

Aus der Klinik für Allgemeine Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DER EINFLUSS VON PANKREASMYOFIBROBLASTEN AUF DIE
INTRINSISCHE CHEMORESISTENZ DES PANKREASKARZINOMS –
EPIGENETISCHE REGULATION VON CASPASEN IN DER
PANKREATISCHEN GANGZELLINIE HPDE6C7**

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

vorgelegt von

DOROTHEE KOCH

von Nordstrand

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sebens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ungefroren

Tag der mündlichen Prüfung: 11. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 11. August 2009

gez. Prof. Dr. Fickenscher
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Vorbemerkung	XI

1.	Einleitung	S. 1
1.1	Das Pankreaskarzinom	S. 1
1.1.1	Epidemiologie	S. 1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	S. 1
1.1.3	Klinische Darstellung	S. 1
1.1.4	Pathologie	S. 2
1.1.5	Progressionsmodell und genetische Grundlagen	S. 3
1.2	Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7-Zelllinie)	S. 4
1.3	Apoptose und Funktion der Caspasen	S. 5
1.4	Zytostatika-induzierte Apoptose und Apoptoseresistenz in Tumorzellen	S. 7
1.5	Einfluss der epigenetischen Regulation der Caspasenexpression auf die Apoptoseresistenz	S. 8
1.6	Einfluss des Transkriptionsfaktors Stat1 auf die Caspasenexpression und die Apoptoseresistenz	S. 9
1.7	Fragestellung der Arbeit	S.10
2.	Material	S.11
2.1	Isolierung und Expansion muriner Pankreasmyofibroblasten	S.11
2.2	Immunzytochemische Charakterisierung der murinen Pankreasmyofibroblasten	S.11
2.3	Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7-Zelllinie)	S.12
2.4	Zellkultur	S.12
2.4.1	Medien und Medienzusätze	S.12
2.4.2	Sonstige Materialien und Geräte für die Zellkultur	S.13
2.4.3	Substanzen für die Behandlung der Zellen	S.13

2.5	Fluoreszenzdurchflusszytometrie	S.14
2.5.1	Detektion von α -SMA und Cytokeratin 18 mittels FACS	S.14
2.5.2	Apoptoseanalyse mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung	S.14
2.6	Caspase-3/-7-Assay	S.15
2.7	Proteintechniken	S.15
2.7.1	Herstellung von Kernextrakten	S.15
2.7.2	Herstellung von Ganzzelllysaten	S.15
2.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz	S.16
2.7.4	Einstellen des Proteingehalts der Proben	S.16
2.7.5	SDS-Gelelektrophorese	S.16
2.7.6	Western Blot	S.17
2.7.7	Immunnachweis der Proteine	S.17
2.8	RNA-Techniken	S.18
2.8.1	RNA-Isolierung	S.18
2.8.2	Herstellung von cDNA	S.19
2.8.3	Echtzeit-PCR	S.19
2.9	Transfektion	S.20
3.	Methoden	S.21
3.1	Isolierung und Expansion muriner Pankreasmyofibroblasten	S.21
3.2	Immunzytochemische Charakterisierung der murinen Pankreasmyofibroblasten	S.22
3.3	Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7-Zelllinie)	S.23
3.4	Zellkultur	S.23
3.4.1	Zellkulturbedingungen	S.23
3.4.2	Medien und Zusätze	S.23
3.4.3	Kultivierung der Zellen	S.24
3.4.4	Cokultur der Zelllinie HPDE6c7 mit murinen Pankreasmyofibroblasten	S.24
3.5	Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	S.25
3.5.1	Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	S.25
3.5.2	Detektion von α -Smooth Muscle Actin und Cytokeratin 18 mittels FACS	S.26

3.5.3	Apoptoseanalyse mittels FACS	S.27
	3.5.3.1 Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC und PI	S.27
	3.5.3.2 Durchführung	S.27
3.6	Caspase-3/-7-Assay	S.27
3.7	Proteintechniken	S.28
	3.7.1 Herstellung von Kernextrakten	S.28
	3.7.2 Herstellung von Ganzzelllysaten	S.29
	3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz	S.29
	3.7.4 Einstellen des Proteingehalts der Proben	S.30
	3.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	S.30
	3.7.6 Western Blot	S.31
	3.7.7 Immunnachweis der Proteine	S.32
3.8	RNA-Techniken	S.33
	3.8.1 RNA-Isolierung	S.33
	3.8.2 Herstellung von cDNA	S.34
	3.8.3 Echtzeit-PCR	S.34
	3.8.3.1 Prinzip	S.34
	3.8.3.2 Durchführung	S.35
3.9	Transfektion	S.36
	3.9.1 Transfektion mit DNMT1-siRNA	S.36
	3.9.2 Transfektion mit Stat1-Plasmid	S.37
3.10	Statistik	S.37
4.	Ergebnisse	S.38
4.1	Charakterisierung der HPDE6c7-Zellen anhand der Expression von Cytokeratin 18, E-Cadherin, α -SMA, Vimentin und Carbonanhydrase II	S.38
4.2	Isolation und Expansion der murinen Pankreasmyofibroblasten sowie Charakterisierung mittels immunzytochemischer Färbung	S.39
4.3	Cokultur mit Pankreasmyofibroblasten führt zum Erwerb eines chemoresistenten Phänotyps in den HPDE6c7-Zellen	S.41
4.4	Cokultur mit Pankreasmyofibroblasten vermindert in der Zelllinie HPDE6c7 die basale Caspasenexpression	S.43

4.5	Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin steigert die Caspasenexpression und die Chemosensitivität in kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.46
4.6	Verminderte Expression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.49
4.7	Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin steigert die Expression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.50
4.8	Transfektion mit rekombinantem Stat1 vermindert die Chemoresistenz der kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.52
4.9	Erhöhte Expression der DNA-Methyltransferase 1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.53
4.10	Einfluss der siRNA-vermittelten Unterdrückung der DNMT1-Expression auf die Expression von Stat1 und der Caspasen 8, 9, 3 und 7 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.54
4.11	Transfektion mit DNMT1 siRNA vermindert die Chemoresistenz der kokultivierten HPDE6c7-Zellen	S.56
5.	Diskussion	S.58
6.	Zusammenfassung	S.65
7.	Literaturverzeichnis	S.66
8.	Danksagung	S.74
9.	Lebenslauf	S.75

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Immunzytochemische Färbung der isolierten murinen Pankreasmyofibroblasten
- Abbildung 2:** HPDE6c7-Zellen erwerben in Gegenwart von Pankreasmyofibroblasten einen chemoresistenten Phänotyp
- Abbildung 3:** Die Cokultur mit Pankreasmyofibroblasten vermindert in HPDE6c7-Zellen die basale Caspasenexpression
- Abbildung 4:** Die Cokultur mit Pankreasmyofibroblasten vermindert in HPDE6c7-Zellen die basale Expression der Caspasen-mRNA
- Abbildung 5:** Die Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin steigert die Caspasenexpression in kokultivierten HPDE6c7-Zellen
- Abbildung 6:** Die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin steigert die Chemosensitivität in kokultivierten HPDE6c7-Zellen
- Abbildung 7:** Die Stat1-Expression ist in kokultivierten HPDE6c7-Zellen vermindert
- Abbildung 8:** Die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin steigert die Expression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen
- Abbildung 9:** Mit Stat1 transfizierte kokultivierte HPDE6c7-Zellen zeigen eine erhöhte Caspaseaktivität
- Abbildung 10:** Die nukleäre Expression von DNMT1 ist in kokultivierten HPDE6c7-Zellen erhöht
- Abbildung 11:** Transfektion mit DNMT1 siRNA vermindert die DNMT1-Expression in kokultivierten HPDE6c7-Zellen
- Abbildung 12:** Transfektion mit DNMT1 siRNA steigert die Expression von Stat1 und der Caspasen 8, 9, 3 und 7 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen
- Abbildung 13:** Transfektion mit DNMT1 siRNA steigert die Chemosensitivität der kokultivierten HPDE6c7-Zellen
- Abbildung 14:** Modell für die Entstehung der Intrinsischen/Vorbestehenden Chemoresistenz in Pankreasgangepithel- bzw. Pankreaskarzinomzellen

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
α -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
Abl	Abelson-Leukämie-Virusonkogen
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
5-Aza	5-Azadeoxycytidin
Bcl	B-cell-leukemia/lymphom
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
cm ³	Kubikzenimeter
c-myc	Myelocytomatosis-Virusonkogen
Co	Cokultivierte Zellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Crossing Point
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
C _T	Cycle Threshold
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma 4; Synonym: SMAD4, MADH4

dT	Desoxy-Thymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
erbB2	erythroblastic leukemia viral oncogen homolog 2
Eto	Etoposid
Fas	Todesrezeptor; Synonym: APO-1 und CD95
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP	FADD-like ICE inhibitory proteins
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	(N-[2-hydroxyethyl]-piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure])
HER	Human Epidermal Growth Receptor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPDE6c7	Human Pancreatic Duct Epithelial 6 clone 7
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSP90	Heat Shock Protein 90
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin 1 beta
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramm

KGF	Keratinocyte Growth Factor
K-ras	Kirsten-Ratten-Sarkom-Virusonkogen
l	Liter
Mono	Monokultivierte Zellen
MUC-1	Mucin-1
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	molar
mM	millimolar
MM	Magermilch
M-MLV	Moloney - Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p16 ^{INK4A}	Tumorsuppressorgen Protein 16; Synonym: INK4A, CDKN2A
p53	Protein 53
p21/waf	Protein 21/wild-type p53-activated fragment
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PBS	Phosphate Buffered Saline
pcDNA3.1	plasmid copy DNA 3.1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb1	Retinoblastoma 1
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA interference
RT	Raumtemperatur
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SBTI	Soy Bean Trypsin Inhibitor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
Scr	Rous-Sarkom-Virusonkogen/Serinthyrosinkinase
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFM	Serum Free Media
siRNA	small interference Ribonucleic Acid
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STK11	Serin/Threonin Kinase 1; Synonym: LBK1
T	Thymin
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	TBS-Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
ub	unbehandelt
U/ μ l	Units pro Mikroliter
U/ml	Units pro Milliliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

Sebens S, Werbing V, Ammerpohl O, Witt M, Großmann M, Koch D, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. Chemoresistance induction by tumor stroma interactions – molecular and epigenetic regulation of caspases. *Eur J Cancer*. 2006; 4(12): 55 Suppl.

Präsentiert auf dem EORTC-NCI-AACR 2006 in Prag.

Sebens S, Werbing V, Ammerpohl O, Witt M, Großmann M, Koch D, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen auf die Induktion von Chemoresistenz im exokrinen Pankreaskarzinom – molekulare und epigenetische Regulation von Caspasen. *Z Gastroenterol*. 2006; 44: 809.

Präsentiert auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2006 in Hannover.

Sebens S, Werbing V, Ammerpohl O, Witt M, Großmann M, Koch D, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. STAT1 und Caspase gene silencing als wichtiger Mechanismus intrinsischer Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms. *Z Gastroenterol*. 2007; 45: 743.

Präsentiert auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten 2007 in Bochum.

Weiterhin wurden Teile diese Arbeit in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Müerköster SS, Werbing V, Koch D, Sipos B, Ammerpohl O, Kalthoff H, Tsao MS, Fölsch UR, Schäfer H. Role of myofibroblasts on innate chemoresistance in pancreatic carcinoma – epigenetic down-regulation of caspases. *Int J Cancer*. 2008; 123(8): 1751-60.

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Bis heute hat das Pankreaskarzinom die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Tumoren. In Deutschland erkranken jährlich etwa 13.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom. Dabei entspricht die Zahl der Neuerkrankungen in etwa der Zahl der Sterbefälle pro Jahr. So ist das Pankreaskarzinom in Deutschland die vierthäufigste Krebstodesursache. Die relative 5-Jahresüberlebenszeit von 6,4% bei Männern und 7,6% bei Frauen verdeutlicht den meist infausten Verlauf [1].

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Das Pankreaskarzinom ist eine Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters mit einem Erkrankungsgipfel jenseits des 60. Lebensjahres [2]. Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr sind eine Rarität [3]. Neben dem fortgeschrittenen Lebensalter gelten Rauchen, Alkoholkonsum, Adipositas und das Bestehen einer chronischen Pankreatitis oder eines Diabetes mellitus als Risikofaktoren [4]. Risikomindernd kann eine Ernährung sein, die sich durch einen hohen Anteil an Obst und Gemüse auszeichnet [5]. Neben den sporadischen Fällen bestehen etwa 5-10% der Pankreaskarzinome auf einer vererbten Prädisposition [6]. Dabei bietet das familiäre Pankreaskarzinom ein sehr heterogenes Erscheinungsbild. In einigen Familien tritt es isoliert auf, in anderen zusammen mit Tumorprädispositionssyndromen, unter denen das Peutz-Jeghers-Syndrom und die hereditäre Pankreatitis am häufigsten sind. Der Erbgang scheint autosomal-dominant und die Penetranz altersabhängig zu sein [7].

1.1.3 Klinische Darstellung

Frühsymptome sind beim Pankreaskarzinom selten und uncharakteristisch. Gelegentlich treten unspezifische Oberbauchbeschwerden auf. Daher werden Pankreaskarzinome häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Die Mehrzahl der Patienten präsentiert sich

dann mit schmerzlosem Ikterus durch intrapankreatische Verlegung des Gallengangs. Nur 10-20% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose noch operabel, wobei die Operation das einzige kurative Verfahren darstellt. Beim Pankreaskopfkarzinom werden die partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple oder die weniger radikale, pyloruserhaltende Variante angewandt [8]. Bei Lokalisation im Korpus wird eine subtotale Pankreaslinksresektion oder ggf. eine totale Duodenopankreatektomie erforderlich, bei Lokalisation im Pankreasschwanz erfolgt die Pankreaslinksresektion [4]. Erfolgreich resezierte Patienten werden adjuvant chemotherapiert, wodurch eine verbesserte 5-Jahres-Überlebensprognose erzielt werden kann [9].

Bei einem Rezidiv, einem lokal fortgeschrittenen Befund mit Gefäßeinbrüchen oder Befall peripankreatischer Lymphknoten und beim Vorliegen von Fernmetastasen wird rein palliativ therapiert. Hierbei steht die Supportivbehandlung mit Schmerz- und Ernährungstherapie sowie endoskopische und chirurgische Maßnahmen zur Beseitigung biliärer oder duodenaler Obstruktionen durch den Tumor im Vordergrund. Zusätzlich kann durch eine systemische Chemotherapie eine klinische Besserung und temporäre Progressfreiheit erreicht werden [10]. Standard ist die Monotherapie mit Gemcitabine (Gemzar[®]) [11]. Sie ist der vorher angewandten 5-Fluorouracil-Monotherapie überlegen, da unter Gemcitabine mehr Patienten eine klinische Besserung erlebten und sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zeigte [11]. Ein zusätzlicher Überlebensvorteil durch Kombination mit Pyrimidinanaloga (5-Fluorouracil), Taxanen (Docetaxel), Platin-Analoga (Cisplatin, Oxaliplatin) oder Topoisomerase-Inhibitoren (Irinotecan, Topotecan) blieb aber aus [8, 11]. In Kombination mit Gemcitabine werden mittlerweile auch *biologicals* z.B. der HER1/EGF-Rezeptor-Inhibitor Erlotinib (Tarceva[®]) eingesetzt. Strahlentherapie bringt keinen Vorteil hinsichtlich des Überlebens und auch die Kombination mit einer systemischen Chemotherapie zur Strahlensensibilisierung durch das Zytostatikum zeigt keinen Überlebensvorteil bei gleichzeitiger Verschlechterung der Lebensqualität [11].

Insgesamt muss das duktales Pankreasadenokarzinom als weitgehend chemo- und strahlenresistent angesehen werden, da keine der aufgeführten therapeutischen Maßnahmen bisher zu einer wesentlichen Verbesserung hinsichtlich des Überlebens geführt hat.

1.1.4 Pathologie

Das Pankreasparenchym besteht aus duktalem, azinären und endokrinen Zellen. 90% der Pankreaskarzinome zeigen einen duktalem Phänotyp, bei dem duktales Strukturen als Ausgang

des Karzinoms gesehen werden. Unter ihnen sind die Adenokarzinome am häufigsten. Etwa 70% der Pankreasadenokarzinome (*Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, PDAC*) sind im Pankreaskopf lokalisiert. Per continuitatem wächst das PDAC invasiv in das umliegende Gewebe und metastasiert früh lymphogen und hämatogen. Charakteristisch ist die ausgeprägte desmoplastische Stromabildung, die schon bei chronischer Pankreatitis, einem Risikofaktor für die Entstehung des PDAC, gefunden wird [2]. Zunächst wurde die Stromabildung als ein Abwehrmechanismus gegen den sich ausbreitenden Tumor gedeutet; neuere Ergebnisse zeigen aber, dass zwischen Tumorzellen und Stroma komplexe Interaktionen bestehen. Zellulärer Hauptbestandteil des Stromas sind Myofibroblasten, die als aktivierte Fibroblasten das α -Smooth-Muscle-Actin (α -SMA) der glatten Gefäßmuskelzellen exprimieren [12]. Unter Einfluss der Tumorzellen synthetisieren sie Kollagen und andere Komponenten der extrazellulären Matrix in einer Zusammensetzung, die zu einer Veränderung des Mikromilieus zugunsten des Tumors führt. Als Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktionen sind weiterhin zahlreiche Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF- β , IGF, FGF und HGF beschrieben worden [13]. Durch Sekretion proteolytischer Matrix-Metalloproteinasen, die Extrazellulärmatrix und Basalmembran degradieren, und durch Freisetzung angiogener Faktoren beeinflussen die Myofibroblasten Invasion und Metastasierung der Karzinomzellen [14]. Darüberhinaus sind Modulationen der Immunantwort durch sezernierte Chemokine und ein verminderter Kontakt der Immunzellen zu den Karzinomzellen durch die mechanischen Eigenschaften der Myofibroblasten beschrieben worden [12]. Auch die ausgeprägte Chemoresistenz des PDAC wird durch die wechselseitigen Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen wesentlich beeinflusst [15, 16]. So kann die schon vor der Behandlung mit Zytostatika bestehende intrinsische Chemoresistenz auf autokrine und parakrine Mechanismen der Tumor- und Stromazellen zurückgeführt werden [16, 17].

1.1.5 Progressionsmodell und genetische Grundlagen

Ein größeres Verständnis der Tumorgenese des PDAC und damit auch der Mechanismen, die zur ausgeprägten Chemoresistenz dieses Tumors beitragen, ist die Grundlage für eine Verbesserung sowohl der Früherkennungsmethoden als auch der Behandlungsmöglichkeiten. In Anlehnung an das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz beim Kolonkarzinom [18] wurde ein Progressionsmodell postuliert, das die Entwicklung des PDAC vom normalen Pankreasgangepithel über Vorläuferläsionen zum invasiven Karzinom beschreibt [19]. In dem

Progressionsmodell akkumulieren parallel zu den morphologischen Veränderungen genetische Mutationen, die schrittweise zum Kontrollverlust der Zelle über Zellzyklus und Apoptose führen.

Die Vorläuferläsionen des PDAC werden als pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) bezeichnet. PanIN-1A-Läsionen weisen im Gegensatz zum normalen kuboidalen Pankreasgangepithel ein zylindrisches Epithel auf. Papilläre Strukturen kennzeichnen die PanIN-1B-Läsion, zusätzliche moderate nukleäre Atypien die PanIN-2-Läsion. PanIN-3-Läsionen weisen schwere Atypien auf und werden entsprechend einem Carcinoma in situ als Hochrisiko-Läsionen betrachtet [2].

Nahezu alle PanIN-3-Läsionen und PDAC weisen eine Punktmutation im Onkogen K-ras auf. Es ist die früheste und häufigste genetische Veränderung. So ist in 40% aller PanIN-1-Läsionen und in fast 100% aller PanIN-3-Läsionen Codon 12 des K-ras-Gens mutiert [11]. In PanIN-2-Läsionen findet man zusätzlich Mutationen des Tumorsuppressorgens p16^{INK4A}, welches in etwa 95% aller sporadischen PDAC mutiert ist. Ein Verlust der Tumorsuppressorgene TP53 und DPC4/Smad4 wird für PanIN-3-Läsionen beschrieben. TP 53 kodiert für den Transkriptionsfaktor p53, der durch DNA-Schädigung aktiviert wird und Zellzyklusarrest oder Apoptose vermittelt. DPC4/Smad4 bildet eine Schlüsselkomponente des TGF- β -Signalwegs, so dass bei Verlust dieses Proteins die Wachstumsblockade durch TGF- β aufgehoben wird. Insgesamt zeigen mehr als die Hälfte der PDAC eine gestörte Funktion von p53 bzw. DPC4/Smad4 [20]. Weniger häufig sind Verluste der Tumorsuppressorgene BRCA2, Rb1 und STK11, wobei letzteres mit dem Peutz-Jeghers-Syndrom assoziiert ist. Neben solchen strukturellen Veränderungen werden schon in PanIN-1-Läsionen Wachstumsrezeptoren wie HER2/neu/erbB2 und EGF-Rezeptor sowie Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- α und TGF- β 1 vermehrt exprimiert.

