierten wir zunächst Tumorzellen und ließen diese für 9 Std. in der Maus zirkulieren. Der zweiten Kontrollgruppe wurden vor der Tumorzellinjektion das Rivaroxaban-Vehikel DMSO injiziert. In zwei weiteren Gruppen wurde entweder Rivaroxaban oder DNase1 vor der Karzinomzellinjektion appliziert (Abbildung 9).

Zunächst ermittelten wir den prozentualen Anteil der intravaskulär adhärenen Tumorzellen in der Mikrozirkulation an der Gesamtzahl leberassoziierter Tumorzellen in-vivo mittels konfokaler Mikroskopie. In den mit DNase1 behandelten Tieren war die Tumorzelladhäsion gegenüber den Kontrollgruppen erhöht, während kein signifikanter Unterschied zwischen der DMSO-Kontrollgruppe und der Rivaroxabangruppe zu beobachten war (Abbildung 9).

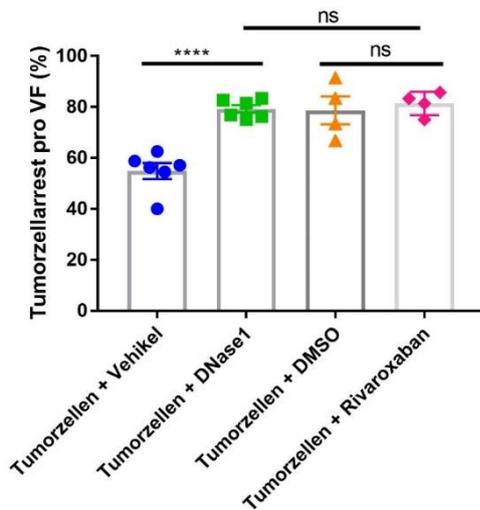


Abbildung 9

Tumorzellarrest nach Faktor Xa-Hemmung und Hemmung der NETs-Bildung

Prozentuale Quantifizierung von Tumorzellarrest im Verhältnis zur Gesamtzahl leberassoziierter Tumorzellen 9 Std. nach Tumorzellinjektion in WT-Mäusen. Die Gruppen beinhalteten: KPC-Zellen alleine (blaue Symbole), KPC-Zellen plus DNase1 (grüne Symbole), KPC-Zellen plus DMSO (orange Symbole) und KPC-Zellen plus Rivaroxaban (pinke Symbole). Der Graph gibt die durchschnittliche Zahl der arretierten Tumorzellen pro VF an. Die Symbole repräsentieren die Zahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. **** $p < 0,0001$.

4.2 Tumorzellarrest in der Mikrozirkulation der Leber

Intravitalmikroskopische Aufnahmen zwischen 6-10 Std. nach Tumorzellinjektion sowie die in Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse der Anzahl leberassoziierter Tumorzellen lassen darauf schließen, dass zu diesem Zeitpunkt eine ausreichende Zahl an Tumorzellen in der Leber zu finden ist, um deren Verhalten verlässlich nachweisen zu können. Zudem war bereits bekannt, dass die Fibrinbildung in den Mikrogefäßen 6 Std. nach der Zellinjektion ihr Maximum erreicht.¹⁰⁸

Somit bot die Zeitspanne zwischen 6-10 Std. optimale Voraussetzungen, um die Bewegungen der Tumorzellen in der Mikrozirkulation der Leber nachzuverfolgen. Pro

Maus wurden $2 \cdot 10^6$ CMTPIX-markierte Karzinomzellen injiziert. Vor Beginn der Bildgebung wurde FITC verabreicht, um den Blutfluss darzustellen (Abbildung 10).

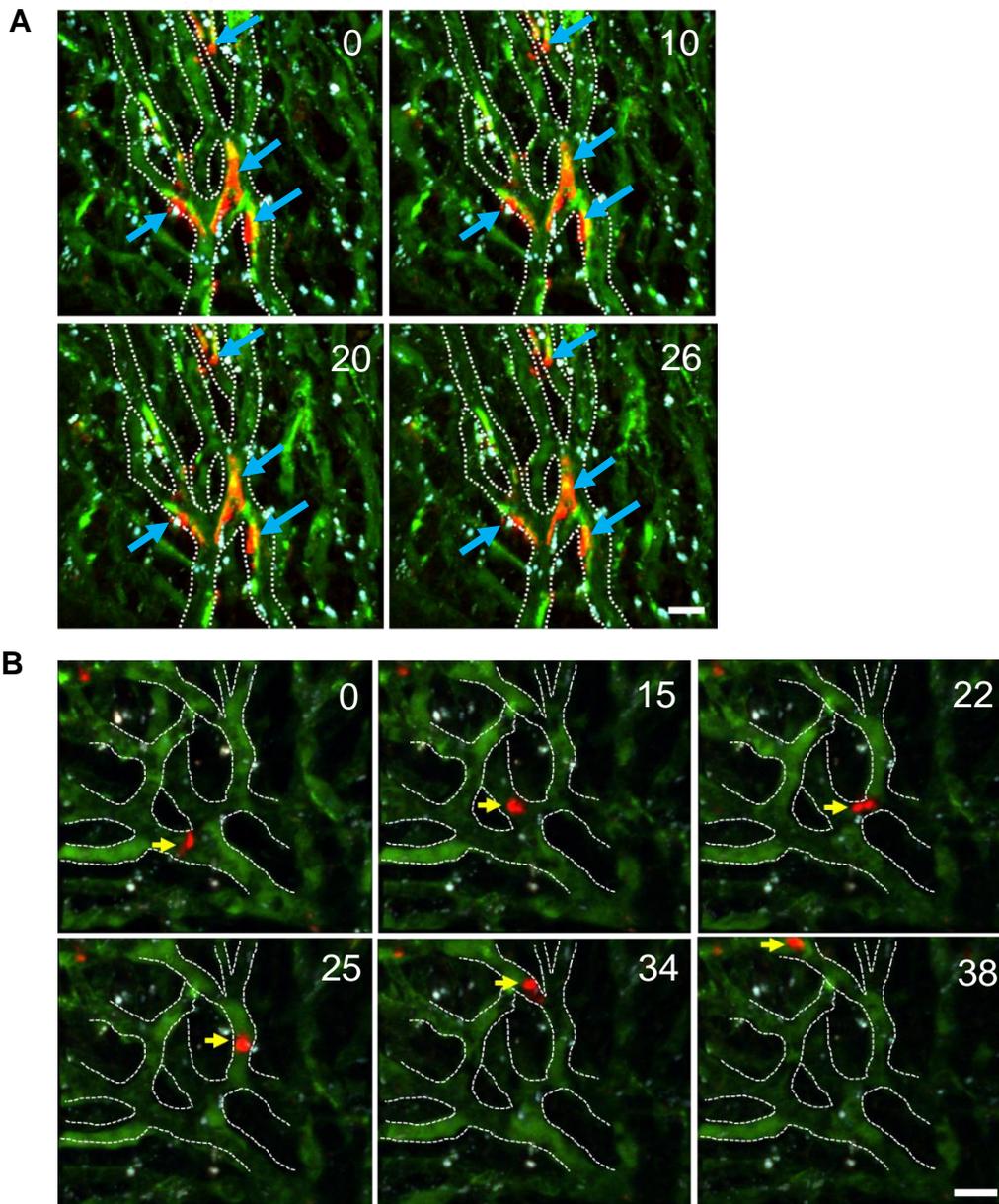


Abbildung 10

Intravitale Registrierung der Bewegungen von Pankreaskarzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber

(A) Arretierte Tumorzellen (blauer Pfeil) in Blutgefäßen der Leber.

(B) Bewegung einer Tumorzelle (gelber Pfeil) in Mikrogefäßen der Leber.

CMTPIX (Tumorzelle); FITC (Blutstrom). Weiße Autofluoreszenz (Kupferzellen). Gefäße durch gestrichelte, weiße Linie markiert. Zeitangabe (Min.) oben rechts. Maßstabsbalken 20µm.

In der überwiegenden Zahl der Fälle war zu beobachten, dass die Tumorzellen zu Beginn der Visualisierung bereits in den Mikrogefäßen der Leber arretiert waren (Abbildung 10A). Dabei zeigt sich, dass die Tumorzellen des Öfteren Cluster bildeten. Frei bewegende Tumorzellen waren seltener zu beobachten. Ihre Bewegungen

erfolgten entlang der Gefäße und waren oftmals auch gegen den Blutstrom gerichtet (Abbildung 10B).

4.3 Quantitative Auswertung der intravitalen Analysen von Tumorzellbewegungen

Als Nächstes analysierten wir die intravital mittels 2-Photonen-Mikroskopie gewonnenen Ergebnisse quantitativ. Hierbei verglichen wir Wildtyp-Mäuse mit den entsprechenden Kontrollmäusen, die mit DNase1 zur Inhibierung der NETs behandelt waren.

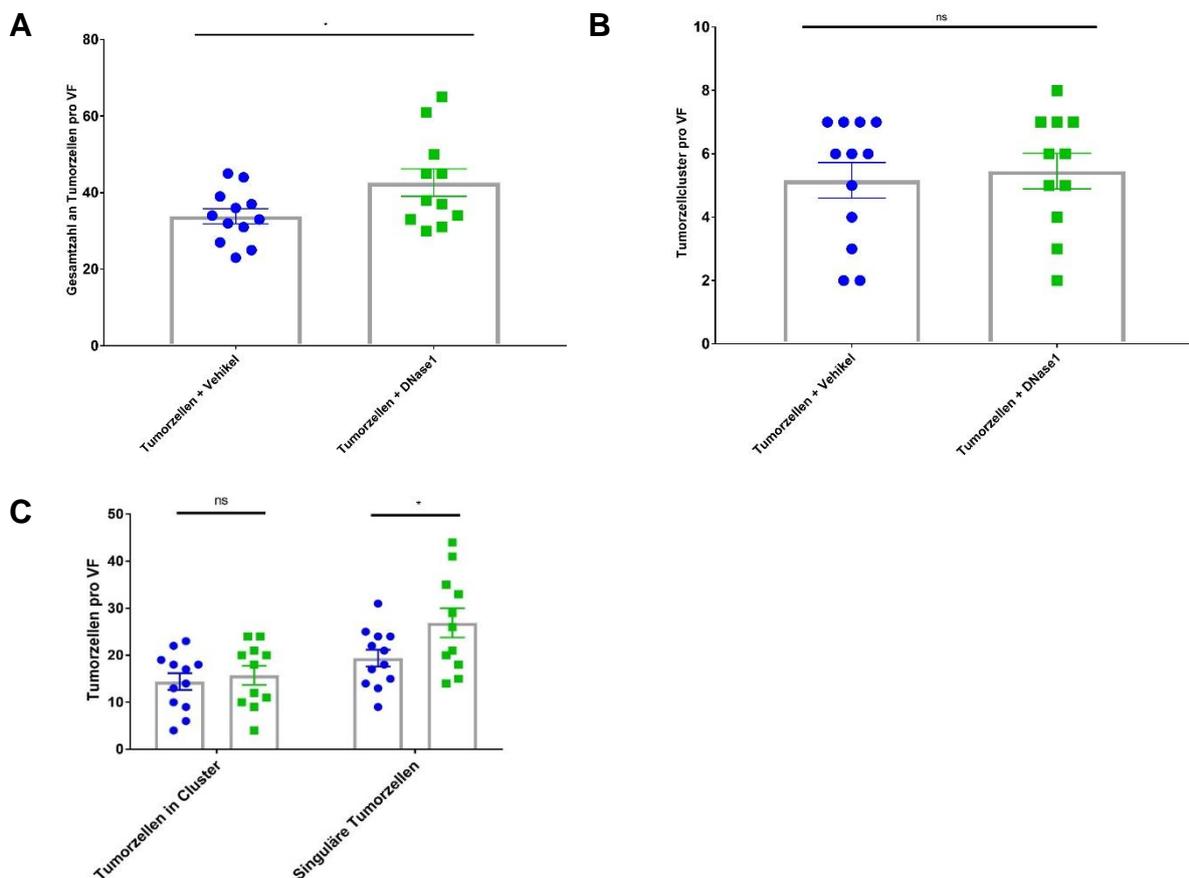


Abbildung 11

Quantitative Analyse der Tumorzellzahlen in intravitalen Aufnahmen der Leber nach Injektion von Pankreaskarzinomzellen

- (A)** Gesamtzahl an Tumorzellen in Kontrollmäusen (blaue Symbole) bzw. mit DNase1 behandelten Mäusen (grüne Symbole) 9 Std. nach der Tumorzellinjektion. Die einzelnen Symbole repräsentieren die Zahl der analysierten Videos. $n=2$ (Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$
- (B)** Quantifizierung der Tumorzellcluster pro VF 9 Std. nach der Tumorzellinjektion in der Kontrollgruppe (blaue Symbole) und in Mäusen, welche zusätzlich DNase1 injiziert bekamen (grüne Symbole). Die einzelnen Symbole repräsentieren die Zahl der analysierten Videos. $n=2$ (Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe). Mittelwerte \pm SEM.
- (C)** Quantitative Analyse und Differenzierung der Gesamttumorzellzahl in Cluster-assoziierte sowie singuläre Tumorzellen. Untersucht wurden Kontrollmäuse (blaue Symbole) sowie mit DNase1 behandelte Mäuse (grüne Symbole). Die einzelnen Symbole repräsentieren die Zahl der analysierten Videos. $n=2$ (Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$

Wie Abbildung 11A erkennen lässt, war in den mit DNase1 behandelten Tieren die Gesamtzahl der Karzinomzellen pro VF erhöht. Die Anzahl der Tumorzellcluster bzw. die Zahl der in Clustern befindlichen Zellen war unverändert (Abbildung 11B und C). Hingegen war die Zahl der einzeln auftretenden Karzinomzellen in den Tieren, in welche DNase1 injiziert wurde, gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 11C).

Des Weiteren beobachteten wir, dass die arretierten Karzinomzellen eine auffällige Affinität zur Kolokalisation mit den in der Leber residenten Makrophagen, den Kupfferzellen, aufweisen (Abbildung 12)

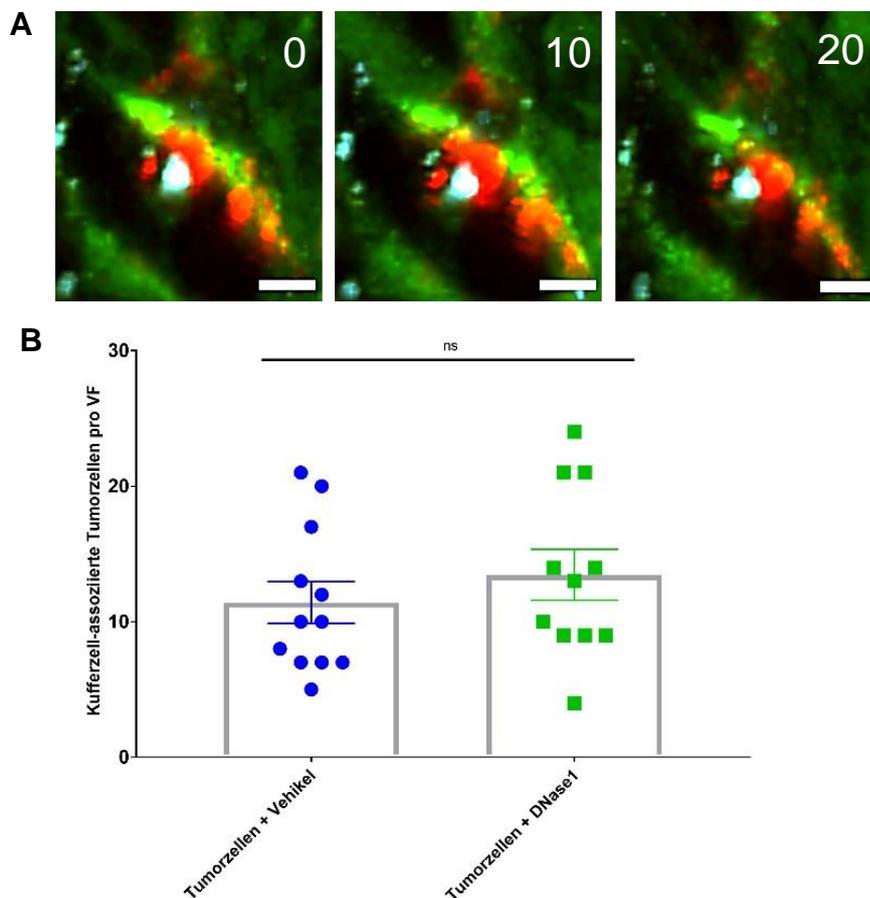


Abbildung 12

Interaktion der Tumorzellen mit Kupfferzellen

- (A)** Repräsentative Darstellung der Interaktion einer Karzinomzelle mit einer Kupfferzelle 9 Std. nach Injektion der Tumorzellen. CMTPIX (Tumorzelle); FITC (Blutstrom). Weiße Autofluoreszenz (Kupfferzellen). Zeitangabe (Min.) am rechten oberen Bildrand. Maßstabsbalken 5µm.
- (B)** Quantitative Analyse der Kolokalisation von Pankreaskarzinomzellen mit Kupfferzellen. Untersucht wurden Kontrollmäuse (blaue Symbole) sowie mit DNase1 behandelte Mäuse (grüne Symbole). Die einzelnen Symbole repräsentieren die Zahl der analysierten Videos. n=2 (Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe). Mittelwerte +/- SEM.