1.2 Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7-Zelllinie)

Zur weiteren Aufklärung der Pathogenese des PDAC als Mehrstufenprozess vom benignen Pankreasgangepithel zum invasiven Karzinom etablierten Tsao et. al. neben den bisher verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien eine Zelllinie aus benignem, humanem Pankreasgewebe. Dazu isolierten sie Pankreasgangepithelzellen (Humane Pankreatische Duktale Epithelzellen, HPDE-Zellen) aus unverändertem Pankreasgewebe einer 63-jährigen Frau, die auf Grund eines Zystadenokarzinoms des Pankreasschwanzes partiell pankreatektomiert worden war. Anschließend wurden die Zellen durch Transduktion mit

einem Retrovirusvektor, der das E6- und das E7-Gen des humanen Papillomavirus (HPV) 16 trägt, immortalisiert [21]. Die dadurch gewonnene Zelllinie wird unter dem Namen HPDE6c7 geführt. Sie dient als *in-vitro*-Modell für benignes, humanes Pankreasgangepithel, da sie einen nahezu normalen Phäno- und Genotyp einer pankreatischen Gangzelle aufweist (siehe **Tabelle 1, Seite 38 f.**). So zeigen HPDE-Zellen die Morphologie und das Wachstumsverhalten von normalen kultivierten Epithelzellen. Sie wachsen adhärent in einer Einzelschicht von polygonalen Zellen und sind durch TGF- β 1 in ihrem Wachstum hemmbar [22]. Weiterhin exprimieren sie mRNA der typischen Pankreasgangepithel-Marker Carbonanhydrase II, MUC-1, sowie Cytokeratin 2, 7, 8, 14, 18 und 19. Der selektierte HPDE6c7-Klon behält in mehr als 35 Passagen seine Morphologie und Wachstumseigenschaften [21]. Ferner exprimieren HPDE6c7-Zellen niedrige Level von Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- α sowie von Wachstumsrezeptoren wie HER2/neu/erbB2-Rezeptor oder HGF-Rezeptor [22]. Darüberhinaus weisen HPDE6c7-Zellen keine der genetischen Veränderungen auf, die im Zusammenhang mit der Progression des PDAC beschrieben sind. So exprimieren sie Wildtypcodons 12, 13 und 61 des K-ras-Gens, das beim PDAC am häufigsten und frühesten verändert ist. Weiterhin findet man in HPDE6c7-Zellen einen unveränderten Genotyp der Tumorsuppressorgene TP 53 und p16^{INK4A} [23]. Da jedoch das durch die Transduktion mit dem HPV 16 exprimierte E6-Protein mit p53 assoziiert und dessen Degradierung fördert, ist p53 nur in geringer Menge in der Zelle vorhanden, was zu einer Inaktivierung des p53-Signalwegs führt. Ferner ist durch den haploiden Verlust des Tumorsuppressorgens Rb1 sowie durch die Präsenz des E7-Proteins das p110/Rb Protein nicht detektierbar. Offenbar scheint aber die Kontrolle des G1-Kontrollpunktes im Zellzyklus durch das p130/Rb2 Protein teilweise erhalten zu bleiben. Trotz zusätzlicher chromosomaler Veränderungen zeigen die HPDE6c7-Zellen über zahlreiche Passagen einen stabilen Karyotyp und haben sich über einen Zeitraum von 6 Monaten als nicht tumorigen in SCID-Mäusen erwiesen [21]. Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften ist die Zelllinie HPDE6c7 insgesamt als *in-vitro*-Modell für benigne Pankreasgangzellen geeignet.

1.3 Apoptose und Funktion der Caspasen

Überzählige oder veränderte Zellen werden im lebenden Organismus durch Apoptose (programmierter Zelltod) beseitigt. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod erhalten. Apoptose ist ein aktiver, genetisch determinierter Prozess, der zum Absterben von Einzelzellen meistens ohne begleitende Entzündungsreaktion

führt. Verschiedene Krankheiten beruhen auf einem Defekt im Apoptoseprogramm. So sind neurodegenerative Erkrankungen mit einer gesteigerten Apoptose verbunden, die Entstehung von Neoplasien wird hingegen durch eine verminderte Apoptose, u.a. durch einen umfassenden Schutz vor Apoptoseinduktion, begünstigt [24].

Ist die Apoptose initiiert, externalisiert die Zelle zunächst Phosphatidylserin. Dies befindet sich normalerweise an der Innenseite der Zellmembran und dient auf der Außenseite als Apoptosesignal. In Folge kommt es zur Zellschrumpfung, Ausstülpung der anfangs intakten Zellmembran sowie zur Kondensation und Fragmentierung des Kernchromatins. Schließlich werden membranbegrenzte und Phosphatidylserin-markierte Vesikel abgeschnürt, von phagozytierenden Zellen erkannt und phagozytiert [25].

Kernstück der Apoptose ist ein kaskadenartig aktivierbares System von Caspasen. Diese Proteasen haben Cystein im aktiven Zentrum und spalten nach Aspartat (Cysteinyl-Aspartat spezifische Protease, Caspase). Caspasen werden als inaktives Zymogen (Procaspase) exprimiert. Sie bestehen aus einer Prodomäne, sowie einer großen und einer kleineren Untereinheit und erhalten durch proteolytische Spaltung ihre aktive Form. Die Hälfte der vierzehn Säugetier-Caspasen ist an der Apoptose beteiligt. Dabei werden Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden. Die Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9, und 10) besitzen eine lange Prodomäne, die Sequenzen enthält, über die sie mit Adapterproteinen interagieren oder andere Caspasen aktivieren können. Ferner verfügen sie über autokatalytische Aktivität. Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) hingegen haben eine kurze Prodomäne und können nur durch andere Caspasen aktiviert werden [26].

Apoptose kann auf unterschiedlichen Wegen initiiert werden, wobei die beiden folgenden, der extrinsische und der intrinsische Weg, am besten beschrieben sind. Der extrinsische Weg (Apoptosetyp I) führt über die extrazelluläre Bindung von Todessignalen an Todesrezeptoren, der intrinsische Weg (Apoptosetyp II) über die intrazellulär lokalisierten Mitochondrien. Auch bei Todesrezeptor-vermittelter Apoptose spielen Mitochondrien zur Signalverstärkung eine Rolle. Todesrezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Familie. Diese ist durch ihre intrazelluläre Todesdomäne charakterisiert. Sobald Liganden aus der TNF-Familie an die membranständigen Todesrezeptoren wie Fas-Rezeptor und TNF- α -Rezeptor binden, rekrutiert die Todesdomäne ein intrazelluläres Adapterprotein, das zusammen mit der Procaspase 8 einen Todessignal-induzierenden Komplex bildet. In Typ I-Zellen reicht die am Todessignal-induzierenden Komplex aktivierte Menge an Caspase 8 aus, um genügend Effektorcaspasen zu aktivieren und damit die Apoptose zu initiieren. Typ II-Zellen, zu denen auch Pankreaszellen gehören, benötigen zur Amplifikation des Signals zusätzlich Mitochondrien

[27]. Mitochondrien werden über Bid-Protein, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, aktiviert. Bid wird von Caspase 8 gespalten und transloziert in das Mitochondrium. Dadurch wird Cytochrom c aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma freigesetzt, wo es mit Apaf-1, ATP und Procaspase 9 das Apoptosom bildet. Die im Apoptosom aktivierte Caspase 9 prozessiert die Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Die Effektorcaspasen aktivieren sich gegenseitig und starten damit eine Kaskade von Caspasen. Schließlich führt die Spaltung zellulärer Substrate durch die Effektorcaspasen zu den typischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle. Bei intrazellulären Apoptosesignalen wie Zellschädigung durch Zytostatika, Entzug von Wachstumsfaktoren oder Verlust des Kontaktes zur extrazellulären Matrix wird die Apoptose durch direkte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien initiiert. Dabei unterliegt die Cytochrom c-Freisetzung der Regulation von Proteinen aus der Bcl-2-Familie [28, 29].

1.4 Zytostatika-induzierte Apoptose und Apoptoresistenz in Tumorzellen

Zytostatika lösen in ihren Zielzellen Apoptose aus. Dabei verläuft die Zytostatika-induzierte Apoptose abhängig vom Zelltyp und Zytostatikum über den extrinsischen oder den intrinsischen Apoptose-Signalweg. Die Mehrheit der Zytostatika induziert jedoch den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg [30].

Auf unterschiedliche Weise können sich Tumorzellen der Zytostatikawirkung entziehen. So kann beispielsweise die Aufnahme des Zytostatikums in die Tumorzelle vermindert sowie der Metabolismus oder die Elimination des Zytostatikums gesteigert sein. Auch eine verstärkte Reparatur Zytostatika-geschädigter DNA oder ein zugunsten der Tumorzelle deregulierter Zellzyklus verringern die Zytostatikawirkung [31, 32]. Weiterhin stellt der Schutz vor Zytostatika-induzierter Apoptose einen wichtigen Mechanismus dar, über den sich Tumorzellen der Wirkung von Zytostatika entziehen. Diese Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (= Chemoresistenz) kann u.a. durch eine verminderte Aktivierung oder eine veränderte Regulation der Caspasen bedingt sein. Eine verminderte Aktivierung der Caspasen über den extrinsischen Signalweg entsteht beispielsweise durch Expression löslicher Todesrezeptoren, durch Herunterregulation membranständiger Todesrezeptoren oder durch Mutation von Todesrezeptor-Genen mit nachfolgendem Funktionsverlust des Todesrezeptors [33, 34]. Eine verstärkte Expression antiapoptotischer Moleküle oder eine verringerte Expression proapoptotischer Moleküle führt ebenfalls zu einer reduzierten Caspaseaktivität. So wird die Bindung und Aktivierung von Procaspase 8 am Todessignal-

induzierenden Komplex durch das antiapoptotische Molekül FLIP blockiert. Mutationen des proapoptotischen Bax-Proteins, das Cytochrom c aus dem Mitochondrium freisetzt, sowie Hochregulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x, die die Aktivierung und Translokation von Bax ins Mitochondrium hemmen, verhindern die Initiierung des mitochondrialen Signalwegs [24]. Bereits aktivierte Caspasen können beispielsweise durch vermehrte Expression von Proteinen der IAP-Familie oder durch Stickstoffmonoxid (NO) über eine verstärkte S-Nitrosylierung inhibiert werden [35, 36].

1.5 Einfluss der epigenetischen Regulation der Caspasenexpression auf die Apoptoseresistenz

Ursache der Apoptoseresistenz von Tumorzellen kann ferner eine verminderte Caspasenexpression sein. Neben der posttranslationalen Regulation der Caspasenexpression durch Proteine der IAP-Familie (XIAP und cIAPs) [35, 37] sind nach neueren Erkenntnissen auch epigenetische Mechanismen beteiligt. Neben der Histon-Acetylierung und -Methylierung umfassen diese Mechanismen reversible – d.h. nicht durch Mutationen bedingte – Modifikationen der DNA selbst, die u.a. zu einer verminderten Expression von Genen führen. Eine häufige epigenetische Modifikation der DNA ist die Hypermethylierung bestimmter DNA-Abschnitte. Dabei wird durch Methylierung der DNA die Genexpression ohne Veränderung der Nukleotidsequenz reguliert. Die Methylierung erfolgt postreplikativ und wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) vermittelt. Von den fünf beim Menschen bekannten DNMTs sind die DNMT1, welche das Methylierungsmuster während der Replikation weitergibt, sowie die DNMT3 A und B als de novo Methyltransferasen die bisher am besten untersucht sind [38]. Die Methylierung erfolgt an beiden komplementären DNA-Strängen am Cytosin des Dinukleotids CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanosin). Etwa 70-80% aller CpG-Sequenzen des menschlichen Genoms sind methyliert [39]. Unmethylierte CpG-Sequenzen sind vorwiegend in Abschnitten mit einer erhöhten CpG-Häufigkeit, sogenannten CpG-Inseln lokalisiert. Diese liegen bevorzugt im Promotorbereich von Genen. Hypermethylierung dieser CpG-Inseln sind mit der transkriptionellen Inaktivierung der betroffenen Gene, dem sogenannten *gene silencing*, assoziiert [40]. Besonders in Tumoren sind eine Reihe von Wachstum regulierenden Genen einem *gene silencing* unterzogen, so dass z.B. auch die Expression von Tumorsuppressorgenen wie p16^{INK4A} oder Rb hiervon häufig betroffen ist. Desweiteren wurde inzwischen ein *gene silencing* auch von

Caspasegenen für verschiedene Tumorzelllinien und Tumorgewebe beschrieben [41-44], was entsprechend zu einer verminderten Apoptosefähigkeit führt.

Auf Grund dieser vielfältigen Modulation von Proliferation und Apoptose spielt die DNA-CpG-Methylierung eine bedeutende Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren [45], u.a. auch in PDAC-Primärtumoren und deren Zelllinien [46]. Entsprechend exprimieren PDAC, aber auch andere Tumoren vermehrt DNMT1, 3A und B [47, 48].

1.6 Einfluss des Transkriptionsfaktors Stat1 auf die Caspasenexpression und Apoptoresistenz

In vielen Tumoren sind die Transkriptionsfaktoren Stat1, 3 und 5 konstitutiv exprimiert [49-53], wobei in Plattenepithelkarzinomen eine verminderte Expression von Stat1 gefunden wurde [54].

STAT-Proteine (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) sind an nahezu jedem Zytokin-abhängigen Signalweg beteiligt. Ihre Funktion liegt vor allem in der Regulation von Genen, die der Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung und der Apoptose dienen [55]. Im Zytoplasma werden die STAT-Proteine durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert. Meist geschieht dies durch Zytokinrezeptor-assoziierte Kinasen (Januskinase, JAK) oder durch Wachstumsfaktor-assoziierte Kinasen. Daneben werden die STAT-Proteine auch von nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Abl oder Scr phosphoryliert [56]. Nach Phosphorylierung kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung der STAT-Proteine. Die aktivierten Dimere translozieren in den Kern, um dort als Transkriptionsfaktoren zu wirken.

Bei Säugetieren besteht die STAT-Proteinfamilie aus den 7 Mitgliedern Stat1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6. Während Stat3 und 5 die Zellzyklusprogression sowie die zelluläre Transformation zu fördern scheinen und als Tumorpromotoren gelten, ist Stat1 an der Vermittlung von Zellzyklusarrest beteiligt. Neben dieser antiproliferativen Funktion kann Stat1 proapoptotisch wirken und wird daher als Tumorsuppressor angesehen [52, 56, 57].

Bei verschiedenen Tumorerkrankungen ist eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Stat1 mit einer besseren Prognose für die Patienten assoziiert [54, 58, 59]. Weiterhin ist Stat1 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulation und Expression von Caspasen [60, 61]. Entsprechend kann auch das Fehlen von transkriptionell aktivem Stat1 zu einer verminderten Caspasenexpression führen [62, 63].

1.7 Fragestellung der Arbeit

Das PDAC hat die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Tumoren. Durch das fortgeschrittene Krankheitsstadium bei Diagnose und die ausgeprägte Resistenz gegenüber Zytostatika ist die Behandlung erschwert. Dabei scheinen sowohl die Akkumulation genetischer Mutationen als auch der Einfluss der umgebenden Stromazellen (im PDAC vor allem Myofibroblasten) zur malignen Transformation der pankreatischen Gangzelle zur Karzinomzelle beizutragen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Veränderungen pankreatische duktale Gangzellen, d.h. noch untransformierte Zellen, in Gegenwart von Myofibroblasten erfahren und wie diese Veränderungen zur intrinsischen Chemoresistenz beitragen.

Als *in-vitro* Modell für nicht-neoplastische Pankreasgangepithelzellen wurde die aus benignem, humanem Pankreasgewebe isolierte Zelllinie HPDE6c7 verwendet. Die HPDE6c7-Zellen wurden bis zu sechs Wochen in Monokultur und parallel dazu in Cokultur mit murinen Pankreasmyofibroblasten in einem Transwell-Cokultursystem kultiviert. Folgende Parameter wurden untersucht:

1. Sensitivität der mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen gegenüber Zytostatikabehandlung mit Etoposid bzw. Gemcitabine
2. Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 in mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen
3. Einfluss des DNA-Methylierungsinhibitors 5-Azadeoxycytidin auf die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 und die Chemoresistenz in mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen
4. Expression von Stat1 und DNMT1 sowie deren Einfluss auf die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 und die Chemoresistenz in mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen

2. Material

2.1 Isolierung und Expansion muriner Pankreasmyofibroblasten

Brutschrank CO ₂ Incubator BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
Calciumchlorid-Lösung 10 mM	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kanüle Sterican 24 gauge, 0,55x22 mm ²	B. Braun, Melsungen
Mausstamm C57 BL/6	Harlan-Winkelmann, Borchon
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Omnilab, Hamburg
PBS steril	PAA Laboratories, Cölbe
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SBTI	Sigma-Aldrich Chemie, München
Spritze 1ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Langenselbold
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Cölbe
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturpetrischale 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb Nylon 100 µm Porengröße	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.2 Immunzytochemische Charakterisierung der murinen Pankreasmyofibroblasten

BSA	Serva, Heidelberg
Deckgläschen	Menzel Gläser, Braunschweig
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol 100%	Merck, Darmstadt
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
SuperFrost Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
6-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht

Primärantikörper	Spezies/Isotyp/Klon	Hersteller
anti- α -SMA	Maus/IgG2a/1A4	Sigma-Aldrich Chemie, München
anti-Desmin	Kaninchen/polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie, München
anti-Vimentin	Ziege/polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie, München

Sekundärantikörper und Detektionssysteme	Hersteller
Biotin-SP-konjugiertes Esel-anti-Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
Biotin-SP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
EnVision System anti-Maus	DAKO Diagnostika, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
Peroxidase Substrat Kit DAB	Vector Laboratories über Alexis, Grünwald

2.3 Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7-Zelllinie)

Spezies	Name	Herkunft	Referenz
human	HPDE6c7	benignes Pankreasgangepithel	Ming-Sound Tsao, Universität Toronto

2.4 Zellkultur

2.4.1 Medien und Medienzusätze

DMEM low glucose Medium	PAA Laboratories, Cölbe
EGF	Life Technologies, Eggenstein
FCS	Biochrom, Berlin
Gentamicin 100 μ g/ml	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
HEPES-Puffer 1 M	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Keratinozyten-SFM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories, Cölbe
Penicillin-Streptomycin 100 U/ml, 100 μ g/ml	Biochrom, Berlin
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Eggenstein
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories, Cölbe

2.4.2 Sonstige Materialien und Geräte für die Zellkultur

Brutschrank CO ₂ Incubator BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Ethanol 70%, vergällt	Walter, Kiel
Einkanal-Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson International, Bad Camberg
Gasbrenner	Integra Biosciences, Schweiz
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Minishaker MS 2	IKA Werke, Staufen
Pasteurpipette Glas 230 mm	Assistent, Sondheim
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipet-Boy	Integra Biosciences, Schweiz
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilbank	Kendro, Langenselbold
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Transwelleinsatz	Corning Costar, Bodenheim
Transwell Clear Polyester Membrane, 24 mm Durchmesser, 0,4 µm Porengröße	
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Cölbe
6-Well-Platte	Corning Costar, Bodenheim
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.4.3 Substanzen für die Behandlung der Zellen

5-Azadeoxycytidin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Etoposid	Bristol-Myers Squib, München
Gemcitabine	Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg

2.5 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer GalaxyArgon Plus DakoCytomation, Hamburg
Software FLOMAX DakoCytomation, Hamburg

2.5.1 Detektion von α -SMA und Cytokeratin 18 mittels FACS

BSA Serva, Heidelberg
Glycin Merck, Darmstadt
Natriumchlorid Mallinckrodt Baker, Niederlande
PBS PAA Laboratories, Cölbe
PFA Merck, Darmstadt
Saponin Sigma-Aldrich, München
Tris Base Biomol, Hamburg
Trypsin/EDTA 1x PAA Laboratories, Cölbe
Zentrifuge Labofuge Function Line 400 Heraeus Instruments, Hanau

Antikörper-Konjugat	Spezies/Isotyp/Klon	Herkunft
anti- α -SMA-Cy3	Maus/IgG2a/1A4	Sigma-Aldrich Chemie, München
anti-Cytokeratin 18-FITC	Maus/IgG1/Ks18.04	Acris Antibodies, Hiddenhausen

2.5.2 Apoptoseanalyse mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung

AnnexinV Binding Buffer 1x Becton Dickinson, Heidelberg
AnnexinV-FITC Becton Dickinson, Heidelberg
Dead Cell Discriminator (PI) Caltag Laboratories, Hamburg
PBS PAA Laboratories, Cölbe
Röhrchen 3,5 ml; 15 ml Sarstedt, Nümbrecht
Sheath Puffer DakoCytomation, Hamburg
Trypsin/EDTA 1x PAA Laboratories, Cölbe
6-Well-Platte Corning Costar, Bodenheim
Zentrifuge Labofuge Function Line 400 Heraeus Instruments, Hanau

2.6 Caspase-3/-7-Assay

Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, Mannheim
Luminometer Micro Lumat Plus	Berthold Technologies, Bad Wildbad
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Röhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Trypsin/EDTA 1x	PAA Laboratories, Cölbe
96-Well-Platte weiß ummantelt	Falcon über BD Biosciences, Hamburg
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.7 Proteintechniken

2.7.1 Herstellung von Kernextrakten

Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES-Puffer 1 M	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, München
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttler Tumbling Table	Biometra, Göttingen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.7.2 Herstellung von Ganzzelllysaten

Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
SDS	Biomol, Hamburg
Sonicator Sonopuls	Bandelin, Berlin

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tris Base	Biomol, Hamburg
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz

BSA	Serva, Heidelberg
DC-Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories, München
Microtest Plate 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Photometer Ophys MR	Dynex Technologies, USA
Software Revelation QuickLink	Dynex Technologies, USA

2.7.4 Einstellen des Proteingehalts der Proben

Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
β -Mercaptoethanol	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DTT	Biomol, Hamburg
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES-Puffer 1 M	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, München
SDS	Biomol, Hamburg
Tris Base	Biomol, Hamburg

2.7.5 SDS-Gelelektrophorese

Elektrophoresekammer XCell SureLock	Invitrogen, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
MultiMark Multi-Colored Standard 1x	Invitrogen, Karlsruhe
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen

Prestained SDS-Page Standards Low Range	Bio-Rad Laboratories, München
ProGel-Tris-Glycin-Gel 4-20%	Anamed, Darmstadt
SDS	Biomol, Hamburg
Tris Base	Biomol, Hamburg

2.7.6 Western Blot

6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
Blotkammer Fastblot	Biometra, Göttingen
Filterpapier Whatman 3MM	Biometra, Göttingen
Methanol 100%	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Netzgerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Transfermembran Immobilon-PVDF	Millipore, USA
Tris Base	Biomol, Hamburg
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München

2.7.7 Immunnachweis der Proteine

BSA	Serva, Heidelberg
ChemiDoc XRS	Bio-Rad Laboratories, München
LumiGlo Lösung	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Schüttler Tumbling Table	Biometra, Göttingen
Software Quantity One	Bio-Rad Laboratories, München
SuperSignal West Dura	Pierce Perbio Science, Bonn
Tris Base	Biomol , Hamburg
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München

Primärantikörper	Spezies/Isotyp/Klon	Hersteller
anti-Caspase 3	Kaninchen/polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Caspase 7	Kaninchen/polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Caspase 8	Maus/monoklonal/1C12	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Caspase 9	Kaninchen/polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Carbonanhydrase II	Kaninchen/polyklonal	Chemicon/Millipore, Schwalbach
anti-DNMT1	Ziege/polyklonal N-16	Santa Cruz, Heidelberg
anti-E-Cadherin	Kaninchen/polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-HSP 90 α/β	Kaninchen/polyklonal H-114	Santa Cruz, Heidelberg
anti-SP100 (PEP2)	Kaninchen/polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
anti-STAT1	Kaninchen/monoklonal/42H3	Cell Signaling, Frankfurt a. M.
anti-Vimentin	Maus/IgG1/V9	Santa Cruz, Heidelberg

Sekundärantikörper	Spezies/Isotyp	Hersteller
anti-Kaninchen-HRP	Ziege/IgG polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Maus-HRP	Pferd/IgG polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Ziege-HRP	Esel/IgG polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg

2.8 RNA-Techniken

2.8.1 RNA-Isolierung

β -Mercaptoethanol	Biomol, Hamburg
Ethanol 70%, 100%	Merck, Darmstadt
Mikrozentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
PBS	PAA Laboratories, Cölbe
Photometer GeneQuant II	Pharmacia Biotech, Freiburg
QIAshredder	Qiagen, Hilden
Ribonuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Labofuge Function Line 400	Heraeus Instruments, Hanau

2.8.2 Herstellung von cDNA

dATP	Roche Applied Biosystems, Weiterstadt
dCTP	Roche Applied Biosystems, Weiterstadt
dGTP	Roche Applied Biosystems, Weiterstadt
dTTP	Roche Applied Biosystems, Weiterstadt
M-MLV-5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo (dT) 15 Primer	Promega, Mannheim
Ribonuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
RNAsin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge PicoFuge	Stratagene, Amsterdam, Niederlande

2.8.3 Echtzeit-PCR

Adhesive PCR Film Clear	Abgene, Hamburg
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
Ribonuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Software iCycler iQ Optical System	Bio-Rad Laboratories, München
Thermocycler iCycler MyiQ, Single ColorReal-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, München
96-Well PCR-Platten	Corning Costar, Bodenheim

Primer	Vorwärtsprimer, Rückwärtsprimer, Hersteller
β-Aktin-Primer	Vorwärtsprimer 3': CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC Rückwärtsprimer 5': ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG Hersteller: BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Caspase 3-Primer	Vorwärtsprimer 3': TGC CAC AGT CCA GTT CTG TAC C Rückwärtsprimer 5': TGG TAC AGA TGT CGA TGC AGC Hersteller: Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching
Caspase 7-Primer	Vorwärtsprimer 3': CAT CTT TGT CTG TTC CGT TTC GAA C Rückwärtsprimer 5': CTA CCG CCG TGG GAA CGA TG Hersteller: Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching

Caspase 8-Primer	Vorwärtsprimer 3':	TGT GAA AGT AGG CTG AGG CAT CTG
	Rückwärtsprimer 5':	TGA GCT GAC ATC TCA GTT CAC TGT
	Hersteller:	Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching
Caspase 9-Primer	Vorwärtsprimer 3':	CTG GCT CGG GGT TAC TGC CAG
	Rückwärtsprimer 5':	GGC TGT CTA CGG CAC AGA TGG
	Hersteller:	Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching
Stat1-Primer	Rückwärtsprimer 5':	AAG GTG GCA GGA TGT CTC GTG
	Rückwärtsprimer 5':	TGG TCT CGT GTT CTT CTG TTC TG
	Hersteller:	Biometra, Göttingen

2.9 Transfektion

Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
pcDNA3.1 Kontrollplasmid	Invitrogen, Karlsruhe
Stat1-Plasmid	selbst hergestellt durch PCR-basierte Klonierung
Stealth DNMT1 siRNA	Invitrogen, Karlsruhe
Stealth RNAi Negative Control	Invitrogen, Karlsruhe

3. Methoden

3.1 Isolierung und Expansion muriner Pankreasmyofibroblasten

Die in der Cokultur verwendeten Pankreasmyofibroblasten wurden aus Pankreata von weiblichen Mäusen des Stammes C 57 BL/6 isoliert.

Zunächst wurden die Tiere mit CO₂ narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Mit 1 ml Spritzen und 24 gauge Kanülen wurde Blut aus dem Herzen der Mäuse entnommen und durch Zentrifugation des geronnenen Blutes das Serum gewonnen. Die Pankreata wurden entfernt, in ein 50 ml Röhrchen mit sterilem PBS und 2 µM Trypsininhibitor SBTI überführt und auf Eis gelagert. Portionsweise wurden die Pankreata mit einem Skalpell in 2x2x2 mm³ große Gewebestücke zerschnitten. Auf einer Kulturpetrischale wurden in einem Abstand von 1 cm je 1 µl 10mM CaCl₂-Lösung und 1 µl murines Serum zu einem Tropfen vermengt. Auf jeden Tropfen wurde ein Gewebestück aufgebracht. In der folgenden 30-minütigen Koagulationszeit verband sich das Gewebestück fest mit dem Untergrund. Jede Kulturpetrischale wurde anschließend mit 12 ml Expansionsmedium, bestehend aus DMEM low glucose, 20% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin, 0,2% Gentamicin und 1% Hepes-Puffer befüllt und bei 37°C, 5% CO₂-Atmosphäre und 85% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Mediumwechsel mit Expansionsmedium erfolgte zweimal wöchentlich.

Waren nach etwa 3 Wochen genug Pankreasmyofibroblasten aus den Gewebestücken migriert, wurde das Expansionsmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA sowie mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund gelöst. Die Suspension aus Pankreasmyofibroblasten und Gewebestücken wurde durch ein Zellsieb gegeben und die durchgefilterten Pankreasmyofibroblasten 10 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert und die Pankreasmyofibroblasten in einer Neubauer Zählkammer gezählt. 5x10⁵ Zellen wurden für die weitere Expansion in 10 ml Medium mit einem FCS-Anteil von 20% in eine 75 cm³ Zellkulturflasche ausgesät und kultiviert. Für die weitere Verwendung in Versuchen wurden die Pankreasmyofibroblasten in Medium mit einem FCS-Anteil von 10% kultiviert.

3.2 Immunzytochemische Charakterisierung der murinen Pankreasmyofibroblasten

Vor der Cokultivierung mit der Zelllinie HPDE6c7 wurde der myofibroblastische Phänotyp der isolierten Pankreasmyofibroblasten durch Anfärbung von α -SMA, Vimentin und Desmin bestimmt.

In jedem Well einer 6-Well-Platte wurden auf einem runden Deckgläschen 1×10^5 Pankreasmyofibroblasten in 2 ml Fibroblastenmedium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Überschichten mit eiskaltem 100% Methanol für 10 Minuten bei -20°C auf den Deckgläschen fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS folgte eine 30-minütige Blockierung in 4% BSA in PBS in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Vor der Inkubation mit den Erstantikörpern wurde einmalig und zwischen den folgenden Antikörperinkubationen 3x5 Minuten mit PBS gewaschen.

Alle Erstantikörper wurden in 4% BSA in PBS verdünnt, für die α -SMA-Färbung im Verhältnis 1:500, für die Vimentin-Färbung 1:400 und für die Desmin-Färbung 1:200. Die Inkubation mit den Erstantikörpern erfolgte bei 4°C über Nacht. Als Zweitreagenz für die α -SMA-Färbung diente ein Tropfen EnVision Konjugat anti-Maus-Peroxidase. Die Vimentinfärbung und die Desminfärbung wurden mit Biotin-gekoppelten, 1:200 in PBS verdünnten Zweitantikörpern inkubiert. Für die Vimentinfärbung wurde ein Esel-anti-Ziege-Zweitantikörper und für die Desminfärbung ein Ziege-anti-Kaninchen-Zweitantikörper benutzt. Die Inkubation mit allen Zweitreagenzien erfolgte für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die Präparate mit Biotin-gekoppelten Antikörpern wurden dann für 45 Minuten mit 1:500 in PBS verdünnter Streptavidin-Peroxidase inkubiert und 3x5 Minuten mit PBS gewaschen. Parallel dazu wurden Kontrollfärbungen durchgeführt, die nur mit den Zweitantikörpern inkubiert wurden. Zur Kontrolle der Spezifität der α -SMA-Färbung wurde die Färbung nur mit einem Maus-IgG2 α -Kontroll-Antikörper durchgeführt. Alle Kontrollfärbungen zeigten keine bzw. nur eine sehr schwache Färbung.

Die Substratreaktion für Peroxidase wurde mit dem Peroxidase Substrat Kit DAB nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate 10 Minuten in Leitungswasser gewaschen. Es folgte die 1-minütige Kernfärbung in 1:2 in Wasser verdünnter Hämalaunlösung und das 15-minütige Bläuen der Zellkerne unter fließendem Leitungswasser. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit angewärmter Glyceringelatine bedeckt und auf Objektträgern befestigt.

Antikörper und Detektionssysteme für die immunzytochemische Charakterisierung der murinen Pankreasmyofibroblasten

Primärantikörper	Blockierung	Anwendung	Sekundärantikörper	Anwendung	Detektionssystem
anti- α -SMA	4% BSA in PBS, RT, 30 min	1:500 in 4% BSA in PBS, 4°C, ü.N.	-	-	EnVision anti-Maus Peroxidase nach Herstellerangaben
anti-Vimentin	4% BSA in PBS, RT, 30 min	1:400 in 4% BSA in PBS, 4°C, ü.N.	Biotin-SP-konjugiertes Esel-anti-Ziege IgG	1:200 in PBS, RT, 45 min	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS, RT, 45 min
anti-Desmin	4% BSA in PBS, RT, 30 min	1:200 in 4% BSA in PBS, 4°C, ü.N.	Biotin-SP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:200 in PBS, RT, 45 min	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS, RT, 45 min

3.3 Humane Pankreatische Duktale Epithelzelllinie (HPDE6c7-Zelllinie)

Die Zelllinie HPDE6c7 ist eine mit dem E6- und dem E7-Gen des humanen Papillomavirus 16 immortalisierte Zelllinie aus humanem, benignem Pankreasgangepithel.

Sie wurde von Ming-Sound Tsao, Ontario Cancer Institute/Princess Margaret Hospital, University Health Network, und dem Department of Medical Biophysics und dem Department of Laboratory Medicine and Pathobiology der University of Toronto zur Verfügung gestellt.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Alle Zelllinien und Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 85% kultiviert.

3.4.2 Medien und Zusätze

Als Medium für die Zelllinie HPDE6c7 wurde RPMI 1640 Medium und Keratinozyten-SFM zu gleichen Teilen gemischt und mit 5% FCS, 0,5% L-Glutamin, 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt und 5 ng/ml EGF versetzt. Für die Pankreasmyofibroblasten wurde DMEM low Glucose (1 g Glucose/l) mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin, 0,2% Gentamicin und 1% HEPES-Puffer ergänzt.

3.4.3 Kultivierung der Zellen

Die Zelllinie HPDE6c7 und die murinen Pankreasmyofibroblasten wurden in FCS mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Inkulturnahme wurden Aliquots bei 37°C aufgetaut und mit dem entsprechendem Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute (U/min) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert, die Zellsuspension in eine 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank kultiviert.

Bei einer Zellkonfluenz von 80% wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5 bis maximal 10 Minuten abgelöst. Mit 5 ml des entsprechenden Kulturmediums wurde die Reaktion gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1500 U/min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert. Die HPDE6c7-Zellen und die Pankreasmyofibroblasten wurden in einem Faktor von 1 zu 3 geteilt. In jede 75 cm² Zellkulturflasche wurden 10 ml Kulturmedium vorgelegt, die Zellen neu ausgesät und in der Folgezeit zweimal wöchentlich passagiert.

3.4.4 Cokultur der Zelllinie HPDE6c7 mit murinen Pankreasmyofibroblasten

Die HPDE6c7-Zellen wurden über einen Zeitraum von mindestens einer bis maximal sechs Wochen in Monokultur und parallel dazu in Cokultur mit murinen Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Dadurch waren Mono- und Cozellen zu jedem Zeitpunkt eine identische Zeitspanne in Kultur. Jede Woche wurden die Zellen passagiert, für die Versuche neu ausgesät und aufgearbeitet. Um gezielt den Einfluss löslicher Faktoren auf den Erwerb eines chemoresistenten Phänotyps der HPDE6c7-Zellen zu untersuchen, wurde für die Cokultur mit murinen Pankreasmyofibroblasten ein Transwell-Cokultursystem benutzt. In diesem Kultursystem können zwei verschiedene Zellarten im gleichen Milieu ohne direkten Zellkontakt kultiviert werden. Dabei wird je ein Transwell in ein Well einer 6-Well-Platte gesetzt, wodurch das 6-Well in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt wird. Durch den Boden des Transwells, der aus einer Membran mit 0,4 µm großen Mikroporen besteht, ist ein Austausch löslicher Faktoren, aber kein direkter Zell-Zellkontakt möglich.

Die cokultivierten Zellen wurden über die Dauer des laufenden Versuchs aus den entsprechenden Wells der Cokultur neu ausgesät. Dafür wurden in jedes 6-Well 1×10^5

HPDE6c7-Zellen in 2 ml Kulturmedium gegeben, in jedes Transwell $2,5 \times 10^5$ Pankreasmyofibroblasten in 1,5 ml Fibroblastenmedium. Das Medium in beiden Kompartimenten wurde 24 Stunden nach Aussaat gewechselt und nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen aufgearbeitet oder weiterkultiviert.

Für die Passagierung wurden beide Zellkompartimente getrennt voneinander mit 1 ml Trypsin/EDTA pro Transwell bzw. 6-Well abgelöst, in Medium aufgenommen, zentrifugiert, gezählt und neu ausgesät. Die Transwells wurden in die 6-Wells gesetzt und die Cokultur parallel fortgeführt.

Die monokultivierten HPDE6c7-Zellen wurden über die Dauer eines Versuchsdurchgangs in Zellkulturflaschen gehalten. Für die Versuche wurden sie aus den Zellkulturflaschen in gleicher Zellzahl in 2 ml HPDE-Medium plus 1,5 ml Fibroblastenkulturmedium ausgesät und unter denselben Bedingungen wie Cozellen kultiviert.

3.5 Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

3.5.1 Prinzip der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Dabei werden aus einer Zellsuspension einzelne Zellen aufgenommen und in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl geleitet. Das Laserlicht wird durch die vorbeifließende Zelle zerstreut und das Vorwärtsstreulicht als Maß für die Größe, das Seitwärtsstreulicht als Maß für die Granularität der Zelle erfasst. Zusätzlich werden Fluorochrome durch den Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt. Daraufhin emittieren diese Licht einer bestimmten Wellenlänge. Ist eine Zelle mit einem Fluorochrom markiert, kann sie anhand des emittierten Lichts detektiert werden. Durch Verwendung Fluorochrom-konjugierter Antikörper können sowohl Oberflächenantigene als auch intrazelluläre Proteine der Zelle markiert werden. Dabei ist das emittierte Licht proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle.

3.5.2 Detektion von α -Smooth Muscle Actin und Cytokeratin-18 mittels FACS

Durch Detektion von Cytokeratin-18 als Epithel-spezifischem Antigen und α -SMA als Mesenchymalmarker wurden die HPDE6c7-Zellen im Durchflusszytometer phänotypisch charakterisiert.

In einer Zellkulturflasche mit 80% Zellkonfluenz wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA abgelöst, die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt und die Zellsuspension 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit 1 ml 2,5% PFA in PBS pro Pellet unter einem Abzug fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml Blockierlösung aus 0,1% BSA und 0,2% Glycin in TBS resuspendiert und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden wieder zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und jeweils mit 100 μ l 0,2% Saponin in Blockierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in je 1 ml Blockierlösung erfolgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-markierten Antikörper. Der Cytokeratin 18-FITC-Antikörper wurde im Verhältnis 1:5 in 0,2% Saponin in Blockierlösung eingesetzt, der α -SMA-Cy3-Antikörper im Verhältnis 1:400 in 0,2% Saponin in Blockierlösung. Pro Ansatz wurden 100 μ l Antikörperlösung verwendet und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die unbehandelten Proben wurden 100 μ l 0,2% Saponin in Blockierlösung eingesetzt. Anschließend wurden die Proben dreimal in Blockierlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde jede Probe in 1 ml PBS resuspendiert und schließlich mit dem GalaxyArgon Plus-Durchflusszytometer unter Gebrauch der Flomax Software analysiert.

TBS
20 mM Tris Base
140 mM NaCl
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}
pH 7,6

3.5.3 Apoptoseanalyse mittels FACS

3.5.3.1 Detektion apoptotischer Zellen durch AnnexinV-FITC und PI

In der lebenden Zelle befindet sich Phosphatidylserin an der Innenseite der Zellmembran, während des apoptotischen Zelltods wird es jedoch an die Außenseite loziert. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin und kann durch Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) durchflusszytometrisch detektiert werden. Parallel werden die Zellen mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt. Dieser dringt nur in Zellen mit defekter Zellmembran, also spätapoptotische und nekrotische Zellen ein. Nekrotische Zellen werden jedoch nur durch PI, nicht aber durch AnnexinV gefärbt.