Es zeigte sich, dass pro VF mehr als zehn Karzinomzellen Kupfferzell-assoziiert waren, was einen relativen Anteil von über 30% an der Gesamtzahl der in der Mikrozirkulation befindlichen Tumorzellen ergibt (vgl. Abbildung 11A und Abbildung 12B). Die Tumorzell-Kupfferzell-Interaktion wurde durch die Behandlung mit DNase1 nicht beeinflusst (Abbildung 12B).

Danach untersuchten wir die intravasalen Bewegungen der Tumorzellen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Erneut verglichen wir bei der Analyse der Videos Kontrollmäuse mit Mäusen, die zusätzlich DNase1 erhalten hatten. Bei der Quantifizierung achteten wir dabei nicht nur auf die Zahl der mobilen Tumorzellen, sondern bestimmten auch die individuelle Geschwindigkeit der Tumorzellen.

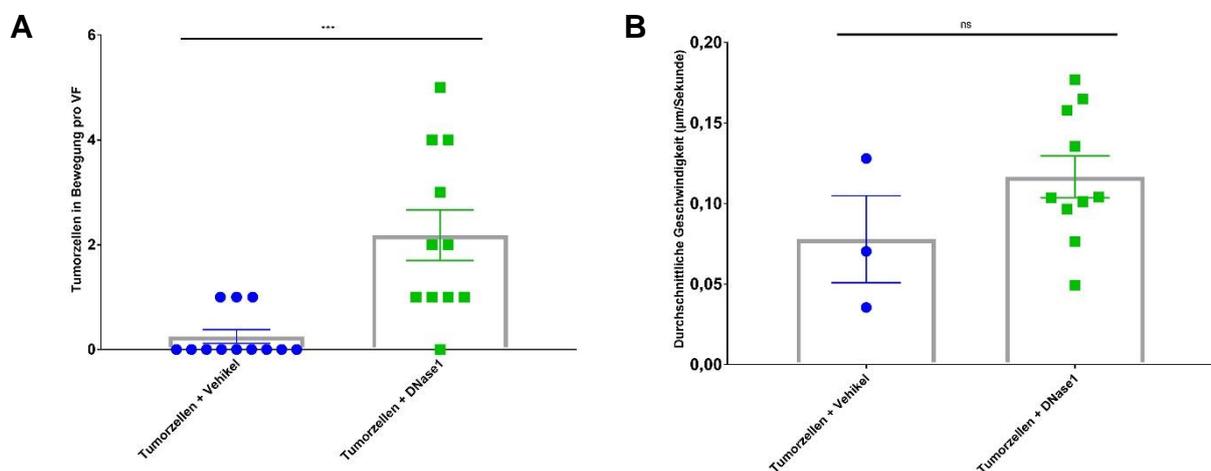


Abbildung 13

Quantifizierung mobiler Tumorzellen

- (A) Die Zahl mobiler Tumorzellen pro VF 9 Std. nach Karzinomzellinjektion in Kontrollmäusen wurde mit Mäusen verglichen, welche mit DNase1 behandelt wurden. Die einzelnen Symbole repräsentieren die Zahl der analysierten Videos. n=2 (Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe). Mittelwerte +/- SEM. *** p<0,001.
- (B) Quantifizierung der Durchschnittsgeschwindigkeit mobiler Tumorzellen in µm/Sek. Die einzelnen Symbole repräsentieren die Zahl der mobilen Karzinomzellen. n=2 (Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe). Mittelwerte +/- SEM.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich, sobald die Tiere mit DNase1 behandelt wurden, die Zahl der beweglichen Karzinomzellen stark erhöhte, während in der Kontrollgruppe mobile Zellen kaum zu beobachten waren (Abbildung 13A). Die Geschwindigkeit der mobilen Tumorzellen schien in beiden Versuchsgruppen annähernd gleich zu sein (Abbildung 13B).

4.4 Tumorzellextravasation in diversen experimentellen Mausmodellen

4.4.1 Darstellung der Extravasation einer Pankreaskarzinomzelle mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie

Wir analysierten neben dem intravasalen Verhalten der injizierten Karzinomzellen auch die Extravasation der Tumorzellen mittels intravitaler 2-Photonen-Mikroskopie. Dabei gelang es uns, die Extravasation einer Tumorzelle direkt zu visualisieren. Abbildung 14 zeigt eine 3D-Rekonstruktion der Passage der Karzinomzelle durch die sinusoidale Gefäßwand.

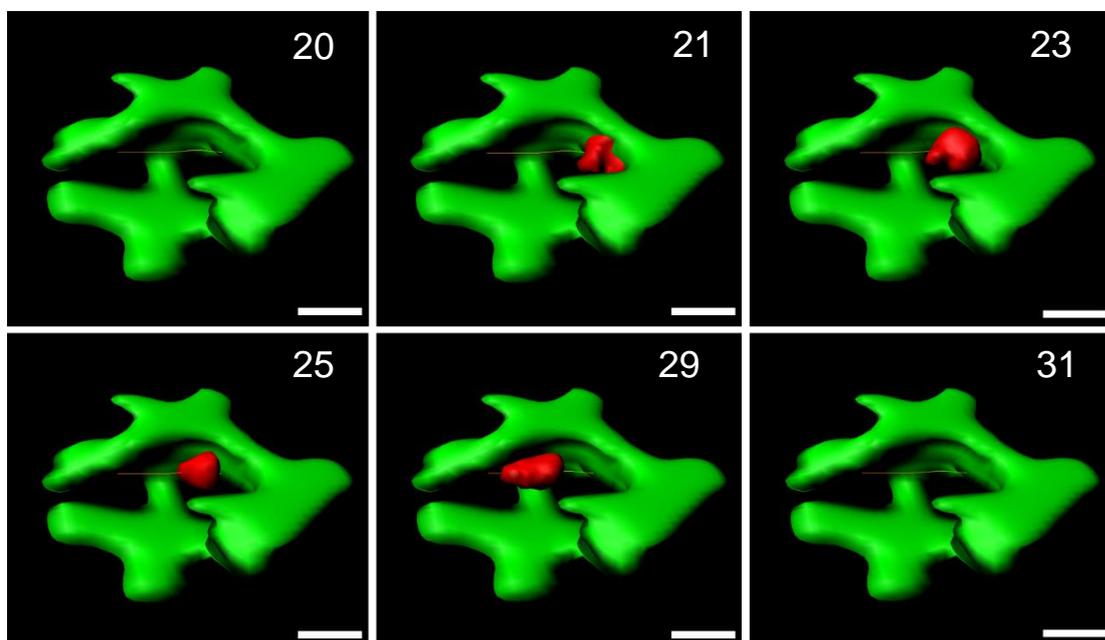


Abbildung 14

3D-Rekonstruktion der Extravasation einer Pankreaskarzinomzelle in vivo

Die sich mit dem Blutstrom bewegende Tumorzelle (rot) adhärert zunächst an die sinusoidale Gefäßwand (grün). Danach tritt die Zelle durch die Gefäßwand und bewegt sich weiter im perivaskulären Gewebe. Die farbige Linie zeichnet den Weg nach, den die Tumorzelle nimmt. Zeitangabe (Min.) am rechten oberen Bildrand. Maßstabsbalken 10µm.

Nach der Extravasation wird die Tumorzelle nicht immobilisiert, sondern bewegt sich im perivaskulären Raum weiter fort.

4.4.2 Die Rolle des Fibrins für die Extravasation von Pankreaskarzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber

Da sich Pankreaskarzinomzellen bei der Aktivierung der Koagulation Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zufolge hauptsächlich den extrinsischen Pfad der Gerinnung zunutze machen, können mit Hilfe der Faktor XII^{-/-}-Mäuse die Wirkungen der wirtsinduzierten Koagulation abgeschätzt werden. Abbildung 15A zeigt, dass bei einer in-vivo Untersuchung die Gesamtzahl der in den Faktor XII^{-/-}-Tieren befindlichen Tumorzellen, verglichen mit den Wildtyp Mäusen, unverändert war. Auch bei der Extravasation der Pankreaskarzinomzellen lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Faktor XII^{-/-}-Tieren feststellen (Abbildung 15B).

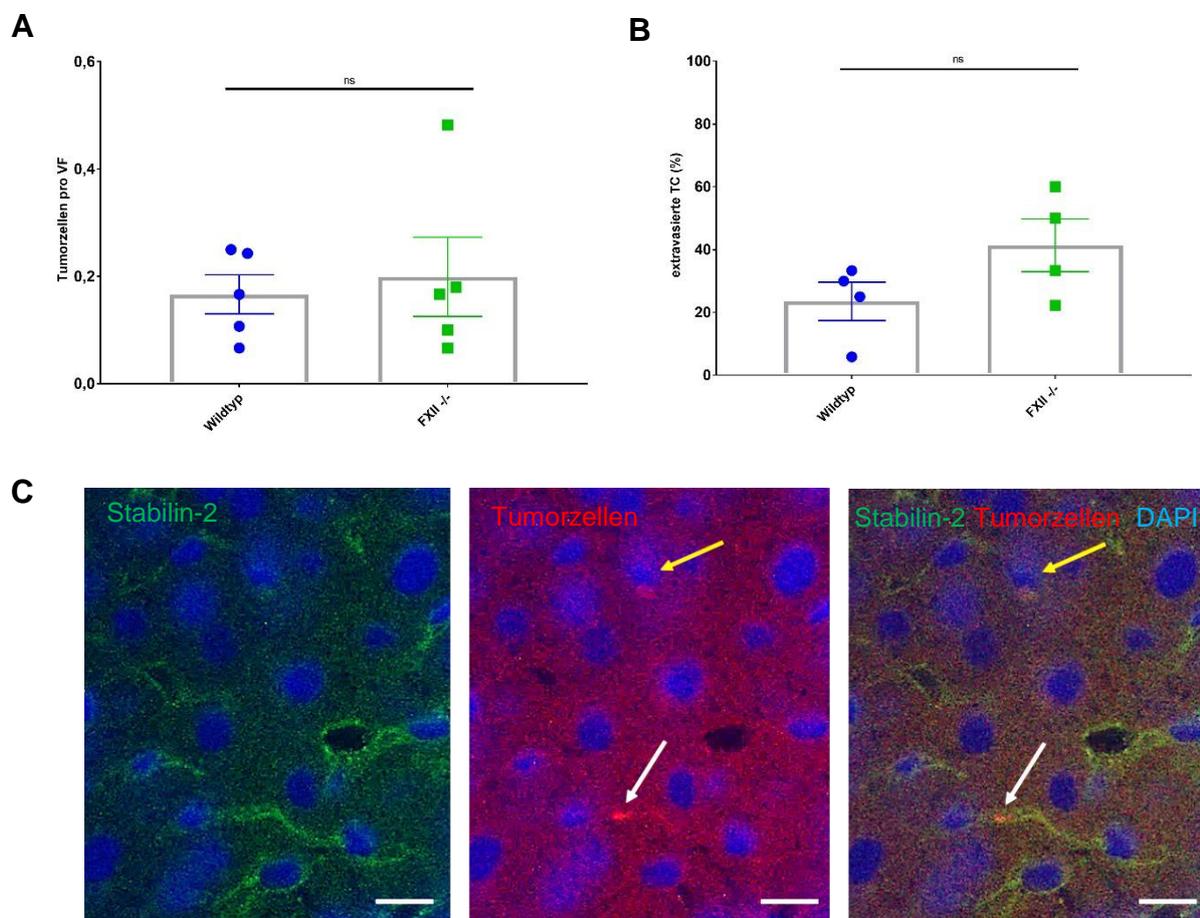


Abbildung 15

Quantitative Analyse der Karzinomzellen in Mäuselebern

- (A)** Quantifizierung der Gesamtzahl leberassoziierter Tumorzellen 6h nach der Karzinomzellinjektion in Wildtyp Mäusen (blaue Symbole) sowie Faktor XII^{-/-}-Mäusen (grüne Symbole). Es wurden je 30 kontinuierliche VF pro Versuchsgruppe quantifiziert. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM.
- (B)** Prozentualer Anteil extravasierter Tumorzellen an der Gesamtzahl detektierter Tumorzellen in-vivo. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwert +/- SEM. 100% = Gesamtzahl an detektierten Tumorzellen.
- (C)** Repräsentative Darstellung von Tumorzellarrest und -extravasation mittels konfokaler Mikroskopie. Der gelbe Pfeil markiert eine extravasierende Tumorzelle, der weiße Pfeil eine intravasal arretierte Tumorzelle. Alexa Fluor 488 (Stabilin-2); CMTPIX (Tumorzelle). Maßstabsbalken 10µm.

4.4.3 Unterschiedliche Einflüsse von NETs und Fibrin auf die Extravasation von Tumorzellen

Um die Auswirkung der NETs auf das Extravasationsverhalten der Tumorzellen von der des Fibrins differenzieren zu können, untersuchten wir abermals mithilfe konfokaler Mikroskopie die Extravasation der Karzinomzellen. Hierbei unterteilten wir die Versuchsgruppen in tumorsupplementierte Mäuse, welchen ein Vehikel injiziert wurde, von denen, welche zuvor mit Rivaroxaban oder DNase1 behandelt wurden.