3.5.3.2 Durchführung

Die HPDE6c7-Zellen wurden 22 h vor der Aufarbeitung mit 20 µg/ml Etoposid oder mit 5 µg/ml Gemcitabine stimuliert. Zur Aufarbeitung wurden zunächst bei den kokultivierten Zellen die Transwells mit den Myofibroblasten verworfen. Danach wurde das Medium aus den Wells der mono- und kokultivierten Zellen in 15 ml Röhren überführt. Die Wells wurden einmal mit PBS gespült und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann zu dem bereits vorliegenden Überstand in das 15 ml Röhren gegeben. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 5 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wurde in jedes Röhren 200 µl 1x Annexin Binding Buffer, 5 µl AnnexinV und 5 µl PI gegeben. Anschließend wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. 1 ml Sheath Puffer wurde in jedes FACS-Röhren vorgelegt, 100 µl Probe im Sheath Puffer resuspendiert und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt.

3.6 Caspase-3/-7-Assay

Neben der Bestimmung AnnexinV-positiver Zellen wurde als weiterer Parameter für Apoptose die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in einem Caspase-3/-7-Assay gemessen. Sind die Zellen apoptotisch, weisen sie eine erhöhte Aktivität der Caspasen auf. Nach Zugabe des Assaysubstrats wird durch dessen Caspase-abhängige Spaltung Luciferin frei und in der

nachfolgenden Luciferase-Reaktion umgesetzt. Das dabei emittierte Licht wird im Luminometer gemessen.

Mono- und cokultivierte Zellen wurden wie unter Punkt 3.4.4 beschrieben ausgesät und 22 Stunden vor Aufarbeitung mit 20 µg/ml Etoposid und/oder 72 Stunden vor Aufarbeitung mit 1 µmol/l 5-Azadeoxycytidin stimuliert. Transfizierte Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion stimuliert und ebenfalls 22 Stunden nach Stimulation aufgearbeitet. Zur Aufarbeitung wurde das Medium aus jedem Well mit einer Plastikpipette abgenommen und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin abgelöst, jedes Well mit 1 ml PBS gespült und die 2 ml Zellsuspension zu dem bereits vorliegenden Überstand in das 15 ml Röhrchen gegeben. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 U/min wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert. Mit Hilfe des FACS-Geräts wurde die Zellzahl in den Proben bestimmt. Für jede Probe wurden 25 µl Zellsuspension und 25 µl Substratlösung in ein Well einer weiß ummantelten 96-Well-Platte gegeben. Alle Proben wurden im doppelten Ansatz pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Lumineszenz der Proben im Luminometer gemessen. Dem Mittelwert jeder Probe entsprach die Caspaseaktivität der Probe. Diese wurde anschließend auf die ermittelte Zellzahl bezogen.

3.7 Proteintechniken

3.7.1 Herstellung von Kernextrakten

Kernextrakte wurden zur Detektion der nukleären Expression von DNMT1 und Stat1 mittels Westernblot benutzt.

Die Zellen wurden wie unter Punkt 3.4.4 ausgesät und stimuliert. Wurden die Zellen mit DNMT1-siRNA transfiziert, erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Transfektion, 8 Stunden nach Transfektion der Mediumwechsel und nach weiteren 54 Stunden die Aufarbeitung. Bei Stat1-transfizierten Zellen wurde 16 Stunden nach Transfektion das Medium gewechselt und 40 Stunden nach Transfektion aufgearbeitet. Für die Aufarbeitung wurden alle Materialien eisgekühlt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, jedes Well mit 2 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 200 µl Puffer I pro Well lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen aus den Wells gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet erneut in 200 µl Puffer I resuspendiert und wieder zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 50-80 µl Puffer II

resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 13.000 U/min wurden die Überstände, die alle nukleären Proteine enthalten, abgenommen und bei -80°C gelagert.

Puffer I	Puffer II
10 mM HEPES-Puffer pH 7,9	10 mM HEPES-Puffer pH 7,9
10 mM KCl	0,4 mM NaCl
0,2 mM EDTA pH 8,0	0,2 mM EDTA pH 8,0
1,0 mM DTT	1,0 mM DTT
0,5 mM PMSF	0,5 mM PMSF
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}
10 µg/ml Aprotinin (direkt vor Gebrauch)	10 µg/ml Aprotinin (direkt vor Gebrauch)

3.7.2 Herstellung von Ganzzelllysaten

Ganzzelllysate wurden zur Detektion der Caspasen 8, 9, 3 und 7 und zur Detektion von E-Cadherin, Carbonanhydrase II und Vimentin mittels Westernblot benutzt.

Das Medium wurde abgenommen und in jedes Well 200 µl Lämmli-Puffer gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers aus den Wells gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Thermoblock 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Lysate 10 Minuten auf Eis gelagert. Mittels Ultraschall wurden die Ganzzelllysate homogenisiert und schließlich bei -20°C eingefroren.

2x Lämmli-Puffer
128 mM Tris Base
4,6% (w/v) SDS
10% (v/v) Glycerol
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}
pH 7,6

3.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Reagenz

Die Proteinkonzentration der Kernextrakte und Ganzzelllysate wurde mit einem modifizierten Proteinassay nach Bradford gemäß Herstellerangaben bestimmt. Pro Ansatz wurden 5 µl der

Probe auf 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Die Inkubationszeit mit dem Reagenz betrug 15 Minuten. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 630 nm mittels eines Photometers bestimmt und die Proteinkonzentration gegenüber einer Standardreihe (0,18-1,44 µg BSA) ermittelt.

3.7.4 Einstellen des Proteingehalts der Proben

Für die Western Blot-Analyse wurden 6-10 µg Protein pro Probe eingesetzt. Jede Probe wurde durch Zugabe von Puffer II für die Kernextrakte und 2x Lämmli-Puffer auf das gleiche Probenvolumen von 10-25 µl bei gleichem Proteingehalt eingestellt. Zur Färbung der Proben wurde Bromphenolblau in einer Endkonzentration von 0,02% und β-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 2,5% zugefügt.

3.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli werden Proteine nach Denaturierung und Ladungsausgleich in einer aus Acrylamid- und Bisacrylamid-Untereinheiten bestehenden Matrix nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Innerhalb der Matrix besteht bei den verwendeten Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Fertiggelen ein Acrylamid-Gradient von 4-20%, so dass Proteine mit einem Molekulargewicht von 5-200 kDa aufgetrennt werden können.

Zunächst wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Geltaschen wurden mit den Proben und einem kommerziellen Proteinstandard zur Größenbestimmung der Proteine beladen und die Elektrophorese mit 125 V in vertikaler Richtung durchgeführt. Sobald die Lauffront aus dem Gel austrat, wurde die Gelelektrophorese gestoppt.

SDS-Gellaufpuffer
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.}

3.7.6 Western Blot

Nach Auftrennung des Proteingemisches über SDS-PAGE folgt der Transfer der Proteine im Semi-Trockenblot-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran.

Dazu wurde die PVDF-Membran 1-2 Minuten in Methanol eingelegt und anschließend mit aqua dest. gewaschen. Nach Ende der SDS-Page wurden 6 Stück Whatman-Papiere in Puffer A getaucht und auf die Anodenplatte gestapelt. Es folgten 3 Stück in Puffer B getauchte Whatman-Papiere und die PDVF-Membran. Das Gel wurde von den Gelplatten abgelöst, auf der Membran platziert und mit 6 Stück in Puffer C getränkten Whatman-Papieren bedeckt. Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und die Proteine in 45 Minuten auf die PVDF-Membran transferiert. Der zum Transfer benötigte Strom war abhängig von der Membrangröße (Strom (mA) = Länge (cm) x Breite (cm) x 1,25). Anschließend wurde die PVDF-Membran 5 Minuten in TBS-Tween gewaschen.

Puffer A	Puffer B	Puffer C
300 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol ad 1000ml H ₂ O _{bidest.} pH 11	25 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} pH 10,6	25 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} pH 8,8 0,5 g 6-Aminocaprinsäure pro 100 ml Puffer vor Gebrauch frisch dazugeben.

TBS-Tween
20 mM Tris Base 140 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 ad 1000 ml H ₂ O _{bidest.} pH 7,6

3.7.7 Immunnachweis der Proteine

Nach dem Transfer der Proteine im Semi-Trockenblot-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran folgt deren Detektion auf der Membran mittels Antikörper.

Dazu wurde die PVDF-Membran 2 Stunden mit 5% Magermilch in TBS-Tween (5% MM-TBS-T) abgesättigt und anschließend 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen. Der primäre Antikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben in 5% MM-TBS-T oder in 5% BSA in 0,05% TBS-Tween (5% BSA-TBS-T) verdünnt und die Membran mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten in TBS-Tween folgte die Inkubation mit dem sekundären, Peroxidasegekoppelten Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde in drei weiteren Waschgängen mit TBS-Tween entfernt.

Anschließend wurde die Membran 1 Minute bei Raumtemperatur mit einem Chemolumineszenz-Substrat inkubiert. Dabei katalysierte die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase die Umsetzung des Chemolumineszenz-Substrats in ein lumineszierendes Produkt. Die Lumineszenz wurde mittels einer Digitalkamera (ChemiDoc XRS, Biorad) festgehalten. Als Substrat wurden eine Luminol-haltige und eine Peroxid-haltige Lösung in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und direkt auf die Membran gegeben.

Zur semiquantitativen Bestimmung des Proteingehalts der Proben und als Ladekontrolle wurden das konstitutiv exprimierte Protein SP100 bzw. HSP90 detektiert.

Antikörper und ihre Anwendung im Western Blot

Primärantikörper	Anwendung des Primärantikörpers	Sekundärantikörper	Anwendung des Sekundärantikörpers
anti-Caspase 3	1:1000 in 5% MM-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1 h
anti-Caspase 7	1:1000 in 5% MM-TBS-T 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-Caspase 8	1:1000 in 5% BSA-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Maus	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-Caspase 9	1:1000 in 5% MM-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-Carbonanhydrase II	1:1000 in 5% BSA in PBS, 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h

anti-DNMT1	1:200 in 5% MM-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Ziege	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-E-Cadherin	1:1000 in 5% BSA-TBS-T, 4°C, RT	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-HSP 90 α/β	1:1000 in 5% MM-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-SP100 (PEP2)	1:5000 in 5% MM-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-Stat 1	1:1000 in 5% BSA-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% MM-TBS-T, RT, 1h
anti-Vimentin	1:200 in 5% MM-TBS-T, 4°C, ü.N.	anti-Maus	1:2000 in 5% MM-TBS-T RT, 1h

3.8 RNA-Techniken

3.8.1 RNA-Isolierung

Das Medium wurde aus den Wells abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS pro Well gewaschen. Danach wurde die Präparation der Gesamt-RNA mit einem RNA-Isolierungskit nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde in jedes Well 350 μ l RLT-Puffer und 10 μ l/ml β -Mercaptoethanol gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellsuspension wurde in eine Schredder-Zentrifugationssäule gegeben und 1 Minute bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 350 μ l 70% Ethanol in RNase freiem Wasser versetzt, die kompletten 700 μ l auf eine Zentrifugationssäule mit RNA-bindener Matrix gegeben und 1 Minute bei 10.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Eluat verworfen und die Zentrifugationssäule zunächst mit 700 μ l RW1-Puffer und dann zweimal mit 500 μ l RPE-Puffer, der 1:5 in 100% Ethanol verdünnt war, gewaschen.

Die RNA wurde nach Zugabe von 30 μ l Ribonuklease (RNase)-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 10.000 U/min eluiert und bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung der Konzentration der Gesamt-RNA wurde die RNA in RNase-freiem Wasser 1:40 verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge in einem UV-Photometer mit automatischer Quantifizierung gemessen.

3.8.2 Herstellung von cDNA

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird die zu einer RNA komplementäre DNA (*complementary DNA, cDNA*) hergestellt.

Dafür wurden pro Ansatz 2 µg RNA eingesetzt. Das benötigte RNA-Probenvolumen in Mikroliter wurde mit Ribonuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11,4 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 2 µl Oligo-dT-Primer (500 µg/ml) hinzugefügt, kurz gevortext und zentrifugiert. Die Proben wurden 5 Minuten bei 70°C im Thermomixer denaturiert und sofort 1 Minute auf Eis gestellt. Zur Probe wurden 11,6 µl Mastermix gegeben (Gesamtvolumen 25 µl), gevortext, zentrifugiert und 90 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Mastermix je Probe	
5 µl	M-MLV-5x First Strand Puffer
5 µl	dNTPs
	1,25 µl dATP (10 mM)
	1,25 µl dCTP (10 mM)
	1,25 µl dGTP (10 mM)
	1,25 µl dTTP (10 mM)
0,6 µl	RNasin RNase Inhibitor (40 U/µl)
1,0 µl	M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl)

3.8.3 Echtzeit-PCR

3.8.3.1 Prinzip

Durch die Echtzeit-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction, Real-Time PCR*) ist die Genamplifikation und die absolute und relative Quantifizierung des PCR-Produkts möglich. Es wird ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, dessen Fluoreszenz nach der Bindung an doppelsträngige DNA zunimmt. Mit jedem PCR-Zyklus steigt daher proportional zur amplifizierten Menge an Ziel-DNA die Fluoreszenz. Mit Hilfe optischer Detektionssysteme wird die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase jedes PCR-Zyklus gemessen und mittels geeigneter Computersoftware ausgewertet. Zur relativen Quantifizierung des Zielgens bedient man sich eines Referenzgens, das in allen Proben

konstant exprimiert ist und dessen Expression keine Unterschiede zwischen behandelten Proben und Kontrollproben aufweist. Das Referenzgen wird parallel zum Zielgen amplifiziert und die Genexpression des Zielgens auf das Referenzgen bezogen (= Normalisierung der Expressionsergebnisse).

Zunächst wird bei der Amplifikation des Zielgens für jede Probe derjenige Zyklus ermittelt, bei dem die Fluoreszenz des Zielgens die Hintergrundfluoreszenz signifikant überschreitet (= *Cycle Threshold*, C_t -Wert oder *Crossing Point*, *CP*). Die Zahl an PCR-Zyklen, die nötig sind, um dieses konstant definierte Fluoreszenzniveau (= Threshold-Fluoreszenz) zu erreichen, entspricht dem C_t -Wert. Am C_t -Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neusynthetisierter Menge DNA. Der C_t -Wert ist somit ein indirektes Maß für die eingesetzte Startmenge an DNA. Bei einer exakten Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus, d.h. einer Effizienz der PCR von 100%, ergibt sich zur relativen Quantifizierung des PCR-Produkts folgende Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta C_t \text{ Zielgen (Kontrolle-Behandlung)}} / 2^{\Delta C_t \text{ Referenzgen (Kontrolle-Behandlung)}}$$

Kontrolle = Probe aus der Monokultur
oder unbehandelte Probe aus der Cokultur

Behandlung = Probe aus der Cokultur
oder mit 5-Azadeoxycytidin behandelte Probe aus der Cokultur

Die Ratio bzw. der Quotient gibt den Faktor an, wieviel mehr (Ratio > 1) oder weniger (Ratio < 1) Ausgangskopien von dem gesuchten DNA-Abschnitt in der zu messenden Probe vorhanden sind.

3.8.3.2 Durchführung

Alle Proben wurden als Duplikate in 96-Well Platten pipettiert. Pro Probe wurden 2 µl cDNA mit 0,2 µmol/l des entsprechenden Primers versetzt, mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt und 15 µl Reaktionsgemisch (iQ SYBR Green Supermix), das den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green und alle essentiellen PCR-Reagenzien enthält, hinzugefügt. Die Platte wurde mit selbstklebender Folie verschlossen und die PCR in dem iCycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detektion System mit der iCycler iQ Optical System Software durchgeführt. Zur semiquantitativen Bestimmung der mRNA-Gehalte der

Proben erfolgte gleichzeitig eine PCR mit Primern für das konstitutiv exprimierte Kontrollgen β -Aktin nach Amplifikationsangaben des Herstellers.

Annealing-Parameter für die Caspasen 8, 9, 3 und 7

96°C/1 Minute

(94°C/1 Minute, 58°C/1 Minute, 72°C/1 Minute) für 40 Zyklen

72°C/10 Minuten

Annealing-Parameter für Stat1

94°/1 Minute

(94°/30 Sekunden, 62°/1 Minute, 72°/1 Minute) für 40 Zyklen

72°/10 Minuten

3.9 Transfektion

HPDE6c7-Zellen wurden transfiziert, um die Expression von DNMT1 zu unterdrücken bzw. rekombinantes Stat1 in den HPDE6c7-Zellen zu exprimieren.

3.9.1 Transfektion mit DNMT1-siRNA

Die Transwells mit den Myofibroblasten wurden entnommen und in 6-Well-Platten mit 2 ml HPDE6c7-Medium pro Well überführt. Aus den Wells mit den kokultivierten HPDE6c7-Zellen wurde das Medium abgesaugt und pro Well 2 ml frisches HPDE6c7-Medium hinzugefügt.

Für jedes Well wurden 100 μ l HPDE6c7-Medium ohne FCS, 12 μ l HiPerFect und 150 ng Stealth DNMT1 siRNA oder Stealth negative control siRNA angesetzt. Der Transfektionsansatz wurde vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise in die entsprechenden Wells gegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 8 Stunden wurde das Medium in den transfizierten Wells gewechselt, die Transwells mit den Myofibroblasten zu den transfizierten HPDE6c7-Zellen zurückgesetzt und die Kokultur für 54 Stunden weitergeführt.

3.9.2 Transfektion mit Stat1-Plasmid

Die Transwells wurden in 6-Well-Platten überführt und in jedes Well mit kokultivierten HPDE6c7-Zellen nach Absaugen des alten Mediums 1,8 ml frisches HPDE6c7-Medium gefüllt.

Anschließend wurden die HPDE6c7-Zellen durch Lipofektion (Effectene, Qiagen) mit dem Stat1-Plasmid transfiziert. Für jedes Well wurden dazu 0,6 µg Stat1-Plasmid oder 0,6 µg pcDNA3.1 Kontrollplasmid mit 8 µl Effectene Transfektionsreagenz in 200 µl HPDE6c7-Medium angesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 16 Stunden wurde das Medium erneuert und die Kokultur mit den Myofibroblasten für 40 Stunden fortgeführt.

3.10 Statistik

Alle Berechnungen wurden mit dem doppelseitigen t-Test durchgeführt. Als signifikant wurden dabei Ergebnisse mit $p < 0,05$ angesehen.

Es wurde das Statistikprogramm SISA verwendet: <http://home.clara.net/sisa/>

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der HPDE6c7-Zellen anhand der Expression von Cytokeratin 18, E-Cadherin, α -SMA, Vimentin und Carbonanhydrase II

Die Zelllinie HPDE6c7 wurde durch Tsao et al. bereits eingehend charakterisiert [21-23, 64]. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem die Expression der Epithelmarker Cytokeratin 18 und E-Cadherin, der Mesenchymalmarker α -SMA und Vimentin und des Pankreasgangepithelmarkers Carbonanhydrase II mittels Durchflusszytometrie bzw. Western Blot-Analyse geprüft (Punkt 3.5.2 bzw. 3.7.6 f.). Dabei zeigten sich die HPDE6c7-Zellen positiv für die Marker Cytokeratin 18, Carbonanhydrase II und E-Cadherin sowie negativ für α -SMA und Vimentin. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit, die umfassende Charakterisierung durch Tsao et al. [21] sowie der Vergleich der Zelllinie HPDE6c7 mit benignen Pankreasgangepithelzellen sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Insgesamt lässt sich folgern, dass HPDE6c7-Zellen phäno- und genotypisch normalen pankreatischen Gangepithelzellen weitgehend ähneln und keine der frühen Mutationen wie beispielsweise im K-ras-Gen oder p16 aufweisen, die mit der Entstehung und Progression des PDAC in Verbindung gebracht worden sind.