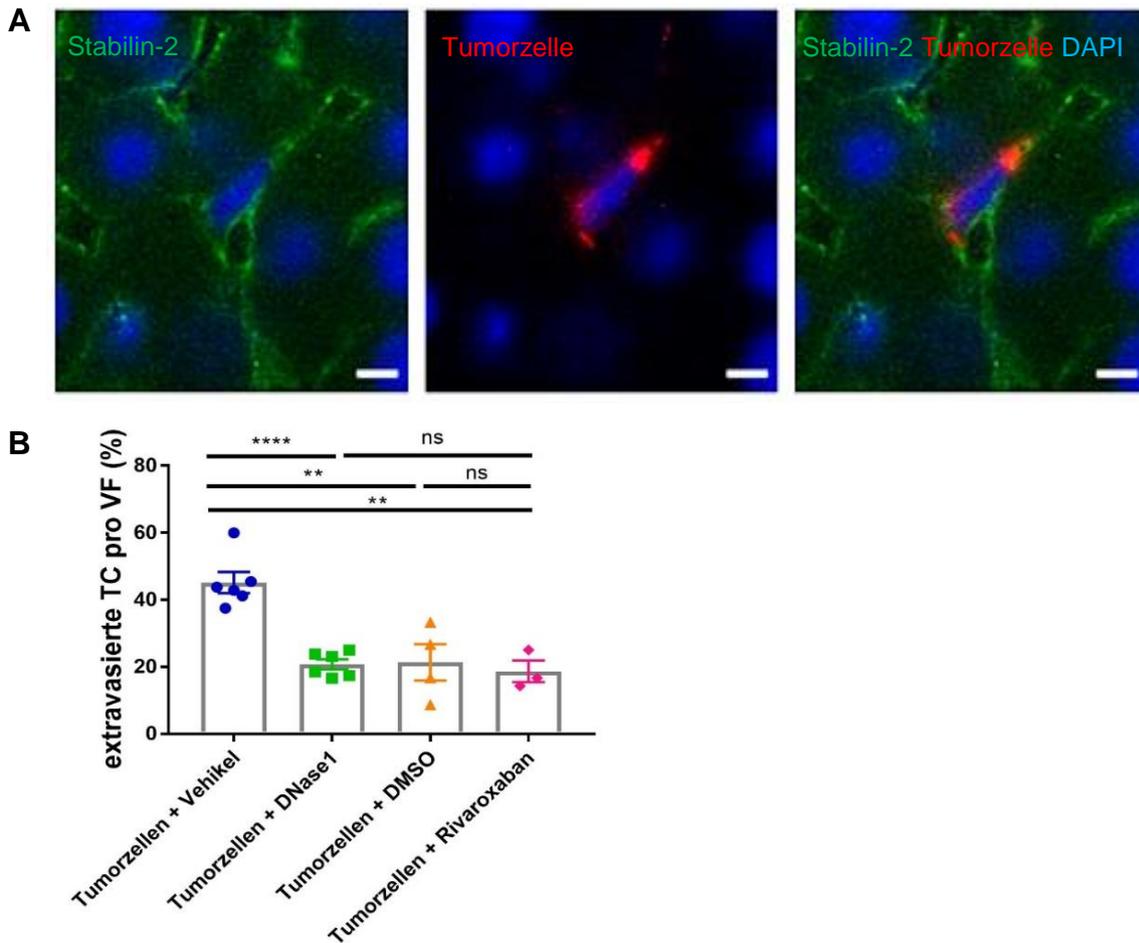


Abbildung 16

Extravaskulär angesiedelte Karzinomzellen

(A) Repräsentative Darstellung einer extravasierten, perivaskulär angesiedelten Tumorzelle 9 Std. nach Tumorzellinjektion in einer Wildtyp Maus. Alexa Fluor 488 (Stablin-2); CMTPIX (Tumorzelle). Maßstabsbalken 5µm.

(B) Quantifizierung des prozentualen Anteils extravasierter Tumorzellen an der Gesamtzahl detektierter Tumorzellen mittels konfokaler Mikroskopie. Untersucht und verglichen wurden Kontrollmäuse (blau) mit Mäusen, welche zusätzlich DNase1 (grün), DMSO (orange) oder Rivaroxaban (pink) erhalten hatten. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. ** p<0,01; **** p<0,0001. 100%= Gesamtzahl an detektierten Tumorzellen

Es wird deutlich, dass bei Injektion von DNase die Zahl der Extravasation der Karzinomzellen sinkt, bei Rivaroxaban lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit DMSO feststellen (Abbildung 16B).

4.5 Immobilisierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems und deren Interaktion mit Pankreaskarzinomzellen in vivo

4.5.1 Klassische und nicht-klassische Monozyten

2 Std. nach i.v. Injektion von Karzinomzellen waren in der Mikrozirkulation der Leber arretrierte Immunzellen nachweisbar. Zunächst testeten wir die Rekrutierung der Gesamt-Leukozyten zu zwei Zeitpunkten in Wildtyp- sowie in Faktor XII^{-/-}-Mäusen. Hierfür verwendeten wir den Pan-Leukozyten-Marker α -CD45, den wir mit einem entsprechenden sekundären Antikörper mittels konfokaler Mikroskopie visualisierten. Dabei war nicht nur die Entwicklung der Immunzellrekrutierung, sondern auch die Rolle der tumorinduzierten Fibrinbildung während dieses Vorganges von Interesse.

Es zeigte sich, dass im Wildtyp nach 6 Std. signifikant mehr Immunzellen rekrutiert wurden, als dies nach 2 Std. der Fall war. In Faktor XII^{-/-}-Mäusen schien dies nicht der Fall zu sein, da kein signifikanter Unterschied zwischen 2 und 6 Std. erkennbar war (Abbildung 17).

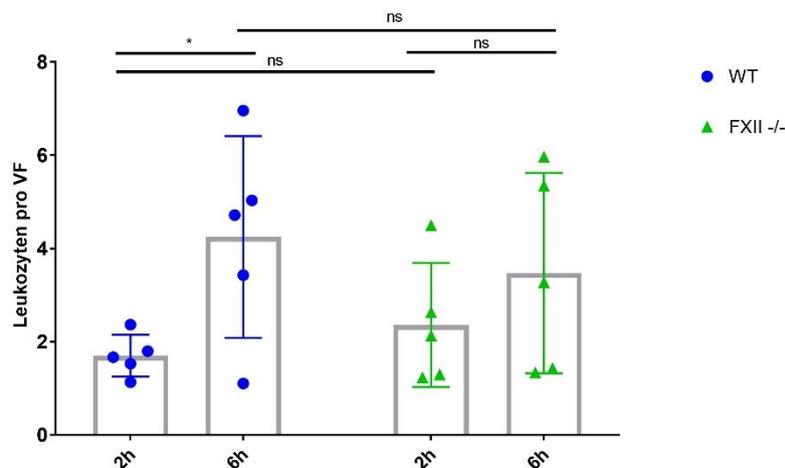


Abbildung 17

Rekrutierung von Leukozyten nach Karzinomzellinjektion

Quantifizierung der CD45⁺ Immunzellen in Wildtyp (blaue Symbole) und Faktor XII^{-/-}-Mäusen (grüne Symbole) zu einem Zeitpunkt von 2 sowie 6 Std. nach Karzinomzellinjektion. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$.

Daraufhin charakterisierten wir die Spezifität der rekrutierten Immunzellen. Dabei begannen wir mit den klassischen und nicht-klassischen Monozyten. Zur Unterscheidung der beiden Monozytengruppen wurde ein α -Ly6C-Antikörper zusammen mit einem α -CX3CR1-Antikörper verwendet. Patrouillierende (nicht-klassische) Monozyten wurden als Ly6C^{low} CX3CR1^{high} identifiziert, die klassischen (inflammatorischen) Monozyten als Ly6C^{high} CX3CR1^{low}.

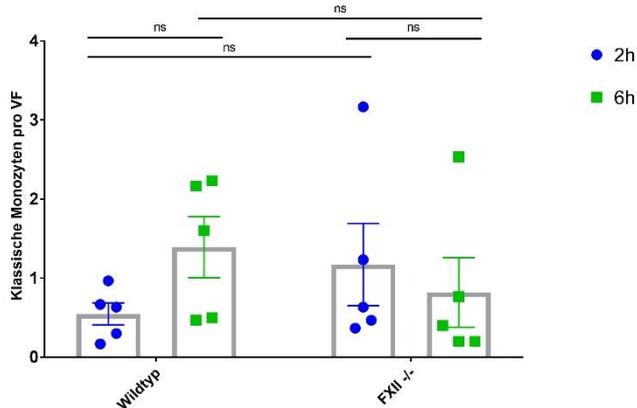


Abbildung 18

Rekrutierung klassischer Monozyten

Quantifizierung klassischer Monozyten in der Leber von Wildtyp (links) sowie Faktor XII^{-/-}-Mäusen (rechts) 2 bzw. 6 Std. nach Tumorzellinjektion. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. * p<0,05

Während die klassischen Monozyten bereits 2 Std. nach Injektion am Ort des Geschehens anwesend waren, ihre Rekrutierung mit der Zeit jedoch nicht weiter anstieg (Abbildung 18), waren die nicht-klassischen Monozyten zu demselben Zeitpunkt kaum nachweisbar (Abbildung 19).

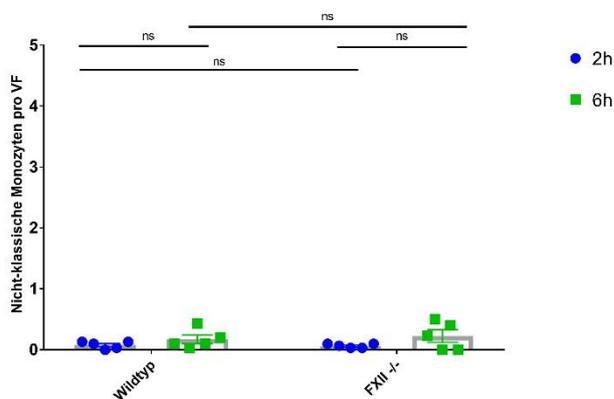


Abbildung 19

Immunzellrekrutierung nicht-klassischer Monozyten

Quantifizierung nicht-klassischer Monozyten in der Leber nach 2 sowie 6 Std. in Wildtyp- (links) bzw. Faktor XII^{-/-}-Mäusen (rechts). Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM.

Auch nach 6 Std. zeigte sich eine äußerst limitierte Rekrutierung (Abbildung 19). Die Rekrutierung der nicht-klassischen Monozyten war in den Faktor XII^{-/-}-Mäusen gegenüber der Kontrolle unverändert.

Um die Rolle der patrouillierenden Monozyten bezüglich der Metastasierung besser nachvollziehen zu können, wurden intravitale Analysen in einer Maus durchgeführt, in der die CX3CR1⁺ Zellen mit GFP markiert waren. 9 Std. nach Injektion der KPC-Pankreaskarzinomzellen wurde neben den Immunzellen und den Tumorzellen auch der Blutfluss mit intravenös verabreichtes Dextran Blau visualisiert (Abbildung 20).

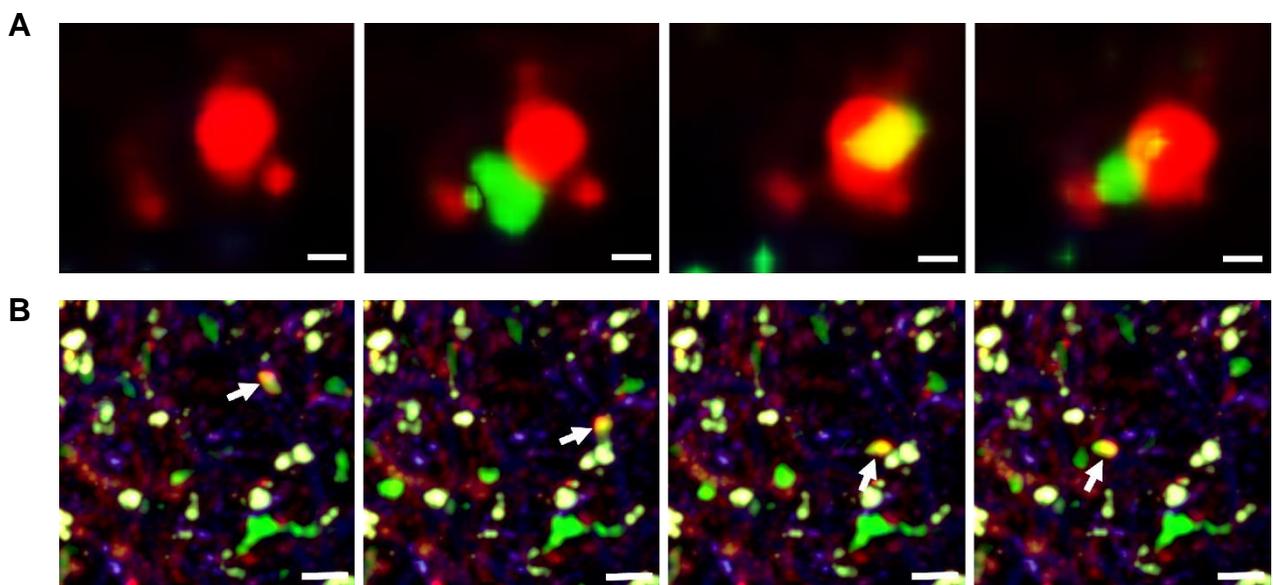


Abbildung 20

Intravital aufgezeichnete Interaktionen nicht-klassischer Monozyten mit Tumorzellen

Die intravitale Aufnahmen wurden 9 Std. nach Injektion der Karzinomzellen in eine CX3CR1-GFP Maus aufgezeichnet. Die Tumorzellen wurden mithilfe des Zellmarkers CMTPX markiert. Zur Darstellung des Blutstroms wurde der Maus Dextran Blau intravenös verabreicht.

(A) Interaktion der Immunzelle (grün) mit einer arretierten Tumorzelle (rot). Maßstabsbalken 5µm.

(B) Zirkulierende Immunzelle (grün, markiert durch einen weißen Pfeil) mit inkorporiertem Tumormaterial (rot). Maßstabsbalken 10µm.

Im Video ist deutlich die Interaktion der patrouillierenden Monozyten (grün) mit den Tumorzellen (rot) zu erkennen (Abbildung 20A). Die Monozyten scheinen Tumormaterial aufzunehmen und abzutransportieren (Abbildung 20B).

4.5.2 Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in der frühen Phase der Metastasierung

Mittels intravital registrierter Videos, die an LysM-GFP Mäusen durchgeführt wurden, zeigte sich 9 Std. nach Tumorzellinjektion, dass vermehrt Neutrophile in die Leber rekrutiert wurden. Diese schienen jedoch im Gegensatz zu den patrouillierenden Monozyten kaum mit den Tumorzellen zu interagieren oder gar Tumormaterial aufzunehmen (Abbildung 21).

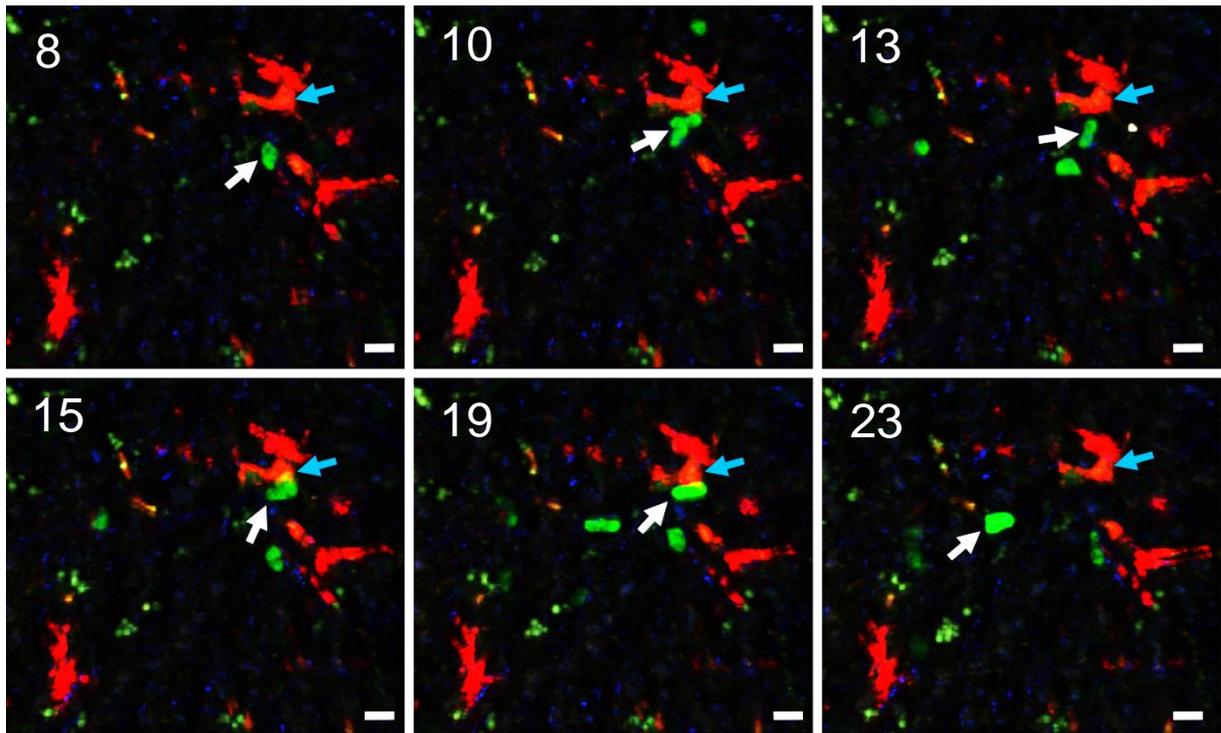


Abbildung 21

Interaktion eines Neutrophilen mit einer Tumorzelle in vivo

Die Bilder entstammen der Leber einer LysM-GFP Maus, der 9 Std. zuvor Pankreaskarzinomzellen injiziert wurden. Die Tumorzellen (rot) wurden mittels CMTPIX vor der Injektion markiert. Ein Neutrophiler (grün, markiert durch einen weißen Pfeil) nähert sich dem arretierten Tumorzellcluster und scheint mit einer der Zellen (blauer Pfeil) zu interagieren. Nach kurzer Dauer verlässt die Immunzelle jedoch den Ort des Geschehens ohne Tumormaterial aufgenommen zu haben. Die Tumorzelle zeigt keine morphologische oder positionelle Veränderung während des gesamten Vorganges. Andere Neutrophile zeigen keine Interaktionen mit den Tumorzellen. Zeitangabe (Min.) am linken oberen Bildrand. Maßstabsbalken 10µm.

Um mehr über die Rolle der Neutrophilen herauszufinden, v.a. bezüglich ihrer Aktivierung und der Bildung von NETs, wurden immunhistochemische Gewebefärbungen an der Leber von Kontrollmäusen bzw. Faktor XII^{-/-}-Mäusen bzw. mit DNase1 oder Rivaroxaban vorbehandelten Versuchstieren durchgeführt. Hierbei verwendeten wir einen α-Ly6C- und einen α-Ly6G-Antikörper, um die Neutrophilen von den Monozyten differenzieren zu können.

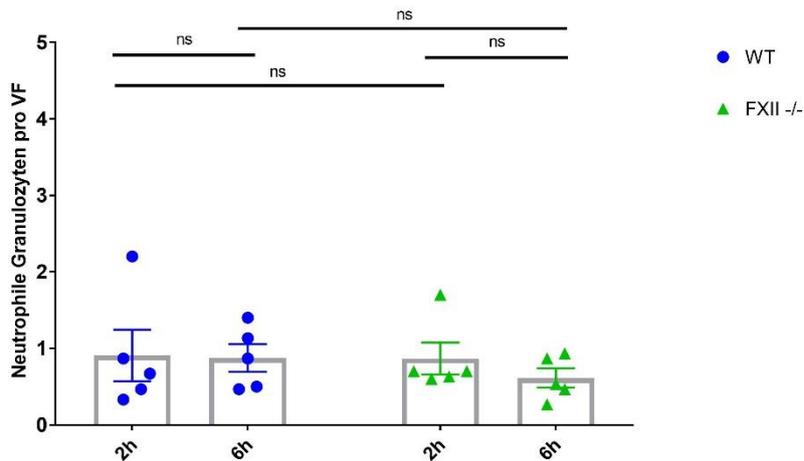


Abbildung 22

Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten

Quantitative Auswertung der Rekrutierung von Neutrophilen 2 und 6 Std. nach Tumorzellinjektion. Wildtyp Mäuse (blaue Symbole) vs. FXII^{-/-}-Mäuse (grüne Symbole). Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM.

Es zeigt sich, dass die Neutrophilen bereits nach 2 Std. in der Mikrovaskularisation immobilisiert wurden (Abbildung 22). Dabei ist die Zahl der rekrutierten Neutrophilen in FXII^{-/-}-Mäusen identisch zu den Kontrollmäusen und bleibt konstant bis zu dem Zeitpunkt von 6 Std.

4.6 Tumorinduzierte Bildung von NETs

Nachdem wir mittels zweier verschiedener in-vivo-Methoden die Rekrutierung von Neutrophilen nachweisen konnten, wollten wir als Nächstes analysieren, inwieweit die rekrutierten Neutrophilen die Bildung von NETs vermitteln. Um die NETs nachzuweisen, wurden die Leberschnitte von Mäusen 6 bzw. 9 Std. nach der Injektion angefärbt. Hierfür verwendeten wir gegen Myeloperoxidase und gegen das zitrullinierte Histon H3 gerichtete Antikörper in Kombination mit DAPI, um die Anwesenheit extrazellulärer DNS nachzuweisen. Als NETs werden diejenigen Strukturen bezeichnet, die eine Kolo-kalisation der 3 genannten Antikörper aufwiesen (Abbildung 23A).

9 Std. nach Injektion der Tumorzellen kam es zu einer deutlichen Bildung von NETs (Abbildung 23B). Bei Mäusen, die 30 Min. vor der Tumorzellinjektion DNase1 intravasal und peritoneal injiziert bekommen hatten, waren keine NETs nachweisbar.

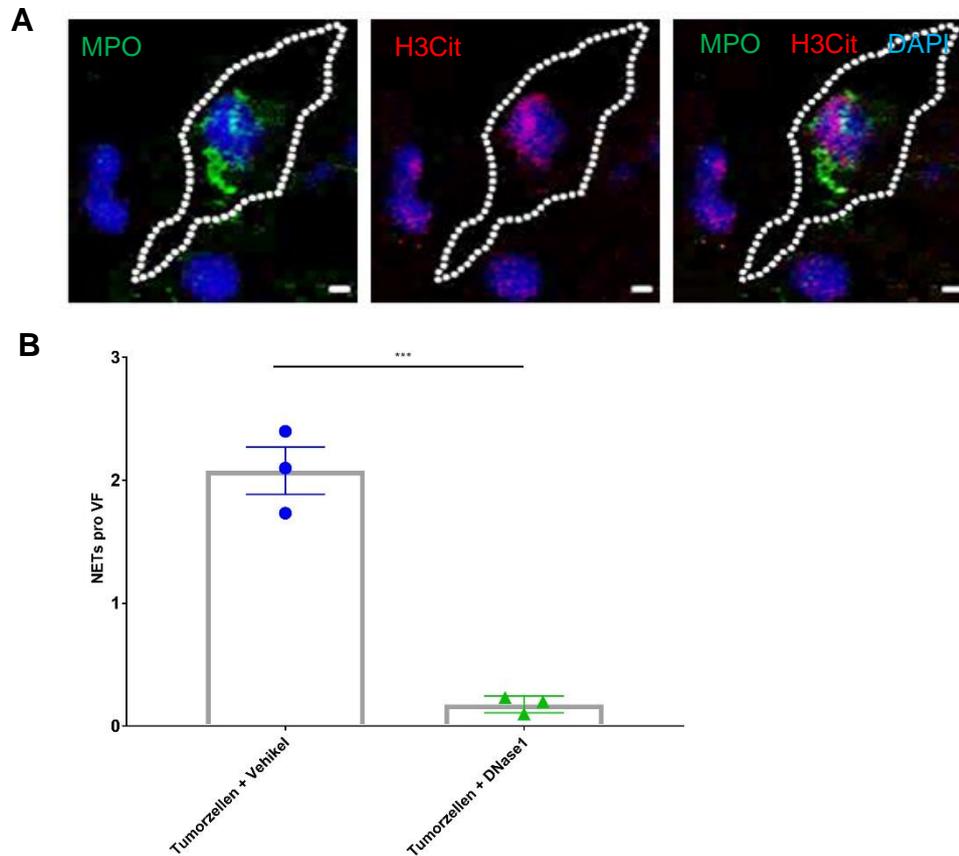


Abbildung 23

Entstehung von NETs in tumortragenden Mäusen

- (A) Repräsentative Darstellung eines NET in der Mikro-zirkulation der Leber. Die gestrichelte Linie stellt den Endothelverlauf dar. Die Co-Lokalisation von MPO, zitru-lliniertem H3 sowie DNS innerhalb des Gefäßlumens steht für die Entstehung eines NET. Alexa Fluor 488 (MPO), Alexa Fluor 546 (H3Cit). Maßstabsbalken 2µm.
- (B) Quantitative Auswertung von NETs in der Mikro-zirkulation der Leber 9 Std. nach Injektion der Tumorzellen in Kontrollmäusen (blaue Symbole) und nach Behandlung mit DNase1 (grüne Symbole). Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. *** p<0,001.

4.7 Gefäßokklusion und Hypoxie

Um den Mechanismus der Tumorzellextavasation besser zu verstehen, analysierten wir, ob es durch die Tumorzelle zur Entstehung eines hypoxischen Areals kommt, in Folge dessen eine erhöhte Permeabilität der Mikrogefäße der Leber induziert wird. Zum Nachweis der Hypoxie verwendeten wir zwei sich ergänzende Methoden: α-Pimonidazol- und α-HIF1α-Antikörper. Wir verabreichten den Versuchstieren Pimonidazol 30 Min. vor der Tumorzellinjektion intravenös sowie intraperitoneal.

Mittels eines biotingebundenen Antikörpers gegen Pimonidazol und des entsprechenden sekundären Antikörpers α -Biotin-FITC sollte das gebundene Areal anschließend unter einem Konfokalmikroskop dargestellt werden. HIF1 α wurde auf direktem Weg mithilfe eines Antikörpers und dem entsprechenden sekundären Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Entgegen unserer Hypothese konnten wir kein hypoxisches Areal mithilfe des Pimonidazols detektieren (Bilder nicht gezeigt).

Die Messung der Intensität des HIF1 α -Antikörpers hingegen zeigte, dass es im Vergleich zu den mit PBS behandelten Tieren zu einem deutlichen Anstieg von HIF1 α kommt, sobald Tumorzellen injiziert wurden (Abbildung 24). Dieser Anstieg konnte durch die Behandlung mit DNase1 herabgesetzt werden, während die Injektion von Rivaroxaban keinen signifikanten Einfluss auf die HIF1 α -Expression im Gewebe zu haben schien (Abbildung 24).

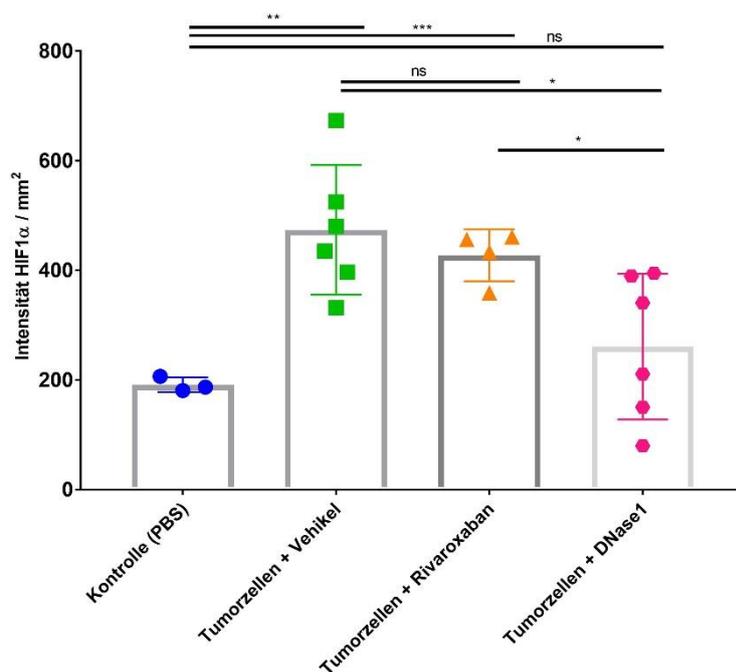


Abbildung 24

HIF1 α -Expression nach Tumorzellinjektion

Quantitative Auswertung der Intensität von HIF1 α pro mm² in Mäuselebern. Untersucht, analysiert und verglichen wurden hierbei eine Kontrollgruppe, in die lediglich PBS injiziert wurde (blaue Symbole), mit Tumorzellen behandelte Mäuse (grüne Symbole) sowie Mäuse, welche zusätzlich zu den Tumorzellen mit Rivaroxaban (orange Symbole) bzw. DNase1 (pinke Symbole) behandelt wurden. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Sowohl Fibrin als auch NETs können Gefäßokklusionen bewirken. Um potentielle Gefäßokklusionen nachzuweisen, wurden HE-Färbungen der Mäuselebern

durchgeführt. Hierfür verwendeten wir als Kontrollgruppe Mäuse, welchen lediglich das Vehikel PBS injiziert wurde. Außerdem untersuchten wir mit Tumorzellen injizierte Mäuse, denen zusätzlich Rivaroxaban bzw. DNase1 zugesetzt wurde. Aufgrund der Eosinophilie des Fibrins, welches in der HE-Färbung rot erscheint, lässt es sich deutlich von den basophilen, bläulich erscheinenden NETs differenzieren. Bei der mikroskopischen Untersuchung der HE-Färbung ging hervor, dass es zu Gefäßokklusionen kam, sobald KPC-Zellen in die Mäuse injiziert wurden, während in den mit Rivaroxaban bzw. DNase1 behandelten Tieren ein geringeres Ausmaß an Gefäßverschlüssen erkennbar war (Abbildung 25A-D).

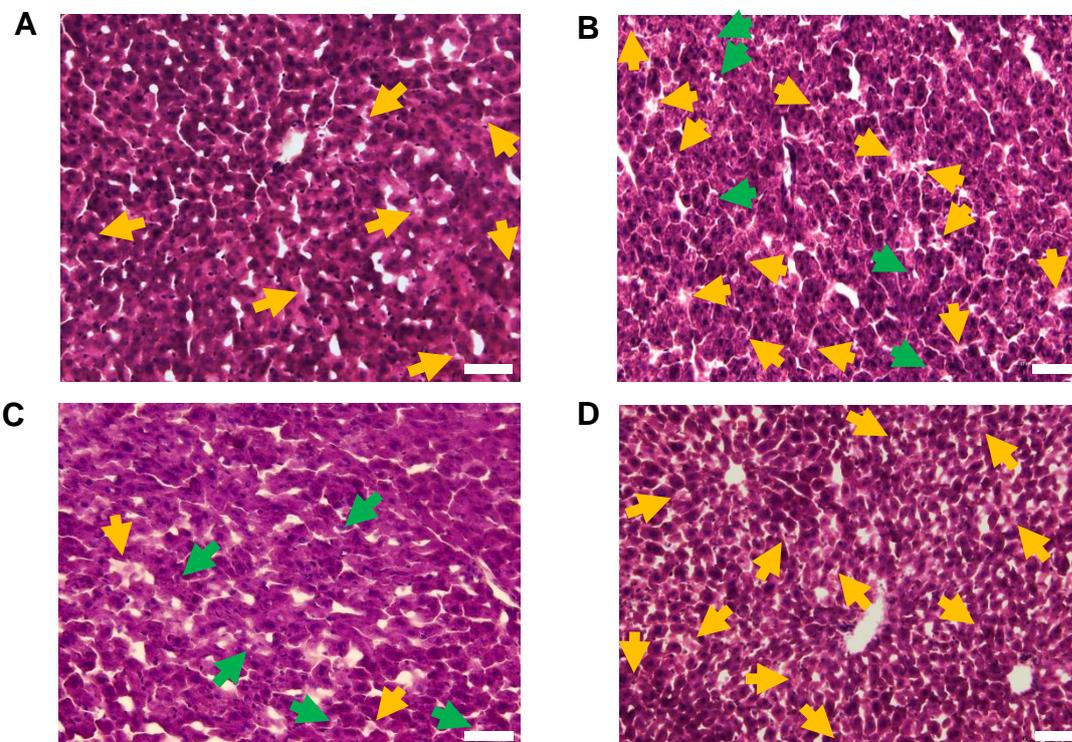


Abbildung 25

HE-Färbung der Leber von Mäusen der verschiedenen Versuchsgruppen

Repräsentative Darstellung der Gefäßokklusion in Mäuselebern mittels HE-Färbung. Gefäße, deren Lumen zu mindestens 70% verschlossen sind, sind durch Pfeile hervorgehoben. Gelber Pfeil: Fibrin; grüner Pfeil: NETs. Maßstabsbalken 50µm.