Tabelle 1: Vergleichende Charakterisierung der Zelllinie HPDE6c7 mit benignen Pankreasgangepithelzellen

untersuchte Marker	benigne Pankreasgangepithelzellen	Zelllinie HPDE6c7
Epithelzellmarker		
Cytokeratin 2, 7, 8, 9, 18, 19	+	+
Cytokeratin 14	+	++
E-Cadherin	+	+
Pankreasgangepithelzellmarker		
Carbonanhydrase II	+	+
MUC-1	+	+
Mesenchymmarker		
α -SMA	-	-
Vimentin	-	-

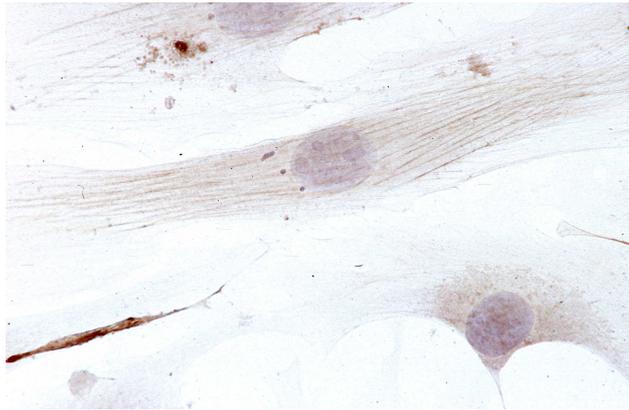
Proto-Onkogene		
K-ras Codon 12, 13, 61	Wt	Wt
c-myc	Wt	Wt
Tumorsuppressorgene		
p16 ^{INK4A}	Wt	Wt
TP53	Wt	Wt (niedrige Level durch E6)
DPC4	Wt	Wt
Rb1	Wt	Wt (niedrige Level durch E7+haploiden Genverlust)
Wachstumsfaktoren		
erbB2, TGF- α , VEGF, KGF	niedrige Level	niedrige Level
Wachstumsrezeptoren		
EGF-Rezeptor, HGF-Rezeptor	niedrige Level	erhöhte Level

4.2 Isolation und Expansion der murinen Pankreasmyofibroblasten sowie Charakterisierung mittels immunzytochemischer Färbung

Die in der Cokultur verwendeten Pankreasmyofibroblasten wurden aus Pankreata von weiblichen Mäusen des Stammes C 57 BL/6 unter sterilen Bedingungen isoliert (Punkt 3.1). Durch das beschriebene Verfahren der Pankreasentnahme und Expansion konnten selektiv Pankreasmyofibroblasten gewonnen werden.

Vor der Cokultivierung mit den HPDE6c7-Zellen wurde der myofibroblastische Phänotyp der isolierten murinen Pankreasmyofibroblasten mittels immunzytochemischer Färbung auf α -SMA sowie der mesenchymale Phänotyp mittels Färbung auf Desmin und Vimentin überprüft (Punkt 3.2). Wie in **Abbildung 1** zu sehen, waren die isolierten Pankreasmyofibroblasten für alle drei Markerproteine positiv.

a) Anti- α -SMA



b) Anti-Desmin



c) Anti-Vimentin

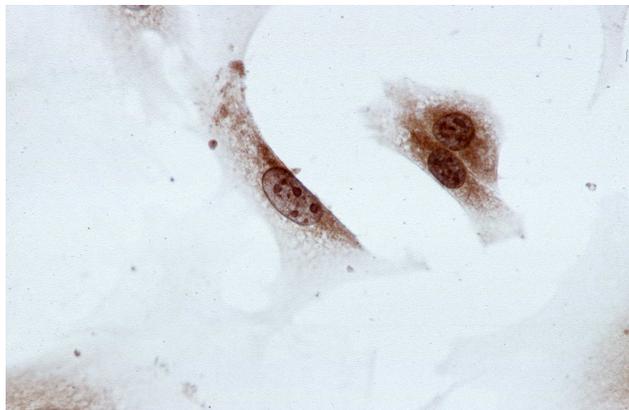


Abbildung 1:

Immunzytochemische Färbung der isolierten murinen Pankreasmyofibroblasten

a) gegen α -SMA, b) Desmin und c) Vimentin. Darstellung in 400-facher Vergrößerung.

4.3 Cokultur mit Pankreasmyofibroblasten führt zum Erwerb eines chemoresistenten Phänotyps in den HPDE6c7-Zellen

Kennzeichnend für das PDAC sind die ausgeprägte Chemoresistenz sowie eine starke desmoplastische Stromabildung. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob eine mehrwöchige Cokultur mit murinen Pankreasmyofibroblasten in den HPDE6c7-Zellen zum Erwerb eines chemoresistenten Phänotyps führt, wie es bereits für PDAC-Zelllinien unter diesen Bedingungen beschrieben wurde [16]. Als Maßstab für Chemoresistenz diente die Apoptoserate der HPDE6c7-Zellen nach einer Behandlung mit Etoposid bzw. Gemcitabine. Dazu wurden die Zellen wie unter Punkt 3.4.4 beschrieben ausgesät und eine bis maximal sechs Wochen kultiviert. Wöchentlich wurden mono- und cokultivierte HPDE6c7-Zellen mit 20 µg/ml Etoposid bzw. 5 µg/ml Gemcitabine stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Anzahl apoptotischer HPDE6c7-Zellen wurde 22 Stunden nach Stimulation mittels AnnexinV-FITC-/PI-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie (Punkt 3.5.3) oder mittels Caspase-3/-7-Assay und folgender Lumineszenzmessung im Luminometer bestimmt (Punkt 3.6). Dem Nachweis der apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie dienten ausschließlich AnnexinV-positive Zellen. Zur Ermittlung der Apoptoserate im Caspase-3/-7-Assay wurde die Behandlungs-induzierte Caspase-Aktivität (n-fach von basal) zugrunde gelegt.

Wie **Abbildung 2 a)** zeigt, reagierten während der 1. Woche der Kultur 33,9% der monokultivierten HPDE6c7-Zellen in der FACS-Analyse auf die zytostatische Behandlung mit Etoposid, hingegen nur 11,6% der cokultivierten HPDE6c7-Zellen. In der 6. Kulturwoche waren 37,6% der monokultivierten HPDE6c7-Zellen AnnexinV-positiv, in der Cokultur konnten jedoch nur 18,02% AnnexinV-positive Zellen detektiert werden. Vergleichbar waren die Befunde im Caspase-3/-7-Assay. Hier zeigten monokultivierte HPDE6c7-Zellen in der 1. Woche der Kultur eine 3,1-fache, cokultivierte HPDE6c7-Zellen hingegen nur eine 1,7-fache Caspaseaktivität nach Behandlung mit Etoposid. In der 6. Woche der Kultur konnte nach Stimulation mit Etoposid in monokultivierten HPDE6c7-Zellen eine 5,2-fache Caspaseaktivität, in cokultivierten HPDE6c7-Zellen hingegen nur eine 2,4-fache Caspaseaktivität beobachtet werden (**Abbildung 2 b)**).

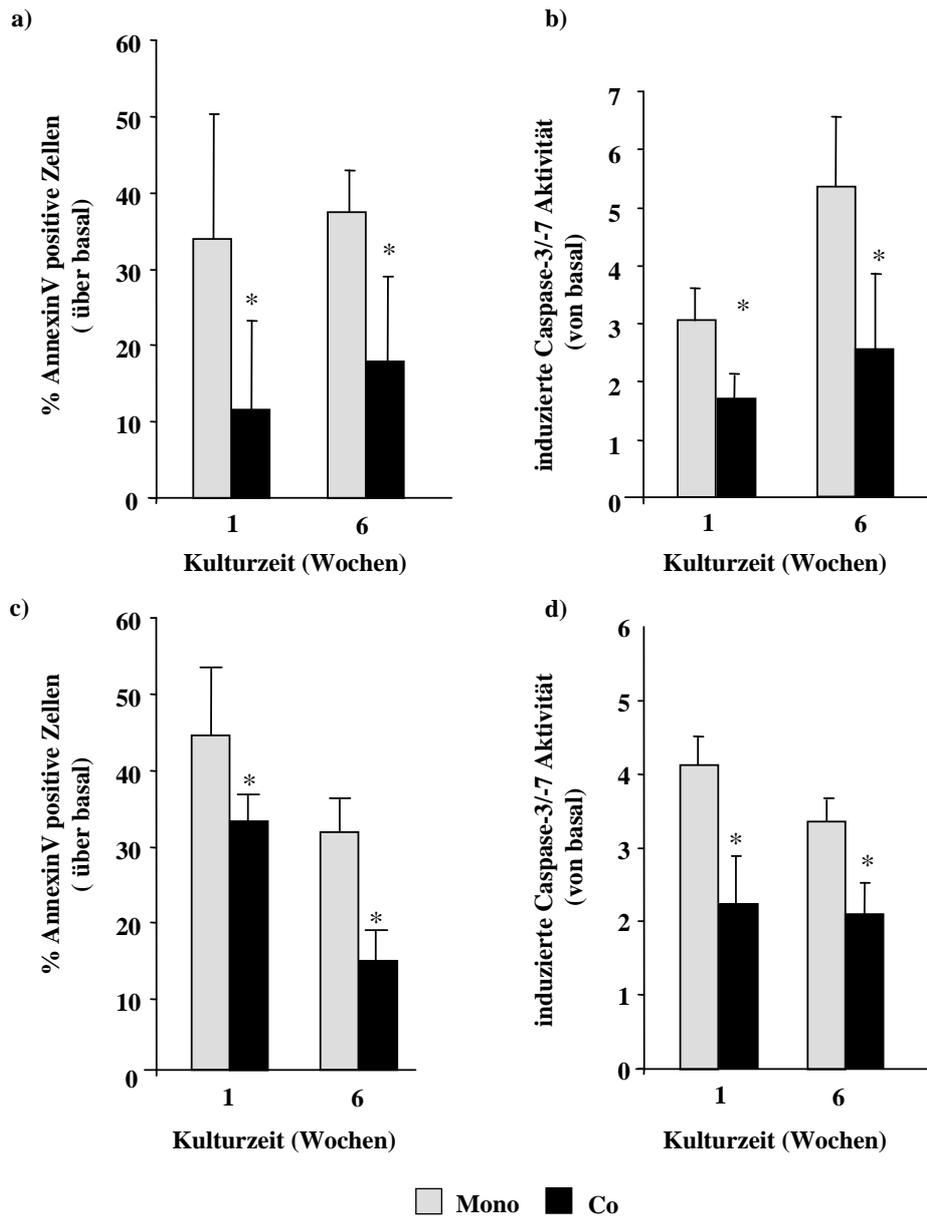


Abbildung 2:

HPDE6c7-Zellen erwerben in Gegenwart von Pankreasmyofibroblasten einen chemoresistenten Phänotyp

HPDE6c7-Zellen wurden entweder für eine oder sechs Wochen in Ab- (mono) oder Anwesenheit (Co) von Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Die Zellen blieben wöchentlich unbehandelt oder wurden mit 20 µg/ml Etoposid (Abb. 2 a+b) bzw. 5 µg/ml Gemcitabine (Abb. 2 c+d) stimuliert. Die Anzahl apoptotischer HPDE6c7-Zellen wurde 22 Stunden nach Stimulation durch a)+c) AnnexinV-FITC-/PI-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie oder b)+d) Caspase-3/-7-Assay und folgender Lumineszenzmessung im Luminometer bestimmt. Dem Nachweis der apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie dienen ausschließlich AnnexinV-positive Zellen. Zur Ermittlung der Apoptoserate im Caspase-3/-7-Assay wurde die durch die Behandlung induzierte Caspase-3/-7-Aktivität (n-fach von basal) zugrunde gelegt. Es sind die Mittelwerte ± SA von 3 bis 5 unabhängigen Versuchen dargestellt. Beispielhaft abgebildet sind die Wochen 1 und 6 der Kultur. * zeigt $p < 0,05$ im Vergleich Co gegen Mono.

Ähnliche Ergebnisse konnten nach Behandlung mit Gemcitabine erzielt werden. So wiesen mit Gemcitabine stimulierte, monokultivierte HPDE6c7-Zellen in der 1. Kulturwoche eine Apoptoserate von 47,1% auf, kokultivierte Zellen hingegen eine Apoptoserate von 32,5%, wie mittels FACS-Analyse bestimmt werden konnte. In der 6. Woche der Kokultur nahm die Anzahl der AnnexinV-positiven Zellen von 30% bei den monokultivierten auf 14,3% bei den kokultivierten Zellen ab (**Abbildung 2 c**). Im Caspase-3/-7-Assay zeigten Gemcitabine behandelte, monokultivierte HPDE6c7-Zellen in der 1. Kulturwoche eine 4,2-fache Caspaseaktivität, kokultivierte Zellen hingegen nur eine 2,3-fache Caspaseaktivität. In der 6. Woche der Kultur konnte in monokultivierten Zellen eine 3,3-fache Caspasenaktivität nach Stimulation mit Gemcitabine, in kokultivierten HPDE6c7-Zellen hingegen nur eine 2,1-fache Caspaseaktivität beobachtet werden (**Abbildung 2 d**).

Insgesamt präsentierten die kokultivierten HPDE6c7-Zellen gegenüber den monokultivierten HPDE6c7-Zellen nach Behandlung mit Etoposid bzw. Gemcitabine in der FACS-Analyse sowie im Caspase-3/-7-Assay stets eine signifikant niedrigere Apoptoserate. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Kokultur mit Pankreasmyofibroblasten in HPDE6c7-Zellen zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika führt.

4.4 Kokultur mit Pankreasmyofibroblasten vermindert in der Zelllinie HPDE6c7 die basale Caspasenexpression

Da bereits beobachtet werden konnte, dass die durch die Pankreasmyofibroblasten vermittelte Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen nicht durch eine nennenswerte Erhöhung von antiapoptotischen Molekülen wie XIAP, cIAP oder Bcl-2, wohl aber durch eine verminderte Expression von Caspasen bedingt zu sein scheint [65], sollte im weiteren Verlauf der Untersuchungen das Augenmerk auf diese Schlüsselenzyme der Apoptose-Signalkaskade gelegt werden. Da Zytostatika hauptsächlich über Induktion von Apoptose wirken, kann eine verminderte Caspaseexpression wiederum Ursache einer Zytostatikaresistenz sein [24, 27]. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst auf Proteinebene sowohl die Expression von zwei Initiatorcaspasen (Caspase 8, 9) als auch von zwei Effektorcaspasen (Caspase 7, 3) untersucht. Dabei wurden die Procaspasen, im Folgenden als Caspasen bezeichnet, in Ganzzelllysaten mittels Western Blot detektiert. Als Ladekontrolle diente HSP90.

Wie in **Abbildung 3** zu sehen, präsentierten kokultivierte HPDE6c7-Zellen gegenüber monokultivierten Zellen schon nach der ersten Woche der Kultur eine deutlich verminderte Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7. Dieser Unterschied war auch nach 6 Wochen Kultur noch zu beobachten.

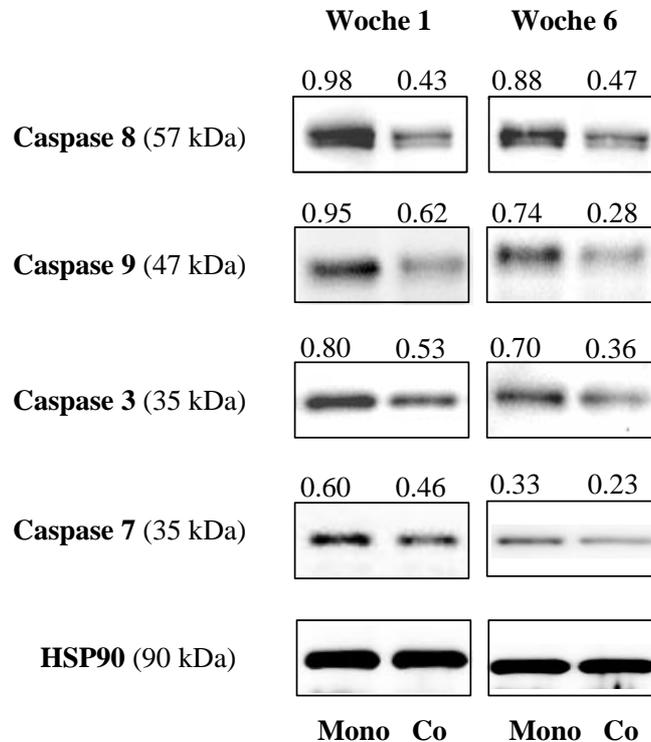


Abbildung 3:

Die Kokultur mit Pankreasmyofibroblasten vermindert in HPDE6c7-Zellen die basale Caspasen-expression

HPDE6c7-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume in Monokultur (Mono) oder in Kokultur (Co) mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Die Caspasen 8, 9, 3 und 7 sowie die Ladekontrolle HSP90 wurden in Ganzellysaten mittels Western Blot detektiert. Die Zahlen über den Banden repräsentieren die Bandenintensität, die durch densitometrische Analyse und folgende Normalisierung auf HSP90 ermittelt wurde. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch nach einer bzw. sechs Wochen Kultur. Insgesamt wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt.

Um die verminderte basale Caspasenexpression weiter aufzuklären, wurde die Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dazu wurde mRNA aus mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen isoliert (Punkt 3.8.1), revers transkribiert (Punkt 3.8.2) und die entstandene cDNA einer Echtzeit-PCR (Punkt 3.8.3) unterzogen.

Schon ab der 1. Kulturwoche wiesen kokultivierte HPDE6c7-Zellen gegenüber monokultivierten verminderte mRNA-Mengen der Caspasen 8, 9, 3 und 7 auf (**Abbildung 4**). Im Verlauf der Kultur nahmen die mRNA-Mengen in den kokultivierten Zellen weiter ab, so

dass nach 6 Kulturwochen die Expression aller untersuchten Caspasen in den kokultivierten Zellen im Vergleich zu den monokultivierten Zellen signifikant reduziert war.

Zusammenfassend deutet die in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen verminderte Expression der Caspasen und die parallel dazu verminderte Expression von Caspasen-mRNA auf eine transkriptionsbedingte Herunterregulation dieser apoptotischen Schlüsselenzyme hin.

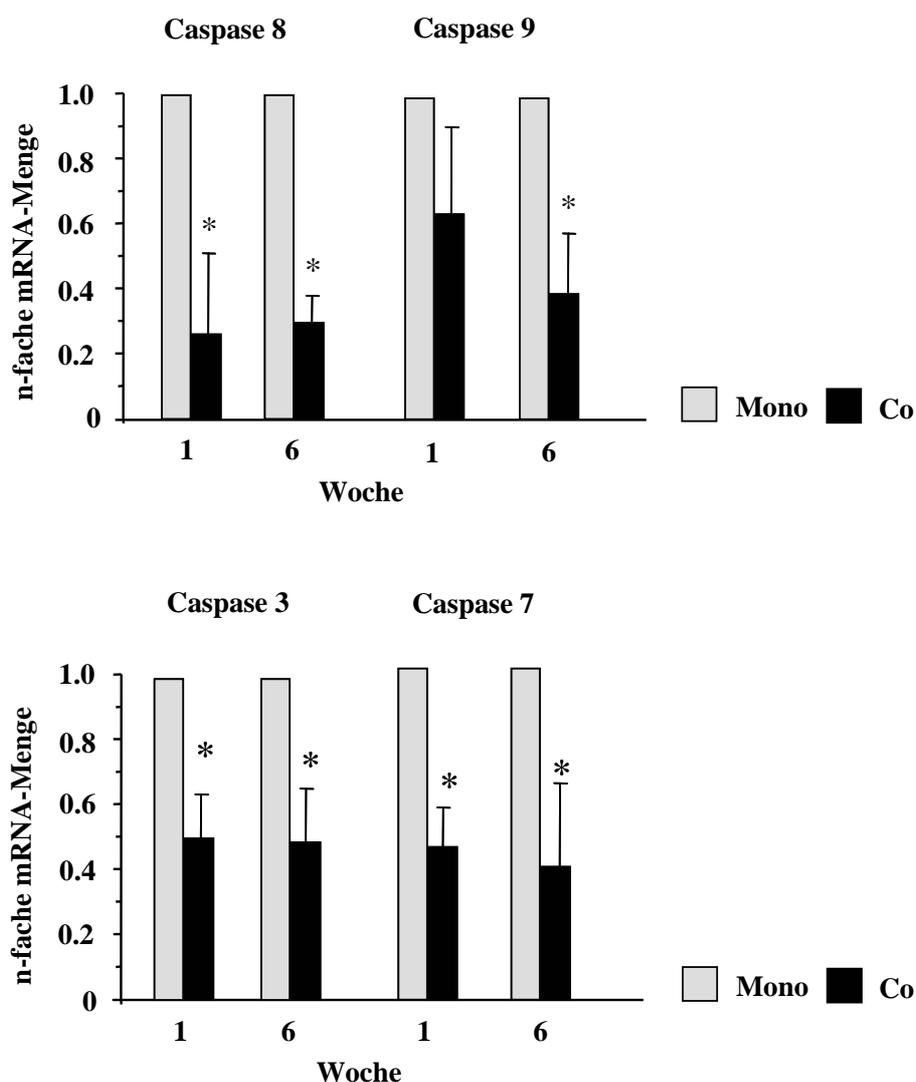


Abbildung 4:

Die Kokultur mit Pankreasmyofibroblasten vermindert in HPDE6c7-Zellen die basale Expression der Caspasen-mRNA

HPDE6c7-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume in Monokultur (Mono) oder in Kokultur (Co) mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Die Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 wurde durch Echtzeit-PCR analysiert. Die mRNA der Caspasen in mono- und kokultivierten Zellen wurden auf das Referenzgen β -Aktin normalisiert, anschließend erfolgte die Normalisierung der Caspase-mRNA der kokultivierten HPDE6c7-Zellen an die der monokultivierten Zellen. Alle Proben wurden als Duplikate pipettiert. Für die Gesamtauswertung wurden die Messungen von 3 unabhängigen Versuchen sowie deren Mittelwerte \pm SA für monokultivierte (Mono) und kokultivierte (Co) HPDE6c7-Zellen verwendet. * zeigt $p < 0,05$ im Vergleich Co zu Mono.