- (A) Kontrollgruppe PBS-Injektion
- (B) 9h Tumorzellen
- (C) 9h Tumorzellen mit Rivaroxaban
- (D) 9h Tumorzellen mit DNase1

4.9 Angiopoietin1- und Angiopoietin2-Expressionen und mikrovaskulärer Tumorzellarrest

4.9.1 Expression von Angiopoietin2 in den Wirtszellen diverser Tiermodelle

Aufgrund der Bedeutung von Angiopoietin1 (Ang1) und Angiopoietin2 (Ang2) für die Permeabilisierung des mikrovaskulären Endothels (vgl. Kapitel 1.2.4.4) untersuchten wir als Nächstes die Expression beider Proteine in der Leber von mit Pankreaskarzinomzellen supplementierten Mäusen.

Zunächst untersuchten wir die Expression von Ang2 in Mäusen, denen wir ausschließlich Karzinomzellen verabreicht hatten, und verglichen diese mit der Kontrollgruppe, welcher lediglich PBS injiziert worden war.

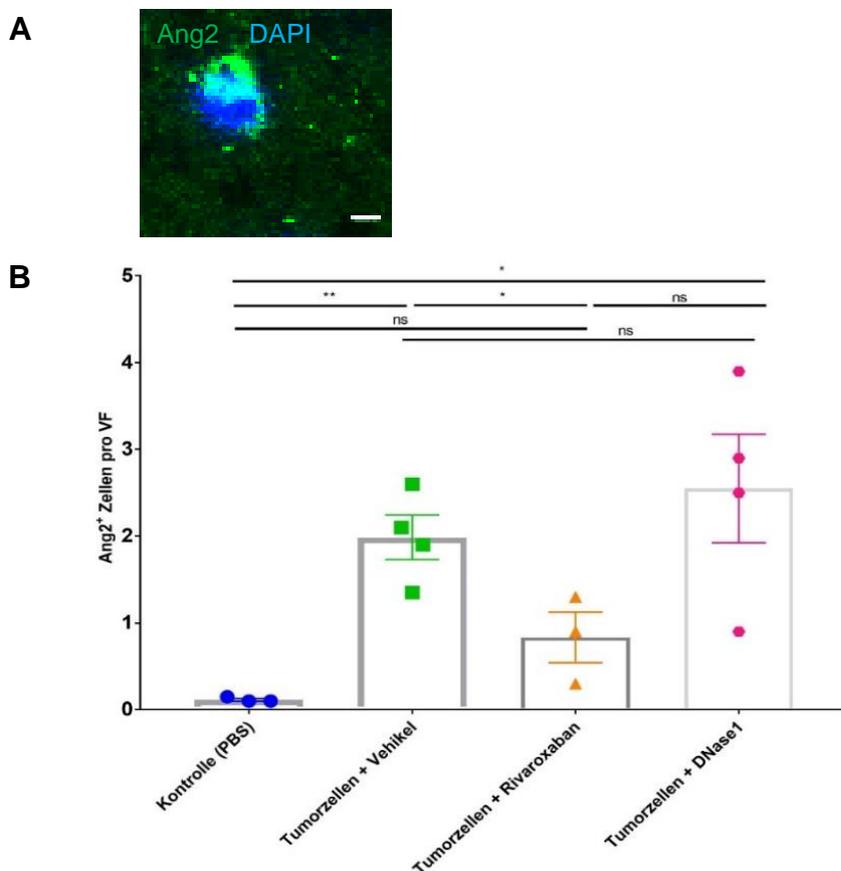


Abbildung 26

Ang2-Expression in Wirtszellen von mit Karzinomzellen supplementierten Mäusen

(A) Repräsentative Darstellung einer Ang2-exprimierenden Wirtszelle in der Leber einer tumorinjizierten Maus. Maßstabsbalken 2µm. Alexa Fluor 488 (Ang2).

(B) Quantifizierung Ang2-exprimierender Wirtszellen in Mäuse 9h nach Tumorzellinjektion. Die zu untersuchenden Tiere wurden unterteilt in PBS-behandelte Tiere (blaue Symbole) bzw. mit Tumorzellen supplementierte Tiere, denen entweder Vehikel (grün), Rivaroxaban (orange) oder DNase1 (pink) zusätzlich verabreicht wurde. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. * p<0,05; ** p<0,01.

Hierbei wurden die Gefrierschnitte der Mäuseleber mittels eines α -Ang2-Antikörpers immunhistochemisch angefärbt und anschließend unter dem konfokalen Mikroskop analysiert und quantifiziert (Abbildung 26).

Aufgrund der deutlich erhöhten Ang2-Expression in den Wirtszellen bei Anwesenheit der Karzinomzellen (Abbildung 26B), weiteten wir das Experiment aus, indem wir nun auch Mäuse untersuchten, welchen neben den Tumorzellen Rivaroxaban bzw. DNase injiziert wurde. In den tumorzellsupplementierten Tieren, welche zusätzlich mit Rivaroxaban behandelt worden waren, war die Zahl der Wirtszellen mit Ang2-Positivität vermindert. Die Zahl der Ang2-exprimierenden Wirtszellen war nach DNase1-Behandlung unverändert (Abbildung 26B).

4.9.2 Differenzierung der Ang2⁺-Wirtszellen

Um bezüglich der Ang2-exprimierenden Wirtszellen zwischen Endothelzellen und intravaskulären Nichttumorzellen zu unterscheiden, wurden die Gefäße mit einem α -Stabilin-2-Antikörper angefärbt.

Erneut verwendeten wir Mäuse, denen 9 Std. zuvor Karzinomzellen injiziert worden waren, sowie Mäuse, welche zusätzlich Rivaroxaban oder DNase1 injiziert bekommen hatten. In allen drei Versuchsgruppen waren Ang2-exprimierende Endothelzellen wie auch intravaskuläre Zellen mit einer Ang2-Positivität nachweisbar (Abbildung 27). Die Ang2-Expression schien sich dabei gleichmäßig auf beide Zellgruppierungen zu verteilen. Lediglich diejenigen Mäuse, in welche nur Tumorzellen injiziert wurden, wiesen tendenziell eine erhöhte Zahl an intravaskulären Ang2-exprimierenden Zellen verglichen mit den Ang2-positiver Endothelzellen auf (Abbildung 27C).

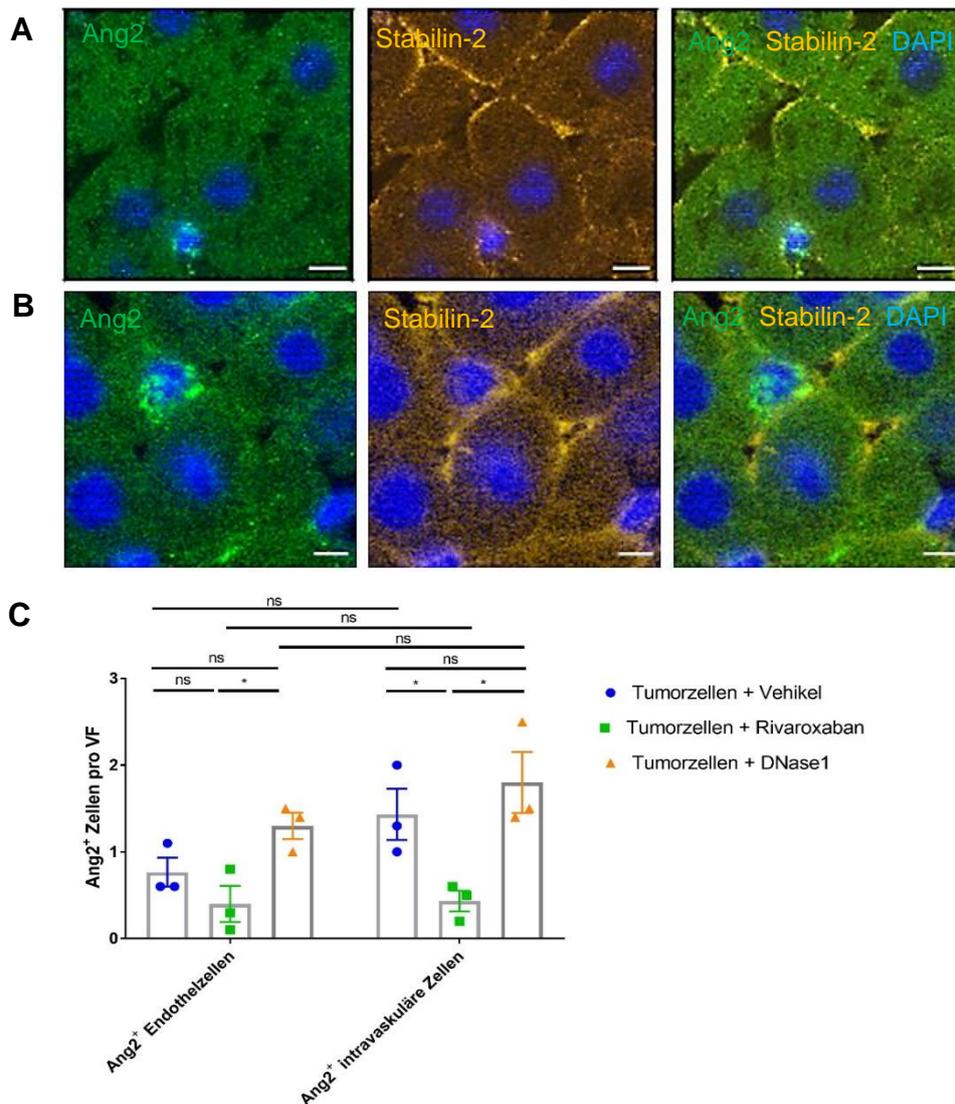


Abbildung 27

Angiopoietin2-Expression in Endothel- bzw. intravaskulären Wirtszellen

- (A) Repräsentative Darstellung einer intravasal angesiedelten Ang2⁺-Zelle. Die Zelle ist umsäumt von Stabilin-2⁺-Endothelzellen und somit als intravaskulär einzuordnen. Alexa Fluor 488 (Ang2); Alexa Fluor 546 (Stabilin-2). Maßstabsbalken 5µm.
- (B) Repräsentative Darstellung einer Ang2-exprimierenden Endothelzelle. Alexa Fluor 488 (Ang2); Alexa Fluor 546 (Stabilin-2). Maßstabsbalken 5µm.
- (C) Zahl Ang2-exprimierender Endothelzellen (links) sowie intravaskulärer Wirtszellen (rechts). Untersucht wurden Mäuse, denen entweder Tumorzellen alleine (blaue Symbole) oder zusätzlich Rivaroxaban (grüne Symbole) bzw. DNase1 (orange Symbole) appliziert wurden. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. * p<0,05.

Infolgedessen gingen wir einen Schritt weiter und versuchten herauszufinden, um welchen Zelltypen es sich bei den intravaskulären Ang2-exprimierenden Zellen handelte. Aufgrund der Zellkernmorphologie war zu vermuten, dass es sich um Neutrophile Granulozyten handelte. Deshalb wurden die Gefrierschnitte auch mittels α -Ly6G gefärbten.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich wird, zeigte sich, dass in der Tat ein Teil der Ang2-exprimierenden Zellen Ly6G-positiv war.

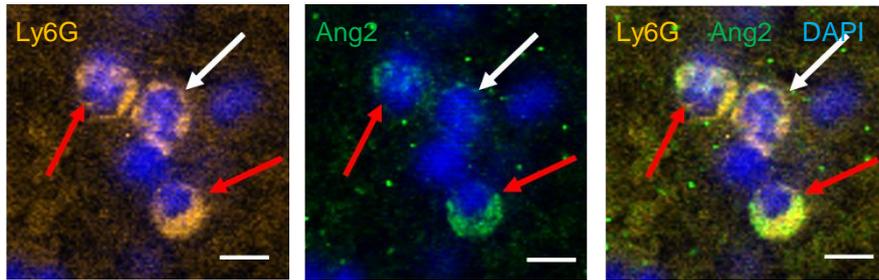


Abbildung 28

Ang2- und Ly6G-Positivität intravaskulärer Immunzellen

Repräsentative Darstellung intravaskulärer Immunzellen in einer tumorzellensupplementierten Maus 9h nach Karzinomzellinjektion. Die roten Pfeile markieren Immunzellen, welche sowohl Ly6G als auch Ang2 exprimieren, während der weiße Pfeil eine Ly6G⁺ Immunzelle ohne Ang2-Expression hervorhebt.

Alexa Fluor 488 (Angiopoietin2); Alexa Fluor 546 (Ly6G). Maßstabsbalken 10µm.

4.9.3 Ang1-Expression in Mäusen in Wirtszellen nach Tumorzellinjektion

Als nächstes untersuchten wir die Expression Ang1-positiver nukleärer Wirtszellen in der Mikrozirkulation der Leber mittels eines α -Ang1-Antikörpers (Abbildung 29A).

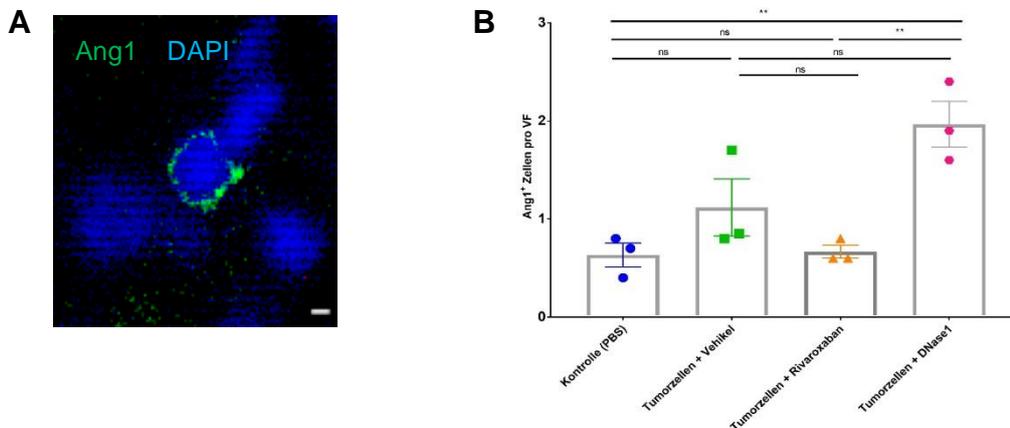


Abbildung 29

Angiopoietin1-Expression in Wirtszellen von mit Tumorzellen supplementierten Mäusen

(A) Repräsentative Darstellung einer Ang1-positiven Zelle in der Leber einer tumorinjizierten Maus. Alexa Fluor 488 (Ang1). Maßstabsbalken 2µm.

(B) Quantifizierung Ang1-positiver Zellen in PBS-behandelten Tieren (blaue Symbole) und in mit Tumorzellen supplementierten Mäusen (grüne Symbole) sowie mit Tumorzellen supplementierten Mäusen, welche zusätzlich Rivaroxaban (orange) oder DNase1 (pink) erhalten hatten. Die Symbole repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mäuse. Mittelwerte +/- SEM. ** p<0,01.

Während Rivaroxaban die Zahl Ang1-positiver Zellen tendenziell vermindert, förderte eine Behandlung mit DNase1 die Zahl von Zellen, die eine Ang1-Assoziation aufweisen (Abbildung 29B). Mittels des tumorspezifischen Markers konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Ang1-positiven Zellen um Tumorzellen handelte (nicht gezeigt).

5 Diskussion

Kaum ein Karzinomtyp zeigt sich derart prognostisch letal und aggressiv im Verlauf wie das Pankreaskarzinom. Dies ist vorwiegend auf die frühe und massive Metastasierungstendenz des Pankreaskarzinoms zurückzuführen.^{2,4,11} Um Hinweise auf Auswege aus diesem erschütternden Fazit zu finden, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit die vaskuläre Phase der Metastasierung des Pankreaskarzinoms, in der therapeutische Interventionen die Metastasierung prinzipiell unterdrücken können. In verschiedenen methodischen Szenarien wurde die KPC-Zelllinie eingesetzt, da diese die zentralen Genmutationen aufweist, die in der Regel auch im menschlichen Pankreaskarzinom anzutreffen sind.¹⁰⁹ Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit, welche überwiegend auf in-vivo-Experimenten an Mäusen beruhen, zu einem erheblichen Teil auf das humane Pankreaskarzinom übertragbar sind.

Die in-vivo-Experimente sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit die Koagulation die Extravasation von Pankreaskarzinomzellen in der Leber beeinflusst. Zunächst führten wir hierfür Experimente an Wildtyp Mäusen und Faktor XII^{-/-}-Mäusen durch, deren Organe 6 Std. nach der Tumorzellinjektion entnommen und immunhistochemisch untersucht wurden. Aus vorhergehenden Arbeiten unserer Forschungsgruppe ließ sich ableiten, dass die durch Tumorzellen initiierte Fibrinbildung über den extrinsischen Pfad der Koagulationskaskade und nicht über das Kontaktaktivierungssystem vermittelt wird. Somit können wir bei der Untersuchung der Faktor XII^{-/-}-Mäuse von einer Ausschaltung der wirtsinduzierten Gerinnungsaktivierung ausgehen und infolgedessen die Auswirkungen sowohl der wirts- als auch der tumorinduzierten Fibrinbildung differenziert studieren. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass es in den Faktor XII^{-/-}-Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe zu keiner signifikant erhöhten Extravasation kommt. Auch in der Gesamtzahl an detektierten Karzinomzellen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Tumorzellen innerhalb der Gefäße weder Protektion noch Auslieferung gegenüber ankommenden Immunzellen erfahren.

Die Erkenntnisse, die wir aus den vorgenommenen Versuchen gezogen haben, lassen sich zudem durch die Ergebnisse der Immunzellrekrutierung in den beiden Versuchsgruppen unterstreichen. Aus der Analyse der in der Mikrovaskularisation

adhärierten Immunzellen 2 bzw. 6 Std. nach der Karzinomzellinjektion in der mit Pankreaskarzinomzellen supplementierten Kontrollgruppe lässt sich schlussfolgern, dass die klassischen Monozyten bereits zu einem früheren Zeitpunkt in die Mikrozirkulation rekrutiert werden, während die nicht-klassischen Monozyten wohl erst später immobilisiert werden. Die Anzahl der rekrutierten Monozyten in Faktor XII^{-/-}-Tieren unterscheidet sich dabei nicht von der Kontrollgruppe.

Klassische Monozyten können prometastatisch wirken, wohingegen nicht-klassische Monozyten antimetastatische Effekte haben können.⁴⁷ Mittels intravitaler Aufnahmen konnten wir nachweisen, dass die nicht-klassischen Monozyten Tumormaterial in sich aufnehmen und dieses abtransportieren.^{51,53} Inwiefern die Zellen das aufgenommene Tumormaterial weiterverarbeiten und inwiefern dadurch der Phänotyp dieser Immunzellen verändert wird, ist derzeit noch unklar. Im Zusammenhang mit Tumormetastasen in der Lunge wurde gezeigt, dass ein Teil der klassischen Monozyten, welche Tumormaterial aufgenommen haben, sich gemeinsam mit Karzinomzellen im Interstitium der Lunge ansiedeln und dass sich mit der Aufnahme des karzinogenen Materials der Phänotyp dieser Immunzellen verändern kann.²⁵

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Neutrophilen Granulozyten bereits früh in die Lebermikrozirkulation rekrutiert werden. Die intravitalen Aufnahmen der LysM-GFP Mäuse deuten darauf hin, dass durch die Anwesenheit der Karzinomzellen die Zahl der Neutrophilen Granulozyten im Verhältnis zu nicht mit Tumorzellen supplementierten Mäusen deutlich gesteigert wird. Die Neutrophilen interagieren vereinzelt mit den Tumorzellen. Allerdings nehmen sie im Gegensatz zu den nicht-klassischen Monozyten kein Tumormaterial in sich auf. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage, mittels NETs Pathogene einzufangen bzw. zu eliminieren. Auch in Anwesenheit von Tumorzellen kommt es zur Bildung von NETs.^{68,110,111} Mithilfe immunhistochemischer Färbungen konnten wir die Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten sowie die Anwesenheit von NETs in der Mikrozirkulation von mit Tumorzellen supplementierten Mäusen nachweisen. Die Injektion von DNase1 führte zu einer Unterbindung der NETs-Bildung in den Mäusen. Hierdurch stellt sich die Frage, inwiefern Fibrin bzw. NETs an der Extravasation der Karzinomzellen beteiligt sind. Zur Beantwortung dieser Frage reduzierten wir mittels Rivaroxaban die Fibrinbildung und hemmten in einer weiteren Versuchsgruppe die NETs-Generierung mit Hilfe von DNase1. Wir konnten zunächst feststellen, dass der Arrest der

Karzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber nach DNase1 gesteigert ist, während die Behandlung mit Rivaroxaban keinen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrollgruppe bezüglich des Tumorzellarrests erkennen ließ. Die Analyse der extravasierten Karzinomzellen zeigte eine Abnahme der Karzinomzellextravasation nach Behandlung mit DNase1. Rivaroxaban hingegen zeigte wiederum keinen signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrollgruppe bezüglich der Extravasation. Fibrin scheint somit im Rahmen der Extravasation von Pankreaskarzinomzellen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Im Gegensatz zu den mit Rivaroxaban behandelten Mäusen, in denen die Gesamtzahl arretierter Tumorzellen unverändert war, war in den mit DNase1 behandelten Tieren eine erhöhte Zahl an Tumorzellen detektierbar. Dabei schien sich vor allem die Zahl der singular vorliegenden Karzinomzellen zu erhöhen, während keine Differenz in der Zahl der Tumorzellcluster sowie der Zellen pro Cluster festzustellen war. NETs könnten somit das Überleben singularer Karzinomzellen in der Mikrozirkulation der Leber reduzieren. Als Ursache hierfür ist denkbar, dass die NETs selbst, vergleichbar mit den Mechanismen zur Elimination von Pathogenen, die Tumorzellen einfangen^{112,113}, und die lokal erhöhte Anwesenheit von NETs-assoziierten Proteinase oder toxisch wirksamen Histonen die Tumorzellen eliminiert¹¹⁴. Dass die Zahl der in der Blutbahn zirkulierenden Histone während der Metastasierung erhöht ist und diese zudem zytotoxisch wirken, konnte bereits gezeigt werden.^{115,116} Eine andere Hypothese wäre, dass es den rekrutierten Immunzellen, wie beispielsweise den NK-Zellen, mittels NETs erleichtert wird, die Tumorzellen zu attackieren. Die Tatsache, dass überwiegend individuelle Karzinomzellen von diesem Phänomen betroffen sind, lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich die Tumorzellen mittels Clusterbildung vor den NETs zu schützen versuchen. Dass die Clusterbildung eine protektive, prometastatische Funktion hat, ist bereits aus Beobachtungen zirkulierender Tumorzellen bekannt.^{18,22,117} Um diese Hypothesen weiter zu verfolgen, müssen in-vitro-Versuche zur Co-Inkubation von NETs und Tumorzellen, eventuell auch im Zusammenspiel mit weiteren Immunzellen, etabliert und durchgeführt werden.

Die zirkulierenden Tumorzellen arretierten in den Mikrogefäßen der Leber, und aufgrund der prokoagulatorischen Eigenschaften der Tumorzelle wurde die Gerinnungskaskade lokal aktiviert und damit die Fibrinbildung induziert.^{78,81} Gleichzeitig wurden die in die Leber rekrutierten Neutrophilen Granulozyten durch die

Anwesenheit der Karzinomzelle aktiviert und begannen NETs zu generieren.¹¹⁸ Dieser Prozess schien jedoch langsamer abzulaufen als die Fibrinbildung, welche 6 Std. nach der Injektion der Karzinomzellen maximal war und anschließend langsam abfiel. 9 Std. nach Tumorzellinjektion waren sowohl Fibrin als auch NETs nachweislich in den Gefäßen der metastatischen Leber anzutreffen. Die Anwesenheit von NETs, Fibrin und der arretierten Tumorzelle könnte zu einem Verschluss des Gefäßes und damit zu einer Unterbindung der Blutversorgung im Nachstromgebiet führen. Dies wiederum würde die Ausbildung eines hypoxischen Areals bedeuten, welches bekannterweise zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führt¹¹⁹, und somit die Extravasation von Tumorzellen innerhalb des hypoxischen Areals fördern.

Um diese Hypothese zu testen, führten wir Versuche mit Pimonidazol und ergänzend auch mit einem α -HIF1 α -Antikörper durch. Beide Reagenzien dienen der Detektion hypoxischen Gewebes.^{88,120} HIF1 α jedoch ist nicht einzig ein Zeichen für eine vorherrschende Hypoxie im Gewebe, sondern kann auch in einem aktivierten oder veränderten Endothel exprimiert werden.^{121,122} Während wir – möglicherweise aufgrund methodischer Probleme – keine Pimonidazol-positiven Areale nachweisen konnten, ließen sich deutliche Unterschiede in der HIF1 α -Expression in den getesteten Tiergruppen feststellen. Dabei konnten wir beobachten, dass die Expression von HIF1 α in mit Tumorzellen vorbehandelten Mäusen, verglichen mit der Kontrollgruppe, deutlich erhöht war. Dies blieb nach Injektion von Rivaroxaban unverändert. Hingegen führte die Degradation der NETs durch DNase1 zu einer reduzierten HIF1 α -Expression der Endothelzellen. Somit kann gefolgert werden, dass NETs die HIF1 α -Expression der Endothelzellen und somit möglicherweise die Bildung hypoxischer Areale stärker beeinflusst als die Fibrinbildung.

Des Weiteren vermuteten wir, dass eine Erhöhung der Permeabilität infolge der Entstehung einer Hypoxie in der real time Registrierung zu erkennen sein müsste. Demnach sollte das intravasal injizierte FITC bzw. Dextran Blau aufgrund der geringen Molekülgröße in der Lage sein, das permeabilisierte Endothel zu durchdringen und in den extravasalen Raum überzutreten. Jedoch zeigte sich keine erhöhte Extravasation des injizierten FITC oder Dextran Blau. Somit konnten wir mit Hilfe der HIF1 α -Expression aufzeigen, dass es zu Veränderungen im Expressionsmuster des sinusoidalen Endothels kommt. HE-Färbungen der Gefrierschnitte der Mäuselebern zeigten darüber hinaus, dass es aufgrund der Tumorzellinjektion zu einem Anstieg der

okkludierten Gefäße kam. Diese konnten mittels Rivaroxaban oder DNase1-Behandlung reduziert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass es während der vaskulären Phase der Metastasierung zur Bildung von Mikrothromben kommt, die durch lokale Aktivierung der Koagulation bzw. der Entstehung von NETs zu erklären waren.

Um den Mechanismus der Tumorzell-Extravasation besser zu verstehen, konzentrierten wir uns als Nächstes auf die Expression von Ang1 und Ang2, welche die Extravasation von Zellen regulieren.⁹²⁻⁹⁴ Die Ergebnisse unserer in-vivo-Versuche zeigten, dass es zu einem starken Anstieg der Ang2-Assoziation mit Wirtszellen der Lebermikrozirkulation nach der Tumorzellinjektion kam. Dies ließ darauf schließen, dass die Anwesenheit der Karzinomzellen Expression von Ang2 fördert – eines Wachstumsfaktors, der die Permeabilität von Gefäßen steigern kann. Auch die Tumorzellen selbst scheinen einen Beitrag zur Ang2-Expression zu erbringen.^{123,124} Ein Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen zeigte, dass in den mit Rivaroxaban behandelten Tieren weniger Ang2 anzutreffen war als in den Vergleichsgruppen. Somit könnte die Fibrinbildung im Zuge der Metastasierung die Expression von Ang2 steigern und die Permeabilität der Gefäße verstärken. Interessanterweise war die Expression von Ang1, einem Gegenspieler von Ang2, unabhängig von der Tumorzellinjektion auf einem mehr oder weniger konstanten Level, während mit der Behandlung durch Rivaroxaban tendenziell eine verringerte Ang1-Expression einherging. Lediglich die Injektion von DNase1 bewirkte signifikante Veränderungen in der Ang1-Bildung. Nach Degradation der NETs wurde mehr Ang1 exprimiert, was eine verringerte Permeabilität der Gefäße bedingen könnte. Somit könnte die Anwesenheit von NETs die Ang1-Expression verringern und die Permeabilität der Gefäße gemeinsam mit Fibrin, welches eine erhöhte Ang2-Expression induziert, fördern. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass in der Tat eine Beziehung zwischen der NETs-Bildung und dem Angiotensin-System bestehen könnte.¹²⁵