4.5 Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin steigert die Caspasenexpression und die Chemosensitivität in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Ursache einer transkriptionsbedingten Herunterregulation der Caspasenexpression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen können epigenetische Modifikationen der DNA sein. Zu den häufigen epigenetischen Modifikationen gehört das *gene silencing*, bei dem Gene ohne Veränderung der Nukleotidsequenz transkriptionell stillgelegt werden. Dies geschieht neben anderen Mechanismen durch Methylierung der betroffenen Gene im Bereich von CpG-Inseln. Durch Verwendung des DNA-Methylierungsinhibitors 5-Azadeoxycytidin sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob eine DNA-CpG-Hypermethylierung Ursache für die verminderte Expression der Caspasen in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen sein kann. Dazu wurden die Zellen wie unter Punkt 3.4.4 beschrieben ausgesät und über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen in Mono- bzw. Kokultur kultiviert. Die Zellen wurden dann entsprechend unbehandelt belassen oder 24 Stunden nach Aussaat sowie 24 Stunden vor der Aufarbeitung zu Ganzelllysaten (Punkt 3.7.2) mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin behandelt. Die Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 sowie die Ladekontrolle HSP90 wurden in den Ganzelllysaten mittels Western Blot detektiert.

Cokultivierte HPDE6c7-Zellen, die mit 5-Azadeoxycytidin behandelt wurden, zeigten gegenüber unbehandelten kokultivierten Zellen eine höhere Expression aller untersuchten Caspasen (**Abbildung 5**). In monokultivierten HPDE6c7-Zellen waren die Effekte weniger stark ausgeprägt, bei Caspase 9 zeigte sich sogar ein Rückgang der Expression. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine DNA-CpG-Hypermethylierung der Caspasegene selbst oder von Genen, die an der Expression oder Regulation von Caspasen beteiligt sind, Ursache für die verminderte Caspasenexpression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen sein kann.

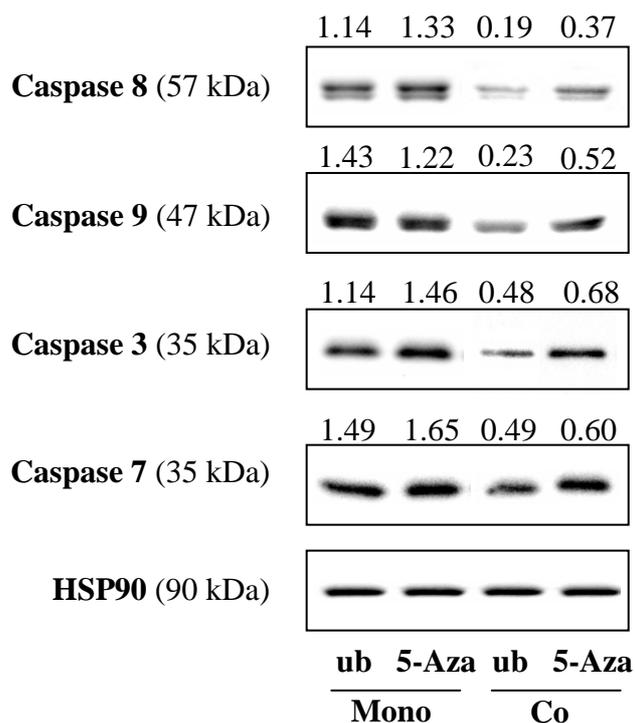


Abbildung 5:

Die Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin steigert die Caspasenexpression in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

HPDE6c7-Zellen wurden mindestens 2 Wochen in Monokultur (Mono) oder in Kokultur (Co) mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Die HPDE6c7-Zellen blieben unbehandelt (ub) oder wurden mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin (5-Aza) behandelt. Die Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 sowie die Ladekontrolle HSP90 wurde in Ganzellysaten mittels Western Blot detektiert. Die Zahlen über den Banden repräsentieren die Bandenintensität, die durch densitometrische Analyse und folgende Normalisierung auf HSP90 ermittelt wurde. Beispielhaft ist ein repräsentativer Versuch dargestellt. Es wurden 4 unabhängige Versuche durchgeführt.

Als nächstes wurde geprüft, ob durch Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin nicht nur die Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 gesteigert werden kann, sondern ob diese Behandlung auch zu einer Steigerung der Chemosensitivität der HPDE6c7-Zellen führt. Dazu blieben mono- und kokultivierte HPDE6c7-Zellen entweder unbehandelt oder wurden mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin behandelt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen weiterhin unbehandelt belassen oder zusätzlich mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid stimuliert. 22 Stunden später wurde der Caspase-3/-7-Assay zur Ermittlung der Apoptoserate durchgeführt (Punkt 3.6). Die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin allein hatte dabei keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen (Daten nicht gezeigt).

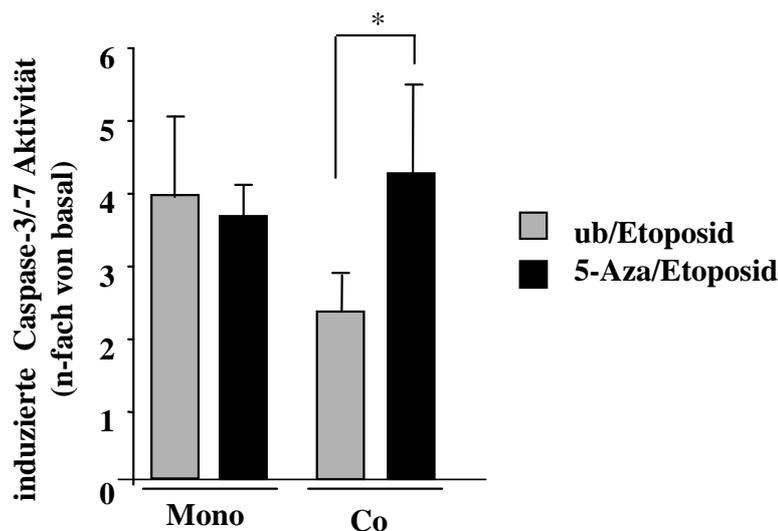


Abbildung 6:

Die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin steigert die Chemosensitivität in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

HPDE6c7-Zellen wurden mindestens 2 Wochen in Monokultur (Mono) oder in Cokultur (Co) mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Mono- und kokultivierte HPDE6c7-Zellen blieben entweder unbehandelt (ub) oder wurden mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin (5-Aza) behandelt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen weiterhin unbehandelt belassen oder zusätzlich mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Etoposid stimuliert. 22 Stunden später wurde der Caspase-3/-7-Assay durchgeführt. Zur Ermittlung der Apoptoserate wurde die Behandlungs-induzierte Caspase-3/7-Aktivität (n-fach von basal) zugrunde gelegt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA von 4 unabhängigen Versuchen. * zeigt $p < 0,05$ im Vergleich Co ub/Etoposid zu Co 5-Aza/Etoposid.

Waren die kokultivierten HPDE6c7-Zellen zusätzlich zu Etoposid mit dem DNA-Methylierungsinhibitor behandelt worden, stieg die Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Caspase-3/-7-Assay signifikant von 2,3 auf 4,2 (**Abbildung 6**). Bei monokultivierten HPDE6c7-Zellen war dieser Effekt hingegen nicht zu beobachten. Hier sank nach der Behandlung die Caspase 3/7 Aktivität leicht von 4 auf 3,8.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin zu einer verstärkten Caspasenexpression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen führt. Ferner resultiert die Behandlung mit dem DNA-Methylierungshemmer in einer Sensitivierung der kokultivierten HPDE6c7-Zellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung, was sich in der erhöhten Apoptoserate nach Etoposidbehandlung im Caspaseassay widerspiegelt.

4.6 Verminderte Expression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Die Tatsache, dass der Transkriptionsfaktor Stat1 an der Regulation von Caspasen beteiligt ist [60, 61] und die Beobachtung, dass in Plattenepithelkarzinomzellen die verminderte Stat1 Expression und das damit verminderte Ansprechen auf Zytostatika durch eine Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin erhöht werden kann [54, 66] führte zu der Hypothese, dass die verminderte Caspasenexpression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen durch eine reduzierte Stat1-Expression bedingt sein kann. In dieser Arbeit wurde daher die Expression von Stat1 in mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht. Die Zellen wurden wie unter Punkt 3.4.4 beschrieben ausgesät und kultiviert. Für die Detektion auf mRNA-Ebene wurde eine Echtzeit-PCR (Punkt 3.8.3) durchgeführt. Auf Proteinebene wurde Stat1 in Kernextrakten (Punkt 3.7.1) mittels Western Blot detektiert (Punkt 3.7.6 f.).

a)

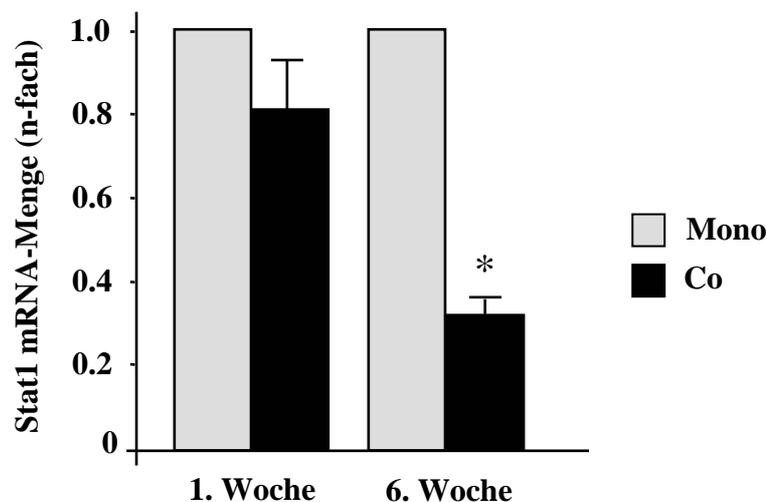


Abbildung 7: Die Stat1-Expression ist in kokultivierten HPDE6c7-Zellen vermindert

HPDE6c7-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume in Monokultur (Mono) oder in Cokultur (Co) mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert. a) Stat1-mRNA-Level wurden mittels Echtzeit-PCR ermittelt. Die mRNA Mengen der mono- und kokultivierten HPDE6c7-Zellen wurden auf das Referenzgen β -Aktin normalisiert. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Stat1-mRNA der kokultivierten HPDE6c7-Zellen an die der monokultivierten Zellen. Alle Proben wurden als Duplikate pipettiert. Für die Gesamtauswertung wurden die Messungen von 3 unabhängigen Versuchen sowie deren Mittelwerte \pm SA für monokultivierte (Mono) und kokultivierte (Co) HPDE6c7-Zellen verwendet. * zeigt $p < 0,05$ im Vergleich Co zu Mono.

b)

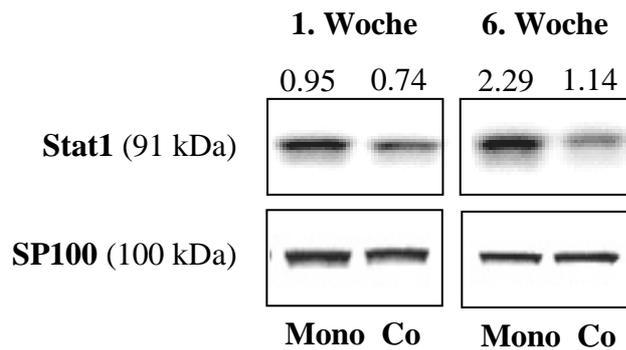


Abbildung 7: Die Stat1-Expression ist in kokultivierten HPDE6c7-Zellen vermindert

b) Die Expression von Stat1 sowie die Ladekontrolle SP100 wurden auf Proteinebene in Kernextrakten mittels Western Blot detektiert. Die Zahlen über den Banden repräsentieren die Bandenintensität, die durch densitometrische Analyse und folgende Normalisierung auf die Ladekontrolle SP100 ermittelt wurde. Ein repräsentativer Versuch von 3 unabhängigen Versuchen ist dargestellt.

Wie in **Abbildung 7 a) und b)** zu sehen, zeigten die kokultivierten HPDE6c7-Zellen gegenüber den monokultivierten HDPE6c7-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine verminderte Expression von Stat1. Weiterhin sank die Stat1 -Expression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen im Verlauf der Kultur, ähnlich wie es für die Caspasen beobachtet wurde.

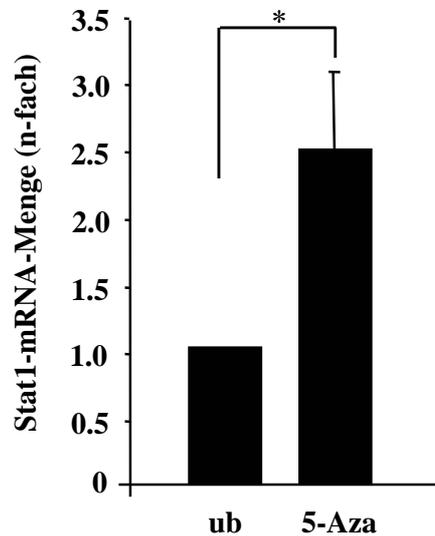
4.7 Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin steigert die Expression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Als nächstes sollte mit Hilfe von 5-Azadeoxycytidin geprüft werden, ob auch die verminderte Stat1-Expression in kokultivierten HPDE6c7-Zellen durch eine DNA-CpG-Hypermethylierung bedingt ist. Dazu wurden kokultivierte HPDE6c7-Zellen unbehandelt belassen oder 24 Stunden nach der Aussaat sowie 24 Stunden vor der Aufarbeitung mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin stimuliert. Dann erfolgte die Detektion von Stat1 auf mRNA-Ebene mittels Echtzeit-PCR (Punkt 3.8.3) und auf Proteinebene in Kernextrakten (Punkt 3.7.1) mittels Western Blot (Punkt 3.7.6 f.).

Gegenüber unbehandelten, kokultivierten HPDE6c7-Zellen präsentierten die mit 5-Azadeoxycytidin stimulierten kokultivierten HPDE6c7-Zellen sowohl eine deutlich gesteigerte Expression an Stat1-mRNA als auch an Stat1-Protein (**Abbildung 8**). Daraus lässt sich folgern, dass analog zur Expression der Caspasen auch die Herunterregulation der Stat1-

Expression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen durch eine DNA-CpG-Hypermethylierung bedingt zu sein scheint.

a)



b)



Abbildung 8:

Die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin steigert die Expression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

HPDE6c7-Zellen wurden für mindestens zwei Wochen mit Pankreasmyofibroblasten kokultiviert.

a) Kokultivierte HPDE6c7-Zellen blieben unbehandelt (ub) oder wurden mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin (5-Aza) behandelt. Die Stat1-mRNA-Mengen wurden durch Echtzeit-PCR ermittelt. Dabei wurden die mRNA-Mengen der unbehandelten sowie der behandelten Zellen an das Referenzgen β -Aktin normalisiert. Anschließend erfolgte die Normalisierung der mRNA-Menge der mit 5-Azadeoxycytidin behandelten HPDE6c7-Zellen an die der unbehandelten Zellen. Für die Gesamtauswertung wurden die Mittelwerte \pm SA von 3 unabhängigen Versuchen verwendet. * zeigt $p < 0,05$ im Vergleich Co unbehandelt zu Co+5-Aza.

b) Stat1 und die Ladekontrolle SP100 wurden in Kernextrakten von kokultivierten HPDE6c7-Zellen, die entweder unbehandelt blieben oder mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azadeoxycytidin behandelt wurden, mittels Western Blot detektiert. Die Zahlen über den Banden repräsentieren die Bandenintensität, die durch densitometrische Analyse und folgende Normalisierung an SP100 ermittelt wurde. Ein repräsentativer Versuch von 3 unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

4.8 Transfektion mit rekombinantem Stat1 vermindert die Chemoresistenz der kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Um zu demonstrieren, dass Stat1 an der Regulation der Caspasen und damit an der Chemoresistenz der kokultivierten HPDE6c7-Zellen beteiligt ist, wurden kokultivierte HPDE6c7-Zellen mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1 oder mit rekombinantem Stat1 transfiziert (Punkt 3.9.2). 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 20 µg/ml Etoposid stimuliert oder blieben unbehandelt. Weitere 22 Stunden später wurde der Caspase-3/-7-Assay durchgeführt und anschließend die Lumineszenz im Luminometer bestimmt (Punkt 3.6).

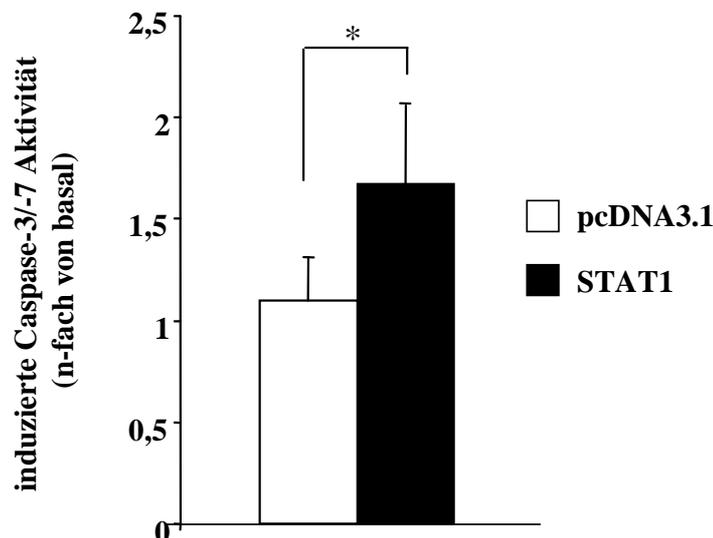


Abbildung 9:

Mit Stat1 transfizierte kokultivierte HPDE6c7-Zellen zeigen ein erhöhte Caspaseaktivität

HPDE6c7-Zellen wurden für mindestens zwei Wochen mit Pankreasmyofibroblasten kokultiviert und zusätzlich entweder mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1 oder mit rekombinantem Stat1 transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 20 µg/ml Etoposid stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach weiteren 22 Stunden wurde der Caspase-3/-7-Assay durchgeführt und anschließend die Lumineszenz im Luminometer bestimmt. Zur Ermittlung der Apoptoserate im Caspase-3/-7-Assay wurde die Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität (n-fach von basal) zugrunde gelegt. Für die Gesamtauswertung wurden die Mittelwerte \pm SA von 4 unabhängigen Versuchen verwendet. * zeigt $p < 0,05$.

Nach Behandlung mit Etoposid stieg in den mit Stat1 transfizierten kokultivierten HPDE6c7-Zellen die Caspase-3/-7-Aktivität gegenüber den mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1 transfizierten Zellen um 59% von 1,1 auf 1,7 (**Abbildung 9**). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Überexpression von Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen ähnlich wie die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin die Apoptoserate und somit die Chemosensitivität gegenüber der Etoposidbehandlung erhöht.

4.9 Erhöhte Expression der DNA-Methyltransferase 1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Epigenetische Modifikationen in Form von postreplikativer Methylierung der DNA werden durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) vermittelt. DNMTs sind in verschiedenen Tumorzelllinien und Tumoren überexprimiert [40]. So konnten z.B. im PDAC erhöhte Mengen an DNMT1 detektiert werden [48].

Um zu prüfen, ob die DNMT1-Expression auch in kokultivierten HPDE6c7-Zellen erhöht ist und ob sie vor allem im Kern, wo die DNMT1 ihre Funktion ausübt, lokalisiert ist, wurden mono- und kokultivierte HPDE6c7-Zellen wie unter Punkt 3.4.4 beschrieben ausgesät, wöchentlich zu Kernextrakten aufgearbeitet (Punkt 3.7.1) und die Expression von DNMT1 mittels Western Blot (Punkt 3.7.6 f.) detektiert.

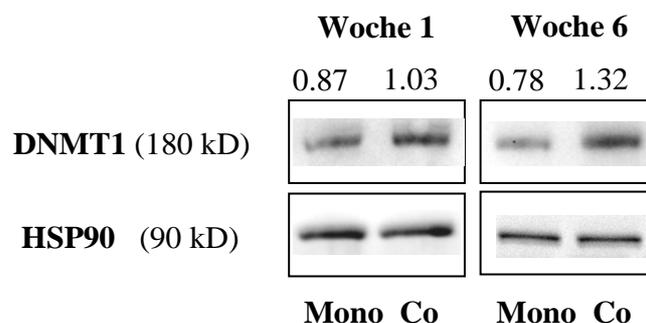


Abbildung 10:

Die nukleäre Expression von DNMT1 ist in kokultivierten HPDE6c7-Zellen erhöht

HPDE6c7-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume in Monokultur (Mono) oder in Kokultur (Co) mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert. Die Expression von DNMT1 sowie der Ladekontrolle HSP90 wurde in Kernextrakten mittels Western Blot detektiert. Die Zahlen über den Banden repräsentieren die Bandenintensität, die durch densitometrische Analyse und folgende Normalisierung an HSP90 ermittelt wurde. Dargestellt ist ein repräsentativer von 4 unabhängigen Versuchen.

Wie in **Abbildung 10** zu sehen ist, konnte in den Kernextrakten der kokultivierten HPDE6c7-Zellen eine stärkere DNMT1-Expression detektiert werden als in denen der monokultivierten Zellen. Im Verlauf der Kultur nahm die DNMT1-Expression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen noch weiter zu.

4.10 Einfluss der siRNA-vermittelten Unterdrückung der DNMT1-Expression auf die Expression von Stat1 und der Caspasen 8, 9, 3 und 7 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Zur Klärung der Frage, ob die erhöhte nukleäre Expression von DNMT1 in den kokultivierten Zellen die Transkription und damit die Expression von Stat1 sowie die der Caspasen beeinflusst, wurde die Expression und damit die Aktivität von DNMT1 mittels siRNA-Transfektion unterdrückt.

Dazu wurden HPDE6c7-Zellen für mindestens 2 Wochen kokultiviert und anschließend mit einer control siRNA oder einer DNMT1-spezifischen siRNA transfiziert (Punkt 3.9.1). Die Transfektionseffizienz wurde durch die Detektion von DNMT1 sowie der Ladekontrolle HSP90 in Kernextrakten (Punkt 3.7.1) mittels Western Blot (Punkt 3.7.6 f.) überprüft.

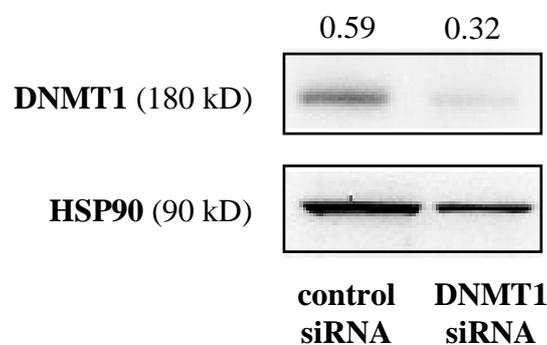


Abbildung 11:

Transfektion mit DNMT1 siRNA vermindert die DNMT1-Expression in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

HPDE6c7-Zellen wurden für mindestens 2 Wochen kokultiviert und zusätzlich entweder mit control siRNA oder mit DNMT1 siRNA transfiziert. Die Expression von DNMT1 sowie der Ladekontrolle HSP90 wurde in Kernextrakten mittels Westernblot detektiert. Es ist ein repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen gezeigt.

Durch Transfektion mit der DNMT1 siRNA konnte die Expression von DNMT1 in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen fast vollständig reduziert werden (**Abbildung 11**).

Anschließend wurden die aus den transfizierten Zellen gewonnenen Kernextrakte (Punkt 3.7.1) und Ganzzelllysate (Punkt 3.7.2) mittels Western Blot auf die Expression von Stat1 bzw. der Caspasen 8, 9, 3 und 7 untersucht. Als Ladekontrolle diente SP100 bzw. HSP90.

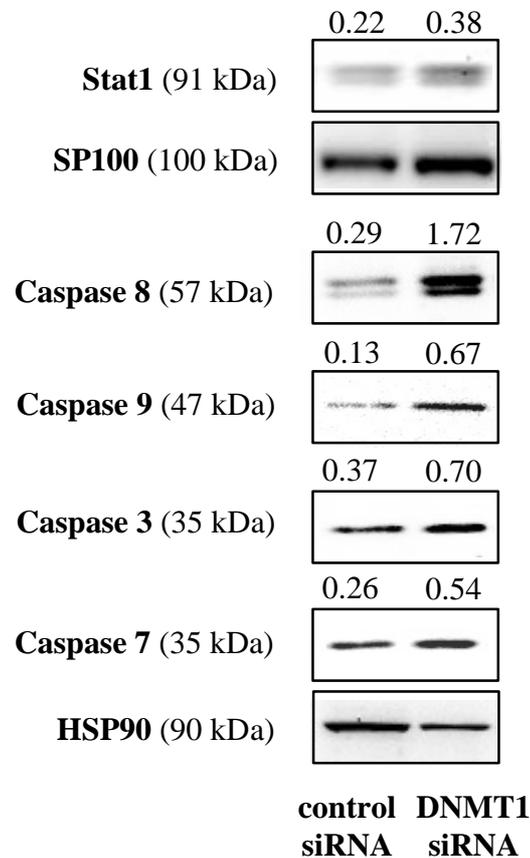


Abbildung 12:

Transfektion mit DNMT1 siRNA steigert die Expression von Stat1 und der Caspasen 8, 9, 3 und 7 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen

HPDE6c7-Zellen wurden für mindestens 2 Wochen kokultiviert und zusätzlich entweder mit control siRNA oder mit DNMT1 siRNA transfiziert. Kernextrakte wurden auf die Expression von Stat1 und Ganzzelllysate auf die Expression der Caspasen 8, 9, 7 und 3 mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrollen diente SP100 bzw. HSP90. Die Zahlen über den Banden repräsentieren die Bandenintensität, die durch densitometrische Analyse und folgende Normalisierung an SP100 bzw. HSP90 ermittelt wurde. Ein repräsentativer von 3 unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Wie in **Abbildung 12** dargestellt, führte die Unterdrückung der DNMT1-Expression zu einem Anstieg der Expression von Stat1 sowie der Caspasen 8, 9, 3 und 7 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen.

4.11 Transfektion mit DNMT1 siRNA vermindert die Chemoresistenz der kokultivierten HPDE6c7-Zellen

Um festzustellen, ob die siRNA-vermittelte Unterdrückung der DNMT1-Expression und die damit verbundene erhöhte Expression von Stat1 und der Caspasen zu einer gesteigerten Chemosensitivität in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen führt, wurden diese 24 Stunden nach Transfektion mit 20 µg/ml Etoposid stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach weiteren 22 Stunden wurde der Caspase-3/-7-Assay zur Bestimmung der Apoptoserate durchgeführt (Punkt 3.6).

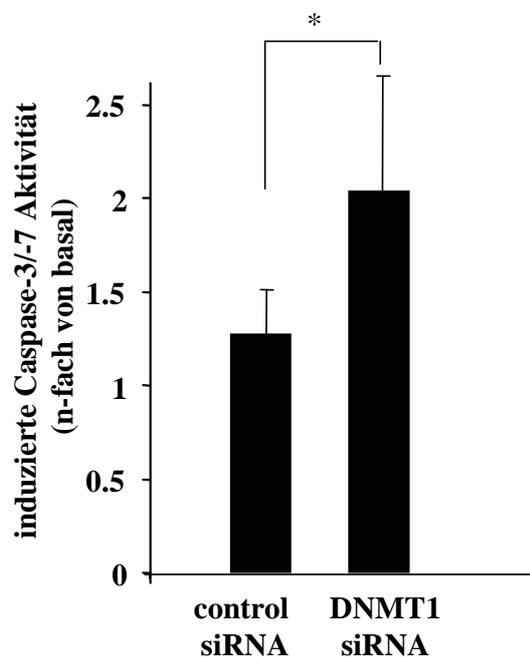


Abbildung 13:

Transfektion mit DNMT1 siRNA steigert die Chemosensitivität der kokultivierten HPDE6c7-Zellen

HPDE6c7-Zellen wurden für mindestens 2 Wochen kokultiviert und zusätzlich entweder mit control siRNA oder mit DNMT1 siRNA transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit 20 µg/ml Etoposid stimuliert. Nach weiteren 22 Stunden wurde der Caspase 3/7-Assay durchgeführt und anschließend die Lumineszenz im Luminometer bestimmt. Zur Ermittlung der Apoptoserate im Caspase 3/7-Assay wurde die Behandlungs-induzierte Caspase-3/-7-Aktivität (n-fach von basal) zugrunde gelegt. Für die Gesamtauswertung wurden die Mittelwerte \pm SA von 4 unabhängigen Experimenten verwendet. * zeigt $p < 0,05$.

Nach Behandlung mit Etoposid zeigten die mit DNMT1 siRNA transfizierten HPDE6c7-Zellen gegenüber den mit control siRNA transfizierten HPDE6c7-Zellen eine signifikant höhere Caspase-3/-7-Aktivität (**Abbildung 13**). Durch diese Behandlung konnte das

Ansprechen der Zellen auf eine Zytostatikabehandlung von 1,2 auf 2,1 um 75% gesteigert werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass durch die Unterdrückung der DNMT1-Expression in den kokultivierten HPDE6c7-Zellen die Apoptoserate und somit die Chemosensitivität gegenüber der Etoposidbehandlung erhöht werden kann.

5. Diskussion

Die Therapie des Pankreasadenokarzinoms (PDAC) ist bis heute kaum erfolgversprechend. Zum einen ist dies durch den hochmalignen Phänotyp und dem daraus folgenden, oft fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei Diagnosestellung bedingt, zum anderen wird die Behandlung dieses Tumors erheblich durch dessen ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapie erschwert.

Ausgehend von der benignen pankreatischen Gangzelle führt der stufenweise Erwerb genetischer Mutationen, wie beispielsweise im K-ras- oder p16-Gen, zur Entstehung der Pankreaskarzinomzelle. Als ein Risiko für die Entstehung eines PDAC gilt die chronische Pankreatitis. Sie ist - wie das PDAC - durch eine starke desmoplastische Stromabildung gekennzeichnet [2, 67, 68]. Dabei bilden aktivierte Pankreasfibroblasten, sogenannte Pankreasmyofibroblasten, den Hauptbestandteil des Stromas. Interaktionen zwischen Karzinom- bzw. Gangepithelzellen und den zellulären, aber auch nicht-zellulären Stromakomponenten können Einfluss auf verschiedene biologische Eigenschaften des PDAC haben, z.B. auf Wachstum, Invasionspotential und Metastasierung, Gefäßneubildung sowie Chemoresistenz [15, 16, 69].

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob bereits pankreatische Gangepithelzellen in Gegenwart von Pankreasmyofibroblasten Veränderungen erfahren, die zur intrinsischen, d.h. vor Therapiebeginn bestehenden Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose beitragen können.

In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Chemosensitivität von humanen PDAC-Zelllinien (z.B. PT45-P1 und T3M4) deutlich vermindert wird, wenn diese Zellen in einem Transwell-System zusammen mit murinen Pankreasmyofibroblasten kokultiviert werden [16]. Die Verwendung dieses Systems ermöglicht zum einen, gezielt den Einfluss löslicher Faktoren auf die Entstehung von Chemoresistenz zu untersuchen, zum anderen auch den Ursprung dieser sezernierten Faktoren hinsichtlich Tumor- (human) und der Stromakomponente (murin) auf Grund der Speziesunterschiede zuordnen zu können. Diese Versuchsanordnung war auch Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit, in denen die humane pankreatische Gangepithelzelllinie 6c7 (HPDE6c7) über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen in Monokultur und parallel dazu in Kokultur mit Pankreasmyofibroblasten kultiviert wurde. Die verwendeten Pankreasmyofibroblasten wurden frisch aus Mäusen isoliert (Punkt 3.1) und der

myofibroblastische Phänotyp vor jeder Kultur immunzytochemisch bestätigt (Punkt 3.2). Da der Stromaanteil des PDAC größer als der Tumoranteil ist, wurden die murinen Pankreasmyofibroblasten zu den Pankreasgangzellen in einem Verhältnis von 2,5 zu 1 eingesetzt. Die Zelllinie HPDE6c7 wurde als *in-vitro*-Modell für benigne pankreatische Gangzellen verwendet, da sie ursprünglich aus benignem, humanem Pankreasgewebe isoliert wurde und keine der frühen Mutationen aufweist, die das PDAC kennzeichnen (Punkt 4.1). Weiterhin erwies sie sich *in vivo* als nicht tumorigen [22].

Ähnlich wie Zellen der PDAC-Zelllinie T3M4 erwarben HPDE6c7-Zellen in der mehrwöchigen Kultur mit murinen Pankreasmyofibroblasten einen chemoresistenten Phänotyp. Diese Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose konnte gegenüber Chemotherapeutika unterschiedlicher Substanzklassen beobachtet werden, wie für Gemcitabine und Etoposid in dieser Arbeit gezeigt ist. Gemcitabine stellt den aktuellen Therapiestandard in der Therapie des PDAC dar, wodurch jedoch bisher keine wesentlichen Verbesserungen im klinischen Ansprechen erzielt werden konnten [4, 11]. Daher stellt die Suche nach alternativen und effektiveren Therapiekonzepten in der Behandlung des PDAC seit Jahren einen Forschungsfokus der Arbeitsgruppe dar. Im Rahmen vergleichender Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Kombination aus Etoposid mit Inhibitoren von unterschiedlichen molekularen Zielstrukturen (z.B. NF- κ B oder IL1- β) zu deutlich höheren Apoptoseraten in chemoresistenten PDAC Zellen *in vitro* und *in vivo* führte als entsprechende Kombinationen mit Gemcitabine [70, 71]. Entsprechend wurden auch die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht nur mit Gemcitabine, sondern vor allem mit Etoposid durchgeführt.

Der Befund, dass bereits Zellen der pankreatischen Gangepithelzelllinie HPDE6c7 in Gegenwart von aktivierten Fibroblasten einen chemoresistenten Phänotyp erwerben, weist darauf hin, dass Mutationen in den Genen, die mit der Transformation zu einer Karzinomzelle des PDAC in Verbindung gebracht wurden, nicht zwingend erforderlich für die Entstehung von Chemoresistenz sind. Ferner scheint es allein schon durch die Mikroumgebung (z.B. durch Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten) zu Veränderungen in den Gangzellen zu kommen, durch die die Zellen eine maligne Transformation erfahren.

In der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Interaktionen von Pankreasmyofibroblasten mit den Karzinomzelllinien T3M4 oder PT45-P1 zu einer IL1- β getriggerten NO-Sekretion der Myofibroblasten und umgekehrt zu einer IL1- β -Sekretion der Karzinomzellen führten [16]. Diese Beobachtung konnte ebenso in HPDE6c7 Zellen gemacht werden (Daten nicht gezeigt). Da diese Effekte jedoch vornehmlich in der 1. Woche der

Cokultur zu verzeichnen waren, scheinen weitere Mechanismen an der Aufrechterhaltung des chemoresistenten Phänotyps beteiligt zu sein.

In dieser Arbeit konnte entsprechend zu Arbeiten an der Karzinomzelllinie T3M4 gezeigt werden, dass cokultivierte HPDE6c7-Zellen sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene parallel zur erworbenen Zytostatikaresistenz eine verminderte basale Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 aufweisen. Dieser Befund sowie die Tatsache, dass die Expression anti-apoptotischer Moleküle (z.B. XIAP, cIAP1/2 oder Bcl-2) unter Cokulturbedingungen nicht wesentlich verändert ist (Daten nicht gezeigt), deuten auf einen transkriptionellen oder posttranskriptionellen Mechanismus als Ursache der verminderten Caspasenexpression hin.

Eine entscheidende posttranskriptionelle Modifikation ist das *splicing*, bei dem durch Exzision der Introns und Ligation der Exons mRNA hergestellt wird, deren Informationen in den anschließenden Schritten der Proteinbiosynthese abgelesen werden können. Bei dieser Prozessierung der mRNA können *splicing*-Varianten entstehen, durch die es zu unterschiedlichen mRNAs und damit auch zu unterschiedlichen Proteinen kommt. Alternatives Spleißen von mRNA-Transkripten stellt einen Regulationsmechanismus dar, durch den funktionell unterschiedliche Proteinisoformen exprimiert werden können. Für verschiedene Caspasen sind *splicing*-Varianten beschrieben worden, z.B. für Caspase 8 [72], Caspase 9 [73] und Caspase 3 [74]. Da in dieser Arbeit keine Antikörper verwendet wurden, mit denen *splicing*-Varianten der Caspasen differenziert werden können, kann *splicing* als Ursache für die verminderte Caspasenexpression in cokultivierten Zellen nicht ausgeschlossen werden, war jedoch auch nicht Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit. Neben diesen posttranskriptionellen Modifikationen stellen epigenetische Veränderungen der DNA einen weiteren wichtigen Kontrollmechanismus der Genexpression dar. Dabei ist abgesehen von der Histondeacetylierung vor allem die DNA-Methylierung von Bedeutung.

Neben der physiologischen Rolle, die der DNA-Methylierung bei der Kontrolle der Genexpression zukommt, kann diese epigenetische Modifikation auch zur Tumorentstehung und -progression beitragen. Dies geschieht, wenn die Promotorregionen wichtiger Gene, die in gesunden Zellen der Tumorentwicklung entgegenstehen, hypermethyliert und damit „ausgeschaltet“ werden. Aberrante Methylierung von Promotorregionen wurde bereits für viele verschiedene Gene, u.a. auch für die Caspase 8 beschrieben. In Neuroblastomzellen, die sich resistent gegenüber Apoptoseinduktion sowohl durch Fas-Ligation als auch durch Doxorubicin verhielten, konnte gezeigt werden, dass die Expression der Caspase 8 durch methylierungsbedingtes *gene silencing* unterdrückt war [75]. In Retinoblastomzellen konnte beobachtet werden, dass deren Resistenz gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose auch

auf einer defizienten Caspase 8-Expression durch Hypermethylierung beruhte [76]. Zudem konnte Hypermethylierung in Medulloblastom-, Rhabdomyosarkom- und Melanom-Zelllinien sowie in entsprechenden Tumorproben für eine verringerte Caspase 8-Expression verantwortlich gemacht werden. Interessanterweise wiesen sowohl HPDE6c7- als auch T3M4-Zellen, die über mehrere Wochen kokultiviert worden waren, auch nachfolgend in Abwesenheit von Pankreasmyofibroblasten über einige Wochen eine verminderte Caspasenexpression und einen chemoresistenten Phänotyp auf. Die Tatsache, dass in beiden Zelllinien jedoch nach einiger Zeit der Monokultur wieder eine Erhöhung der Caspaselevel sowie ein besseres Ansprechen auf Zytostatika zu beobachten war, deutet auf einen reversiblen Mechanismus hin und führte zu der Hypothese, dass die Herunterregulation der Caspasen in diesen Zellen durch einen epigenetischen Mechanismus bedingt ist. Durch Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin konnte in Übereinstimmung damit die Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 sowie die Chemosensitivität der kokultivierten HPDE6c7-Zellen gesteigert werden. Dieser Effekt konnte auch in der PDAC-Zelllinie T3M4 erzielt werden [65]. Klinisch werden DNA-Methylierungsinhibitoren wie 5-Azacytidin (*Vidaza*[®]) und 5-Azadeoxycytidin (*Dacogen*TM) bereits bei hämatoonkologischen Erkrankungen angewandt [77] und werden zur Behandlung von soliden Tumoren in Studien getestet [78]. Beide Substanzen werden statt der Base Cytosin in die DNA eingebaut, was zur kovalenten Bindung und Degradierung der DNMTs und im folgenden zur Reaktivierung stillgelegter Gene führt [79].

Wie auch für andere Tumore bereits beschrieben worden ist [50, 54, 80], konnte durch Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin die verminderte Expression des Transkriptionsfaktors Stat1 in kokultivierten HPDE6c7-Zellen erhöht werden. In Einklang mit den Daten dieser Arbeit zeigten Missiaglia et al., dass PDAC Zellen besser auf Zytostatika ansprechen, wenn die Zellen zusätzlich 5-Azadeoxycytidin behandelt wurden, was mit einer erhöhten Expression und Aktivierung von Stat1 verbunden war [66]. Auch für einige Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms [81], für die Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 [81] sowie für Glioblastome [82] konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin zur Sensitivierung gegenüber Apoptose-induzierenden Stimulanzen führt. Eine andere Gruppe berichtete, dass eine verminderte Stat1-Expression in Plattenepithelkarzinomen durch eine erhöhte Methylierung des Stat1-Promotors bedingt ist, wodurch das schlechte Ansprechen dieser Zellen auf eine Behandlung mit Cisplatin zu erklären war [54].

Um nun die Bedeutung von Stat1 in der Zytostatika-induzierten Apoptose in HPDE6c7 Zellen nachzuweisen, wurden kokultivierte HPDE6c7-Zellen zusätzlich mit Stat1-Plasmid

transfiziert. Die damit verbundene Überexpression von Stat1 führte ähnlich wie die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin zu einer Zunahme der Caspaseaktivität und damit einer Steigerung der Chemosensitivität.

DNA-CpG-Hypermethylierungen werden durch DNA-Methyltransferasen vermittelt, welche in zahlreichen Tumoren überexprimiert sind [40, 47, 48]. Im PDAC wurde vor allem eine hohe Expression von DNMT1 im Vergleich mit dem Normalgewebe gefunden [48].

Eine erhöhte Expression von DNMT1 konnte in Ganzzelllysaten von kokultivierten HPD6c7 Zellen im Vergleich zu monokultivierten Zellen detektiert werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnte dieser Unterschied auch in Kernextrakten der entsprechend kultivierten Zellen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass DNMT1 in kokultivierten HPDE6c7 Zellen vermehrt aktiv ist. Die Unterdrückung der gesteigerten DNMT1-Expression durch siRNA-Transfektion führte ähnlich wie die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin zu einem Anstieg der Caspasen- und Stat1-Expression sowie zu einer Steigerung der Chemosensitivität. Zusätzlich wurde die Expression von DNMT3B untersucht, die jedoch in mono- und kokultivierten HPDE6c7 Zellen gleich war. Entsprechend führte die siRNA vermittelte Unterdrückung dieses Enzyms zu keiner Änderung in der Expression der Caspasen und von Stat1 (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen konnten nicht nur im Rahmen dieser Arbeit in HPDE6c7 Zellen gemacht werden, sondern auch in weiterführenden Untersuchungen in der PDAC-Zelllinie T3M4. Aufbauend auf diese *in vitro* Befunde zeigten T3M4 Zellen auch *in vivo* ein schlechteres Zytostatikaansprechen, wenn diese in der Gegenwart von Pankreasmyofibroblasten kokultiviert bzw. inokuliert wurden. So konnte in Tumoren, die nach Inokulation von T3M4 Zellen und einem Überschuss an Pankreasmyofibroblasten gewachsen waren (Co-Tumore), eine signifikant schlechtere Tumorreduktion durch eine Behandlung mit Etoposid erzielt werden als in Tumoren, die nach Inokulation von Tumorzellen allein (Mono-Tumore) entstanden waren [65]. Entsprechend der *in vitro* Ergebnisse wiesen Co-Tumore eine deutlich verminderte Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 sowie an STAT1 auf [65]. Diese Daten weisen darauf hin, dass die *in vitro* identifizierten Mechanismen, die zur Chemoresistenz von PDAC Zellen beitragen, offenbar auch *in vivo* wirksam sind.

Unter Berücksichtigung früherer Befunde der Arbeitsgruppe scheint die Entstehung der intrinsischen, also vor Therapie bestehenden Chemoresistenz entscheidend durch die Interaktion von Gangepithel- bzw. Karzinomzellen mit umgebenden Pankreasmyofibroblasten gefördert zu werden. Im Rahmen dieser Interaktionen kommt es offenbar zunächst zu einer frühen Aktivierung von NF- κ B unter Beteiligung von IL1- β und NO [16] und im weiteren

Verlauf zu einem epigenetisch vermitteltem *gene silencing* von Stat1 und verschiedenen Caspasen (siehe **Abbildung 14**).

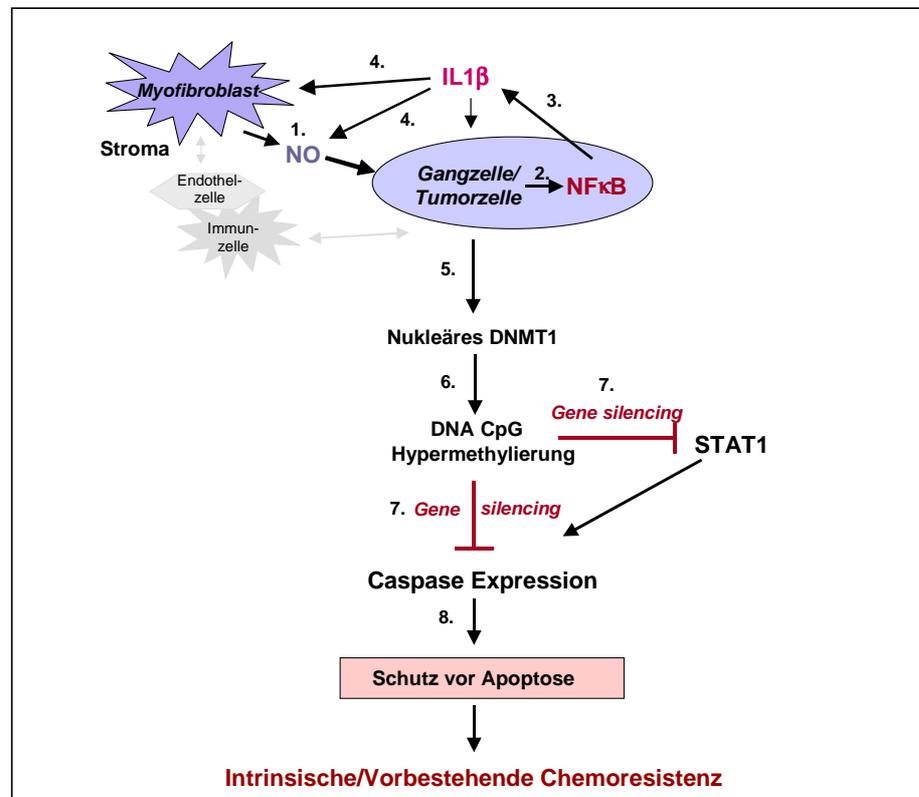


Abbildung 14:

Modell für die Entstehung der Intrinsic/Vorbestehenden Chemoresistenz in Pankreasgangepithel- bzw. Pankreaskarzinomzellen. Aktivierte Fibroblasten (Myofibroblasten) setzen NO frei (1), wodurch es in pankreatischen Gangzellen bzw. Pankreaskarzinomzellen zur Aktivierung von NF-κB kommt (2). Die Aktivierung von NF-κB führt zu einer erhöhten Freisetzung von IL-1β (3). Diese erhöhten IL-1β-Konzentrationen führen wiederum zur weiteren Sekretion von NO durch das Tumorstroma und/oder durch die Gang- bzw. Karzinomzellen selbst (4). Im weiteren Verlauf führt NO zur nukleären Translokation der DNMT1 (5), wodurch es zur DNA-CpG-Hypermethylierung von verschiedenen Genen kommt (7). Diese DNA-Modifikation, entweder in STAT1 und/oder in den Caspasegenen selbst, resultiert in einer verminderten Caspaseexpression und damit einem erhöhten Schutz vor Apoptoseinduktion (8).

Inwiefern beide Mechanismen getrennt oder miteinander verknüpft zur Vermittlung eines chemoresistenten Phänotyps führen, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Die Beobachtung, dass die Behandlung mit dem NO-Donor SNAP zu einer erhöhten nukleären Expression der DNMT1 in T3M4- und in HPDE6c7-Zellen führte (unveröffentlichte Daten), deutet daraufhin, dass die im Rahmen von Tumor-Stroma-

Interaktionen freigesetzten löslichen Faktoren wie z.B. NO den Weg für epigenetische Veränderungen wie DNA-CpG-Hypermethylierungen ebnet.

Basierend auf den Befunden der vorliegenden Arbeit scheint es, dass die Herunterregulation der Caspasen wesentlich durch das epigenetisch vermittelte *gene silencing* des Transkriptionsfaktors Stat1 bedingt ist. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Caspasen selbst von einer DNA-CpG-Methylierung betroffen sind, wie es bereits für andere Tumore beschrieben wurde [44]. Methylierungs-spezifische PCRs sind daher mittlerweile in der Arbeitsgruppe begonnen worden, um die Frage zu beantworten, ob Stat1- und/oder die Caspasegene von dieser Art der DNA-Modifikation betroffen sind.

Als ein weiterer Mechanismus, über den eine verminderte Stat1-Expression die Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen erhöhen kann, ist die Herunterregulation von p21/waf1 beschrieben worden [54, 83]. Ferner ist zu berücksichtigen, dass die Manifestation von Chemoresistenz nicht nur über lösliche Faktoren, sondern auch über die direkte Interaktion der Tumorzellen mit Stromazellen bzw. mit Proteinen der extrazellulären Matrix gefördert werden kann [15].

Zusammenfassend trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Mechanismen bei, die der vorbestehenden Chemoresistenz dieses hochmalignen Tumors zu Grunde liegen. Die Daten untermauern die Bedeutung von Interaktionen der Epithel- bzw. Karzinomzellen mit umgebenden Stromazellen in diesem Szenario, durch die es offenbar zur Freisetzung verschiedener löslicher Faktoren sowie zur epigenetisch bedingten Herunterregulation von Apoptose-vermittelnden Faktoren kommt. Ferner weisen die Befunde dieser Arbeit daraufhin, dass solche Veränderungen bereits sehr früh in der Tumorgenese des PDAC und offenbar ohne unmittelbare Beteiligung von genetischen Veränderungen stattfinden können. Es ist zu spekulieren, dass solche epigenetischen Veränderungen, die durch die Mikroumgebung bedingt sind, Vorläuferzellen '*primen*', wodurch diese empfänglicher für genetische Veränderungen werden und die maligne Transformation beschleunigt wird.

6. Zusammenfassung

Für die Mehrheit der Patienten mit einem exokrinen Pankreasadenokarzinom besteht nach wie vor keine Aussicht auf Heilung. Dies ist hauptsächlich durch das oft fortgeschrittene Krankheitsstadium bei Diagnosestellung sowie die ausgeprägte Resistenz des Tumors gegenüber Chemotherapie bedingt. Als Ausgangspunkt der Karzinombildung wird das pankreatische Gangepithel gesehen. Kennzeichnend für das Pankreasadenokarzinom, aber auch für die chronische Pankreatitis, die einen Risikofaktor für die Entstehung dieses Tumors dargestellt, ist die starke desmoplastische Reaktion (= Stroma). Zellulärer Hauptbestandteil des Stromas sind aktivierte Pankreasfibroblasten (= Pankreasmyofibroblasten). Interaktionen zwischen Tumorzellen bzw. deren Vorläuferzellen mit Pankreasmyofibroblasten scheinen Einfluss auf die Entstehung und die Progression des Pankreaskarzinoms zu haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Interaktion mit Pankreasmyofibroblasten bereits in benignen pankreatischen Gangzellen zur Entstehung von Chemoresistenz als Kennzeichen der malignen Transformation beiträgt. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen der humanen benignen pankreatischen duktaalen Epithelzelllinie HPDE6c7 unter Cokultur mit Pankreasmyofibroblasten einen chemoresistenten Phänotyp erwerben. Dies war mit einer verminderten Expression der Caspasen 8, 9, 3 und 7 sowie des Caspase-regulierenden Transkriptionsfaktors Stat1 verbunden. Durch Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azadeoxycytidin konnte die Expression der Caspasen und von Stat1 gesteigert und die Chemosensitivität erhöht werden. Dies deutet auf einen erhöhten DNA-Methylierungsgrad als Ursache für die verminderte Expression der Caspasen und Stat1 hin. In den cokultivierten HPDE6c7-Zellen wurde darüberhinaus eine erhöhte Expression der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) detektiert, dessen Unterdrückung mittels siRNA-Transfektion ähnlich wie die Behandlung mit 5-Azadeoxycytidin sowohl zu einer Erhöhung der Caspase- und Stat1-Expression als auch zu einem chemosensitiven Phänotyp führte.

Diese Arbeit weist auf die Bedeutung von Pankreasmyofibroblasten in der Entstehung von Chemoresistenz bereits in pankreatischen Gangepithelzellen hin. Ursächlich scheint dafür eine durch den Einfluss der Pankreasmyofibroblasten veränderte epigenetische Regulation der Caspasen zu sein. Ferner zeigen diese Daten, dass die Entstehung der intrinsischen Chemoresistenz offenbar ein frühes Ereignis in der Tumorgenese des Pankreasadenokarzinoms darstellt und Pankreasmyofibroblasten zur malignen Transformation des pankreatischen Gangepithels entscheidend beitragen.

7. Literaturverzeichnis

1. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) e.V. Bauchspeicheldrüse. Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. 2008; 38-1.
2. Lüttges J, Klöppel G. Das duktales Pankreaskarzinom und seine Vorläufer. Pathologe. 2005; **26**(1): 12-7.
3. Lillemoe KD, Yeo CJ, Cameron JL. Pancreatic cancer: state-of-the-art care. CA Cancer J Clin. 2000; **50**(4): 241-68.
4. Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I. S3-Leitlinie: Exokrines Pankreaskarzinom. Z Gastroenterol. 2007; **45**(6):487-523.
5. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. Lancet. 2004; **363**(9414): 1049-57.
6. Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grutzmann R, Gerdes B, Pilarsky C, Heise JW, Schulte KM, Colombo-Benkmann M, Schleicher C, Witzigmann H, Pridöhl O, Ghadimi MB, Horstmann O, von Bernstorff W, Jochimsen L, Schmidt J, Eisold S, Estévez-Schwarz L, Hahn SA, Schulmann K, Böck W, Gress TM, Zügel N, Breitschaft K, Prenzel K, Messmann H, Endlicher E, Schneider M, Ziegler A, Schmiegel W, Schäfer H, Rothmund M, Rieder H. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. Int J Cancer. 2004; **110**(6): 902-6.
7. Klein AP, Beaty TH, Bailey-Wilson JE, Brune KA, Hruban RH, Petersen GM. Evidence for a major gene influencing risk of pancreatic cancer. Genet Epidemiol. 2002; **23**(2): 133-49.
8. Böhmig, M, Rosewicz, S. Pankreaskarzinom. Z Gastroenterol. 2004; **42**(3): 261-8.
9. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Buchler MW. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. N Engl J Med. 2004; **350**(12): 1200-10.
10. Sternheim ET, Voigt J, Kaspar W, Dippold WG. Das Pankreaskarzinom. Internist (Berl). 2000; **41**(9): 848-54, 856-9.

11. Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*. 2005; **128**(6): 1606-25.
12. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol*. 2004; **48**(5-6): 509-17.
13. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004; **432**(7015): 332-7.
14. Apte MV, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, Ramm GA, Buchler M, Friess H, McCarroll JA, Keogh G, Merrett N, Pirola R, Wilson JS. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas*. 2004; **29**(3): 179-87.
15. Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*. 2004; **28**(1): 38-44.
16. Muerkoster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res*. 2004; **64**(4): 1331-7.
17. Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Fölsch UR, Schäfer H. Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 2002; **62**(3): 910-6.
18. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; **319**(9): 525-32.
19. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; **6**(8): 2969-72.
20. Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003; **4**: 237-56.
21. Furukawa T, Duguid WP, Rosenberg L, Viallet J, Galloway DA, Tsao MS. Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am J Pathol*. 1996; **148**(6): 1763-70.

22. Ouyang H, Mou L, Luk C, Liu N, Karaskova J, Squire J, Tsao MS. Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am J Pathol.* 2000; **157**(5): 1623-31.
23. Liu N, Furukawa T, Kobari M, Tsao MS. Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am J Pathol.* 1998; **153**(1): 263-9.
24. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; **2**(4): 277-88.
25. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol.* 2005; **84**(10): 627-39.
26. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; **68**: 383-424.
27. Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003; **2**: 6.
28. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; **407**(6805): 770-6.
29. Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature.* 1998; **396**(6707): 119-22.
30. Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004; **53**(3): 153-9.
31. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature.* 2007; **446**(7137): 749-57.
32. Raguz S, Yagüe E. Resistance to chemotherapy: new treatments and novel insights into an old problem. *Br J Cancer.* 2008; **99**(3): 387-91.
33. Lee SH, Shin MS, Lee JY, Park WS, Kim SY, Jang JJ, Dong SM, Na EY, Kim CS, Kim SH, Yoo NJ. In vivo expression of soluble Fas and FAP-1: possible mechanisms of Fas resistance in human hepatoblastomas. *J Pathol.* 1999; **188**, 207-12.
34. Nagata S, Goldstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995; **267**, 1449-56.
35. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; **5**(11): 897-907.
36. Mürköster SS, Lust J, Arlt A, Hasler R, Witt M, Sebens T, Schreiber S, Fölsch UR, Schäfer H. Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases. *Oncogene.* 2006; **25**(28): 3973-81.

37. Friedman J, Xue D. To live or die by the sword: the regulation of apoptosis by the proteasome. *Dev Cell*. 2004; **6**(4): 460-1.
38. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000; **9**(16): 2395-402.
39. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; **16**(1): 6-21.
40. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; **3**(6): 415-28.
41. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, Sapino A, Zhang F, Sharma D, Yang XH, Tora AD, Mehta K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*. 2002; **21**(57): 8843-51.
42. Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, Stahel R. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ*. 2003; **10**(3): 356-64.
43. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Chaudhary PM, Gazdar AF. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res*. 2002; **62**(20): 5897-901.
44. Lindsey JC, Lusher ME, Anderton JA, Bailey S, Gilbertson RJ, Pearson AD, Ellison DW, Clifford SC. Identification of tumour-specific epigenetic events in medulloblastoma development by hypermethylation profiling. *Carcinogenesis*. 2004; **25**(5): 661-8.
45. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 2000; **16**(4): 168-74.
46. Ueki T, Walter KM, Skinner H, Jaffee E, Hruban RH, Goggins M. Aberrant CpG island methylation in cancer cell lines arises in the primary cancers from which they were derived. *Oncogene*. 2002; **21**(13): 2114-7.
47. Jin F, Dowdy SC, Xiong Y, Eberhardt NL, Podratz KC, Jiang SW. Up-regulation of DNA methyltransferase 3B expression in endometrial cancers. *Gynecol Oncol*. 2005; **96**(2): 531-8.

-
48. Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci.* 2005; **96**(7): 403-8.
 49. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000; **19**(21): 2474-88.
 50. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; **93**(15): 7673-8.
 51. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernández-Luna JL, Nuñez G, Dalton WS, Jove R. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity.* 1999; **10**(1): 105-15.
 52. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest.* 1998; **102**(7): 1385-92.
 53. Song JI, Grandis JR. STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene.* 2000; **19**(21): 2489-95.
 54. Xi S, Dyer KF, Kimak M, Zhang Q, Gooding WE, Chaillet JR, Chai RL, Ferrell RE, Zamboni B, Hunt J, Grandis JR. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2006; **98**(3): 181-9.
 55. Mui AL. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 1999; **55**(12): 1547-58.
 56. Bromberg J, Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene.* 2000; **19**(21): 2468-73.
 57. Stephanou A, Latchman DS. STAT-1: a novel regulator of apoptosis. *Int J Exp Pathol.* 2003; **84**(6): 239-44.
 58. Laimer K, Spizzo G, Obrist P, Gastl G, Brunhuber T, Schäfer G, Norer B, Rasse M, Haffner MC, Doppler W. STAT1 activation in squamous cell cancer of the oral cavity: a potential predictive marker of response to adjuvant chemotherapy. *Cancer.* 2007; **110**(2): 326-33.
 59. Widschwendter A, Tonko-Geymayer S, Welte T, Daxenbichler G, Marth C, Doppler W. Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2002; **8**(10): 3065-74.

-
60. Sironi JJ, Ouchi T. STAT1-induced apoptosis is mediated by caspases 2, 3, and 7. *J Biol Chem.* 2004; **279**(6): 4066-74.
 61. Kim HS, Lee MS. STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell Signal.* 2007; **19**(3): 454-65.
 62. Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science.* 1997; **278**(5343): 1630-2.
 63. Fu XY. From PTK-STAT signaling to caspase expression and apoptosis induction. *Cell Death Differ.* 1999; **6**(12): 1201-8.
 64. Qian J, Niu J, Li M, Chiao PJ, Tsao MS. In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005; **65**(12): 5045-53.
 65. Mürköster SS, Werbing V, Koch D, Sipos B, Ammerpohl O, Kalthoff H, Tsao MS, Fölsch UR, Schäfer H. Role of myofibroblasts on innate chemoresistance in pancreatic carcinoma – epigenetic down-regulation of caspases. *Int. J. Cancer.* 2008; **123**(8):1751-60.
 66. Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, Crnogorac-Jurcevic T, Scarpa A, Lemoine NR. Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway. *Oncogene.* 2005; **24**(1): 199-211.
 