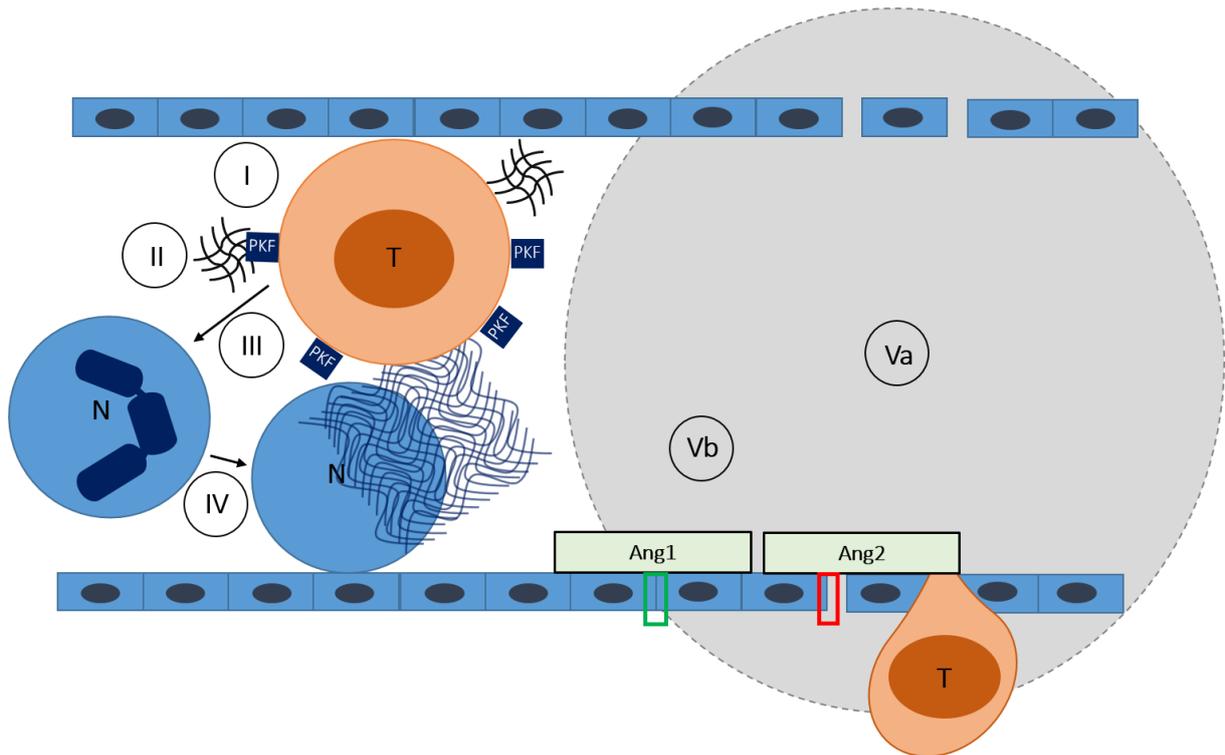


Abbildung 30

Potentieller Ablauf der Extravasation von Pankreaskarzinomzellen

- (I) Die zirkulierende Tumorzelle (T) arretiert in der Mikrozirkulation der Leber.
- (II) Prokoagulatorische Moleküle (PKF) der Tumorzellen (u.a. TF) fördern die Fibrinbildung.
- (III) Parallel zur Tumorzelladhäsion werden Immunzellen an den Ort des Geschehens rekrutiert. Hierzu gehören auch die Neutrophilen Granulozyten (N)
- (IV) Es kommt zu einer Aktivierung des Neutrophilen Granulozyten und infolgedessen zur Bildung von NETs.
- (V) Potentieller Mechanismus der Extravasation
 - a. Aufgrund des Gefäßverschlusses durch die arretierte Tumorzelle, der Fibrinbildung sowie der Entstehung von NETs kommt es zu einer Behinderung des Blutflusses. Dies führt zu einer Unterversorgung des Nachstromgebietes und der Entstehung eines hypoxischen Areal, welches wiederum die Permeabilität des Endothels erhöht und die Extravasation einer Tumorzelle fördert.
 - b. Mithilfe der Expression von Angiopoietin1 und Angiopoietin2 durch Wirtszellen kann die Permeabilität der Gefäßwand gezielt reguliert und der Tumorzelle so die Extravasation ermöglicht werden.

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen zeigte sich, dass intravaskuläre Ang2-exprimierende Zellen Ly6G⁺ waren. Dies grenzte die Suche nach der Identität der Zellen zwar ein, müsste aber durch weitere Experimente noch genauer bestimmt werden. Aufgrund der Zell- sowie Nukleusform schlussfolgerten wir, dass es sich bei den intravaskulären Ang2⁺ Zellen um Neutrophile Granulozyten handeln könnte. In der Literatur konnte bereits nachgewiesen werden, dass Immunzellen Tie2-Rezeptoren auf ihrer Zellmembran exprimieren können.¹²⁶ In den intravital ermittelten Videos konnten wir beobachten, dass die Karzinomzellen 9 Std. nach der Injektion der Zellen überwiegend in den Gefäßen arretiert oder bereits extravasiert waren. Nur ein geringer Teil der Zellen war noch mobil. Die häufig abrupten Richtungswechsel dieser Zellen,

die oftmals auch gegen die Richtung des Blutstromes wanderten, ließen darauf schließen, dass diese Zellen auf der Suche nach einer Lokalisation waren, die ihnen die Extravasation ermöglichen konnte.

Auffällig war zudem, dass durchschnittlich jede dritte Karzinomzelle mit einer Kupfferzelle interagiert. Es ist bereits bekannt, dass diese sessilen Makrophagen der Leber im Zuge der Metastasierung eine fördernde Wirkung entfalten, indem sie durch Interaktion mit Exosomen der Karzinomzellen für eine prometastatische Umgebung sorgen.^{55–57} Diese Interaktion schienen die Kupfferzellen mit in der Mikrozirkulation der Leber ankommenden Tumorzellen fortzuführen.^{127–129} Ob die Lebermakrophagen hierbei eine zytotoxische Wirkung auf die Karzinomzellen entfalten oder aber die Extravasation der Tumorzellen fördern, ist noch nicht abschließend geklärt. Bei Sichtung und Analyse der Gefrierschnitte unter dem Konfokalmikroskop stellten wir fest, dass die Mehrzahl der extravasierten Karzinomzellen in unmittelbarer Nähe (<10µm) zum Endothel verblieb. Aufgrund unserer Ergebnisse aus den intravital aufgezeichneten Videos ist zu vermuten, dass diese perivaskulären Zellen zumindest teilweise kupfferzellassoziiert waren.

6 Videos

Video 1: [..\movies\Video1_Tumorzelleextravasation.pptx](#)

Video 2: [..\movies\Video2_Tumorzellarrest.pptx](#)

Video 3: [..\movies\Video3_Bewegung einer Tumorzelle.pptx](#)

Video 4: [..\movies\Video4_Tumorzell-Kupfferzell Interaktion.pptx](#)

Video 5: [..\movies\Video5_Tumorzell-nk Monozyt Interaktion.pptx](#)

Video 6: [..\movies\Video6 Immunzellen mit Tumormaterial.pptx](#)

Video 7: [..\movies\Video7_Tumorzell-Neutrophilen Interaktion.pptx](#)

7 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine der tödlichsten Krebsarten, welches trotz intensiver Forschungsarbeit bis heute kaum kurativ behandelt werden kann. Dies ist unter anderem auf die frühzeitige, oft prädiagnostische Metastasierung zurückzuführen. Diese betrifft im Besonderen die Leber, in welche die metastasierenden Tumorzellen unter anderem über den Blutstrom gelangen und dort durch zum Teil noch zu erforschende Mechanismen aus der Mikrozirkulation der Leber in den Extrazellulärraum extravasieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden schwerpunktmäßig die Rolle der tumorinduzierten Koagulation und der Bildung von NETs für die Extravasation metastasierender Pankreaskarzinomzellen untersucht.

Die Ergebnisse beruhen sowohl auf in-vitro- als auch in-vivo-Experimenten, letztere auch auf intravitalen Analysen der Tumorzellbewegungen. Als Methoden kamen insbesondere die konfokale Mikroskopie, die 2-Photonenmikroskopie sowie die Immunhistochemie bei unterschiedlichen Mausmodellen zur Anwendung.

Bereits kurze Zeit nach der Injektion der Pankreaskarzinomzellen wurden klassische Monozyten an den Ort der Tumorzellimmobilisierung in der Mikrozirkulation der Leber rekrutiert, im Gegensatz zu den erst später nachweisbaren nicht-klassischen (patrouillierenden) Monozyten. Während einer 10 Std.-Beobachtungsperiode nach Tumorzellinjektion zeigte sich in der intravitalen 2-Photonenmikroskopie eine Interaktion der patrouillierenden Monozyten mit den Tumorzellen, die mit der Inkorporation von Tumorzellmaterial durch die Immunzellen einherging. Parallel dazu kam es zu einer Interaktion der sinusoidalen Kupfferzellen mit den in der Mikrozirkulation arretierten Karzinomzellen. Neutrophile Granulozyten wurden zwar ebenfalls rekrutiert, zeigten aber keine direkte Interaktion mit den Karzinomzellen.

Die parallel zur Immunzellrekrutierung beobachtete Aktivierung der intravaskulären Koagulation und die Bildung von NETs wurde durch die Karzinomzellen direkt bzw. indirekt ausgelöst. Die Bildung von NETs förderte die Extravasation der Tumorzellen aus der Mikrozirkulation der Leber und damit deren Gewebeinvasion. Eine Reduktion der Fibrinbildung mittels Rivaroxaban zeigte verglichen mit der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in Tumorzellextravasation sowie -zahl. Parallel zur Extravasation der Tumorzellen kam es durch die Koagulationsaktivierung sowie die NETs zu Gefäßverschlüssen in der Mikrozirkulation, die mit tumorzellinduzierten

Veränderungen der HIF1 α -Expression des Endothels einhergingen. Für die Extravasation der Pankreaskarzinomzellen könnten die endothelialen Gefäßpermeabilitätsregulatoren Ang1 und Ang2 von erheblicher Bedeutung sein. Im Zuge der Tumorzellextravasation kommt zu einem Anstieg dieser Wachstumsfaktoren, welcher offensichtlich durch die Koagulationsaktivierung bzw. NETs-Bildung beeinflusst wird. Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass vor allem die Bildung der NETs die transendotheliale Migration der Pankreaskarzinomzellen deutlich steigern können, so dass die Verhinderung der Bildung der NETs die frühe Metastasierung erheblich inhibieren könnte. Die tumor- und wirtsinduzierte Aktivierung der Koagulation hingegen scheint verglichen mit den NETs eine untergeordnete Rolle im Extravasationsprozess der Tumorzellen zu spielen.

8 Summary

Pancreatic carcinoma is one of the most lethal types of cancer which despite intensive research can still not be treated curatively. This is partly due to the early often pre-diagnostic metastasis. Pancreatic metastasis mainly affects the liver into which the metastasizing tumor cells are mostly directed via the bloodstream.

The focus of the present doctoral thesis was to investigate the roles of tumor-induced blood coagulation and the formation of NETs for the extravasation of metastatic pancreatic carcinoma cells.

The results were obtained by in vitro as well as in vivo experiments, the latter being also substantiated by intravital imaging. Among the methods mostly employed were confocal microscopy, 2-photon microscopy and immunohistochemistry using various mouse models.

Shortly after injection of pancreatic carcinoma cells classical monocytes were attracted to the site of tumor cell arrest in the liver microcirculation, while non-classical (patrolling) monocytes were recruited later. During a 10 h observation period using intravital 2-photon microscopy we observed interactions of patrolling monocytes with tumor cells and the incorporation of tumor cell material by these immune cells. In addition, the carcinoma cells colocalized and appeared to interact directly with sinusoidal Kupffer cells. Neutrophil granulocytes were also recruited, but did not appear to directly interact with the tumor cells.

The tumor cells triggered themselves the activation of intravascular coagulation and, indirectly, the generation of NETs. The formation of NETs promoted the extravasation of the pancreatic cancer cells into the perivascular tissue which initiated the process of metastasis. Reduction of fibrin formation by rivaroxaban showed no significant differences in tumor cell extravasation or number compared with the control group. Along with the process of extravasation we observed occlusions of the liver microvessels due to activation of blood coagulation as well as of enhanced NETosis, which were accompanied by an increase in the endothelial HIF1 α expression. The endothelial vessel permeability regulators Ang1 and Ang2 could play a role for the extravasation of the pancreatic cancer cells since their expressions were regulated by both the local fibrin formation as well as by the generation of NETs. Together, these results suggest that the formation of NETs enhance the transendothelial migration of pancreatic cancer cells so that the inhibition of NET formation could efficiently suppress the early phase of metastasis. In contrast, tumor- and host-induced activation of coagulation seems to play a minor role in the extravasation process of tumor cells compared with NETs.

9 Literaturverzeichnis

1. Katalinic A.: Krebs in Deutschland 2017/2018. *Robert Koch Institut*. 2021.
2. Ilic M, Ilic I.: Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016. doi:10.3748/wjg.v22.i44.9694
3. Adamska A, Domenichini A, Falasca M.: Pancreatic ductal adenocarcinoma: Current and evolving therapies. *Int J Mol Sci*. 2017. doi:10.3390/ijms18071338
4. Ren B, Cui M, Yang G, et al.: Tumor microenvironment participates in metastasis of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2018. doi:10.1186/s12943-18-0858-1
5. Huang L, Jansen L, Balavarca Y, et al.: Stratified survival of resected and overall pancreatic cancer patients in Europe and the USA in the early twenty-first century: A large, international population-based study. *BMC Med*. 2018. doi:10.1186/s12916-018-1120-9
6. Shi J, Xue J.: Inflammation and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese Clin Oncol*. 2019. doi:10.21037/cco.2019.04.02
7. Yadav D, Lowenfels AB.: The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.068
8. Khasawneh J, Schulz MD, Walch A, et al.: Inflammation and mitochondrial fatty acid -oxidation link obesity to early tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci*. 2009. doi:10.1073/pnas.0802864106
9. Korsse SE, Harinck F, van Lier MGF, et al.: Pancreatic cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome patients: A large cohort study and implications for surveillance. *J Med Genet*. 2013. doi:10.1136/jmedgenet-2012-101277
10. Langner C.: Hereditäres Magen- und Pankreaskarzinom. *Pathologe*. 2017. doi:10.1007/s00292-017-0297-6
11. RKI: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland. *Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut Berlin*. 2016. doi:10.17886/rkipubl-2016-014
12. Ormanns: Pathologie und Molekularpathologie des Pankreaskarzinoms. *Trillium Krebsmedizin*. 2014
13. Liou GY, Döppler H, Necela B, et al.: Mutant KRAS–induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions. *Cancer Discov*. 2015. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0474
14. Schneider G, Siveke JT, Eckel F, et al.: Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology*. 2005. doi:10.1053/j.gastro.2005.04.001

15. Hand F, Conlon KC: Pancreatic cancer. *Surg (United Kingdom)*.doi:10.1016/j.mpsur.2019.03.005
16. Khorana A, Kuderer NM, Culakova E, et al.: Development and validation of a predictive model for chemotherapy-associated thrombosis. *Blood*. 2008. doi:10.1182/blood-2007-10-116327
17. Rak J, Yu JL, Luyendyk J, et al.: Oncogenes, trousseau syndrome and cancer-related changes in the coagulome of mice and humans. *Cancer Res*. 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2350
18. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA: Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037
19. Ocaña OH, Córcoles R, Fabra Á, et al.: Metastatic Colonization requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 2012. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.012
20. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al.: EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 2012. doi:10.1016/j.cell.2011.11.025
21. Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009. doi:10.1172/JCI39104
22. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al.: Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014. doi:10.1016/j.cell.2014.07.013
23. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, et al.: En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends in Cancer*. 2015. doi:10.1016/j.trecan.2015.07.006
24. Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, et al.: The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int J Hematol*. 2011. doi:10.1007/s12185-011-0799-6
25. Headley MB, Bins A, Nip A, et al.: Visualization of immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature*. 2016. doi:10.1038/nature16985
26. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA: Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015. doi:10.1038/nri3839
27. Pahl J, Cerwenka A.: Tricking the balance: NK cells in anti-cancer immunity. *Immunobiology*. 2017. doi:10.1016/j.imbio.2015.07.012
28. Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, et al.: Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol*. 2002. doi:10.1038/ni746
29. Wallin RPA, Screpanti V, Michaëlsson J, et al.: Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 2003. doi:10.1002/eji.200324070
30. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034

31. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, et al.: Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014. doi:10.1002/eji.201344272
32. Labelle M, Hynes RO.: The initial hours of metastasis: The importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov*. 2012. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0329
33. Leblanc R, Peyruchaud O.: Metastasis: New functional implications of platelets and megakaryocytes. *Blood*. 2016. doi:10.1182/blood-2016-1-636399
34. Kopp HG, Placke T, Salih HR.: Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity. *Cancer Res*. 2009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2123
35. Guo Y, Cui W, Pei Y, et al.: Platelets promote invasion and induce epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells by TGF- β signaling pathway. *Gynecol Oncol*. 2019. doi:10.1016/j.ygyno.2019.02.026
36. Gay LJ, Felding-Habermann B.: Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011. doi:10.1038/nrc3004
37. Geissmann F, Jung S, Littman DR.: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003. doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2
38. Gordon S, Taylor PR.: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005. doi:10.1038/nri1733
39. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, et al.: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 2008. doi:10.1189/jlb.0407247
40. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, et al.: Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: A role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res*. 2013. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0525
41. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW.: Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*. 2015. doi:10.1038/nri3789
42. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, et al.: Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*. 2007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0175
43. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, et al.: Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov*. 2011. doi:10.1158/2159-8274.CD-10-0028
44. Kuang DM, Zhao Q, Peng C, et al.: Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009. doi:10.1084/jem.20082173
45. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, et al.: B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med*. 2006. doi:10.1084/jem.20050930

46. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al.: Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004. doi:10.1038/nm1093
47. Qian BZ, Li J, Zhang H, et al.: CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature.* 2011. doi:10.1038/nature10138
48. Plebanek MP, Angeloni NL, Vinokour E, et al.: Pre-metastatic cancer exosomes induce immune surveillance by patrolling monocytes at the metastatic niche. *Nat Commun.* 2017. doi:10.1038/s41467-017-01433-3
49. Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, et al.: Nr4a1-dependent Ly6Clow monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell.* 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.03.010
50. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al.: Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007. doi:10.1126/science.1142883
51. Hanna RN, Cekic C, Sag D, et al.: Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science.* 2015. doi:10.1126/science.aac9407
52. Buscher K, Marcovecchio P, Hedrick CC, et al.: Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Front Cardiovasc Med.* 2017. doi:10.3389/fcvm.2017.00080
53. Cassetta L, Pollard JW.: Cancer immunosurveillance: Role of patrolling monocytes. *Cell Res.* 2016. doi:10.1038/cr.2015.144
54. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL.: Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 2006. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x
55. Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, et al.: Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol.* 2015. doi:10.1038/ncb3169
56. Houg DS, Bijlsma MF.: The hepatic pre-metastatic niche in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2018. doi:10.1186/s12943-018-0842-9
57. Lu X, Kang Y.: Organotropism of breast cancer metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2007. doi:10.1007/s10911-007-9047-3
58. Cox TR, Bird D, Baker AM, et al.: LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2233
59. Nielsen SR, Quaranta V, Linford A, et al.: Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol.* 2016. doi:10.1038/ncb3340
60. Swierczak A, Mouchemore KA, Hamilton JA, et al.: Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2015. doi:10.1007/s10555-015-9594-9

61. Hasegawa S, Eguchi H, Tomokuni A, et al.: Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio as a predictive marker for pathological response to preoperative chemoradiotherapy in pancreatic cancer. *Oncol Lett.* 2016. doi:10.3892/ol.2015.4057
62. Treffers LW, Hiemstra IH, Kuijpers TW, et al.: Neutrophils in cancer. *Immunol Rev.* 2016. doi:10.1111/imr.12444
63. Coffelt SB, Wellenstein MD, De Visser KE.: Neutrophils in cancer: Neutral no more. *Nat Rev Cancer.* 2016. doi:10.1038/nrc.2016.52
64. Ocana A, Nieto-Jiménez C, Pandiella A, et al.: Neutrophils in cancer: Prognostic role and therapeutic strategies. *Mol Cancer.* 2017. doi:10.1186/s12943-017-0707-7
65. Arelaki S, Arampatzioglou A, Kambas K, et al.: Gradient infiltration of neutrophil extracellular traps in colon cancer and evidence for their involvement in tumour growth. *PLoS One.* 2016. doi:10.1371/journal.pone.0154484
66. Demers M, Wong SL, Martinod K, et al.: Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology.* 2016. doi:10.1080/2162402X.2015.1134073
67. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, et al.: Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest.* 2013. doi:10.1172/JCI67484
68. Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, et al.: A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol.* 2013. doi:10.3389/fimmu.2013.00048
69. Thålin C, Lundström S, Seignez C, et al.: Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One.* 2018. doi:10.1371/journal.pone.0191231
70. Yaykasli KO, Schauer C, Muñoz LE, et al.: Neutrophil extracellular trap-driven occlusive diseases. *Cells.* 2021. doi:10.3390/cells10092208
71. Chang X, Han J.: Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog.* 2006. doi:10.1002/mc.20169
72. Leshner M, Wang S, Lewis C, et al.: PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures. *Front Immunol.* 2012. doi:10.3389/fimmu.2012.00307
73. Wang S, Wang Y.: Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2013. doi:10.1016/j.bbagr.2013.07.003
74. Neeli I, Dwivedi N, Khan S, et al.: Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun.* 2009. doi:10.1159/000206974
75. Jiménez-Alcázar M, Rangaswamy C, Panda R, et al.: Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science.* 2017. doi:10.1126/science.aam8897

76. Szczerba BM, Castro-Giner F, Vetter M, et al.: Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*. 2019. doi:10.1038/s41586-019-0915-y
77. Najmeh S, Cools-Lartigue J, Rayes RF, et al.: Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via β 1-integrin mediated interactions. *Int J Cancer*. 2017. doi:10.1002/ijc.30635
78. Stark K, Schubert I, Joshi U, et al.: Distinct Pathogenesis of Pancreatic Cancer Microvesicle-Associated Venous Thrombosis Identifies New Antithrombotic Targets in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310262
79. Pfeiler S, Massberg S, Engelmann B.: Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res*. 2014. doi:10.1016/j.thromres.2014.03.016
80. Repetto O, De Re V.: Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2017. doi:10.1111/nyas.13454
81. Langer F, Bokemeyer C.: Crosstalk between cancer and haemostasis: Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Hamostaseologie*. 2012. doi:10.5482/ha-1160
82. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al.: VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005. doi:10.1038/nature04186
83. Peinado H, Zhang H, Matei IR, et al.: Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nat Rev Cancer*. 2017. doi:10.1038/nrc.2017.6
84. Gil-Bernabé AM, Ferjančič Š, Tlalka M, et al.: Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood*. 2012. doi:10.1182/blood-2011-08-376426
85. Seubert B, Grünwald B, Kobuch J, et al.: Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology*. 2015. doi:10.1002/hep.27378
86. Erkan M, Kurtoglu M, Kleeff J.: The role of hypoxia in pancreatic cancer: A potential therapeutic target? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016. doi:10.1586/17474124.2016.1117386
87. Klaus M.: Neuartige Nitroimidazol-Derivate als mögliche hypoxische Radiosensitizer in der Radiotherapie solider Tumoren. *Promotionsarbeit Universität Tübingen*. 2017.
88. Aguilera KY, Brekken RA.: Hypoxia Studies with Pimonidazole in vivo. *Bio-protocol*. 2014. doi: 10.21769/bioprotoc.1254
89. Sharp FR, Bernaudin M.: HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2004. doi:10.1038/nrn1408

90. Qin J, Liu Y, Lu Y, et al.: Hypoxia-inducible factor 1 alpha promotes cancer stem cells-like properties in human ovarian cancer cells by upregulating SIRT1 expression. *Sci Rep.* 2017. doi:10.1038/s41598-017-09244-8
91. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, et al.: Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin - Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009. doi:10.1038/nrm2639
92. Jeansson M, Gawlik A, Anderson G, et al.: Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J Clin Invest.* 2011. doi:10.1172/JCI46322
93. Eklund L, Kangas J, Saharinen P.: Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems. *Clin Sci.* 2016. doi:10.1042/cs20160129
94. Holopainen T, Saharinen P, D'Amico G., et al.: Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 2012. doi:10.1093/jnci/djs009
95. Suri C, Jones PF, Patan S, et al.: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996. doi:10.1016/S0092-8674(00)81813-9
96. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, et al.: The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004. doi:10.1182/blood-2003-10-3685
97. Chen L, Li J, Wang F, et al.: Tie2 expression on macrophages is required for blood vessel reconstruction and tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res.* 2016. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1114
98. Harney, Allison S, Karagiannis GS, et al.: The Selective Tie2 Inhibitor Rebastinib Blocks Recruitment and Function of Tie2 Hi Macrophages in Breast Cancer and Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Mol Cancer Ther.* 2017. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0241
99. Biochrom: Use of trypsin dry substance and trypsin/EDTA solutions from Biochrom AG. *Biochrom AG Inf.* 2010.
100. Biochrom: Empfehlungen für die optimale Menge an Kulturmedium für Zellkulturflaschen, Schalen und Testplatten von TPP. *Biochrom AG Inf.* 2010
101. Thomas TF, Ganetsky V, Spinler SA.: Rivaroxaban: An Oral Factor Xa Inhibitor. *Clin Ther.* 2013. doi:10.1016/j.clinthera.2012.12.005
102. McDowall AW, Chang JJ, Freeman R, et al.: Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples. *J Microsc.* 1983.
103. Griffiths G, McDowall A, Back R, et al.: On the preparation of cryosections for immunocytochemistry. *J Ultrastructure Res.* 1984. doi:10.1016/S0022-5320(84)80024-6
104. Engelhardt J, Knebel W.: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie. *Phys unserer*

Zeit. 2007. doi:10.1002/piuz.19930240207

105. Liu H, Zhu R, Liu C, et al.: Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. *Biomed Res Int*. 2017. doi:10.1155/2017/9050754
106. Ramulu S, Kale A, Hallikerimath S, et al.: Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013. doi:10.4103/0973-029x.110698
107. Avwioro G.: Histochemical uses of Haematoxylin - a review. *J Pharm Clin Sci*. 2011.
108. Joshi U.: Role of extracellular vesicles, microvascular fibrin formation and immune surveillance in pancreatic cancer metastasis. *Promotionsarbeit LMU München*. 2018.
109. Lee JW, Komar CA, Bengsch F, et al.: Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: The KPC model (LSL-KrasG12D/+;LSL-Trp53R172H/+;Pdx-1-Cre), its variants and their application in immuno-oncology drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*. 2016. doi:10.1002/cpph.2
110. Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, et al.: Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med*. 2016. doi:10.1126/scitranslmed.aag1711
111. Cedervall J, Zhang Y, Olsson AK: Tumor-induced NETosis as a risk factor for metastasis and organ failure. *Cancer Res*. 2016. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3051
112. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al.: Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004. doi:10.1126/science.1092385
113. Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, et al.: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol*. 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.01749
114. Kaltenmeier C, Simmons RL, Tohme S, et al.: Neutrophil extracellular traps (Nets) in cancer metastasis. *Cancers*. 2021. doi:10.3390/cancers13236131
115. Chen R, Kang R, Fan XG, et al.: Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis*. 2014. doi:10.1038/cddis.2014.337
116. Silk E, Zhao H, Weng H, et al.: The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis*. 2017. doi:10.1038/cddis.2017.52
117. Cheung KJ, Ewald AJ.: A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science*. 2016. doi:10.1126/science.aaf6546
118. Razak NA, Elaskalani O, Metharom P.: Pancreatic cancer-induced neutrophil extracellular traps: A potential contributor to cancer-associated thrombosis. *Int J Mol Sci*. 2017. doi:10.3390/ijms18030487
119. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, et al.: Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am*

J Physiol Physiol. 2017. doi:10.1152/ajpcell.1992.262.3.c546

120. Rankin EB, Nam JM, Giaccia AJ.: Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends in Cancer*. 2016. doi:10.1016/j.trecan.2016.05.006
121. Jiang YZ, Li Y, Wang K, et al.: Distinct roles of HIF1A in endothelial adaptations to physiological and ambient oxygen. *Mol Cell Endocrinol*. 2014. doi:10.1016/j.mce.2014.04.008
122. Lindholm ME, Rundqvist H.: Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *Exp Physiol*. 2016. doi:10.1113/EP085318
123. Wurmbach JH, Hammerer P, Sevinc S, et al.: The expression of angiopoietins and their receptor tie-2 in human prostate carcinoma. *Anticancer Research*. 2000.
124. Juusola M, Mustonen H, Saharinen P, et al.: The Dual Role of Angiopoietin 2 in Pancreatic Cancer. *Hpb*. 2021. doi:10.1016/j.hpb.2021.08.829
125. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, et al.: Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiopoietin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. *J Immunol*. 2018. doi:10.4049/jimmunol.1701203
126. Lewis CE, De Palma M, Naldini L.: Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: Regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. 2007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1684
127. Dingemans KP, Van Den Bergh-Weerman MA.: Mammary-carcinoma cells in mouse liver: Infiltration of liver tissue and interaction with kupffer cells. *Br J Cancer*. 1978. doi:10.1038/bjc.1978.167
128. Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, et al.: In vivo microscopy of hepatic metastases: Dynamic observation of tumor cell invasion and interaction with kupffer cells. *Hepatology*. 1995. doi:10.1016/0270-9139(95)90111-6
129. Timmers M, Vekemans K, Vermijlen D, et al.: Interactions between rat colon carcinoma cells and kupffer cells during the onset of hepatic metastasis. *Int J Cancer*. 2004. doi:10.1002/ijc.20481

10 Danksagung

Mit der Beendigung meiner Arbeit in unserer Forschungsgruppe am Institut für Laboratoriumsmedizin möchte ich all den Menschen und Mitarbeitern danken, die mir in den vergangenen Monaten auf vielfältige und überaus selbstlose Art und Weise geholfen und mich unterstützt haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Bernd Engelmann, der mir nicht nur die Gelegenheit gab, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben, sondern mich immerwährend durch sein Wissen, seine Kompetenz, seinen Rat und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der Materialien unterstützt hat. Vielen Dank für die Hilfe und die Zeit, die Sie mir und meiner Arbeit gewidmet haben!

Zudem danke ich Herrn Professor Dr. med. Daniel Teupser, dem Direktor des Instituts für Laboratoriumsmedizin am Klinikum der Universität München, dass ich an seinem Institut forschen und meine Doktorarbeit anfertigen konnte.

Mein Dank gilt auch und insbesondere Dr. Hellen Ishikawa-Ankerhold für die Mitarbeit an zahlreichen Experimenten, die wir gemeinsam geplant und durchgeführt haben, sowie ihre stets hilfreichen praktischen Ratschläge. An dieser Stelle möchte ich auch Dominic van den Heuvel danken, der mir zu jeder Zeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand, und mich in meiner Arbeit stets tatkräftig unterstützt hat. Fehlen darf hier auch nicht Inas – vielen Dank für die gute und problemlose Zusammenarbeit und die Einarbeitung in die Materie der Neutrophilen-Isolation.

Diesbezüglich möchte auch Herrn Professor Dr. med. Steffen Massberg (Medizinische Klinik und Poliklinik I, Klinikum der Universität München) sowie Herrn Professor Dr. med. Christian Schulz für die gute und profitable Zusammenarbeit in unseren Arbeitsgruppen danken.

Danken möchte ich auch meiner Arbeitsgruppe, die mir die vielen Stunden im Labor durch interessante Gespräche und Diskussionen verkürzt haben und mir in meiner Forschungsarbeit stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Hier möchte ich vor allem Mano und Mona für die zahlreichen Denkanstöße, Rat- und Verbesserungsvorschläge danken, die mir geholfen haben, meine Arbeit voranzubringen. Vielen Dank, dass ihr immer Zeit und ein offenes Ohr für mich hattet! Auch Dr. Urjita Joshi gilt mein Dank, die mir, trotzdem sie einen neuen Arbeitsplatz angetreten hatte, stets bereitwillig und umgehend alle Fragen beantwortete.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern danken, dass sie ihre eigenen Wünsche und ihre Zeit der Familie und ihren Kindern unterordnen und uns in allem unterstützen, damit wir unsere Träume und Wünsche verwirklichen können.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Berchtold, Magda-Lena

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Die Rolle von Fibrin und NETs für die Bewegungen von Pankreaskarzinomzellen
in der Mikrozirkulation der Leber

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Peiting, 01.03.2023

Ort, Datum

Berchtold, Magda-Lena

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand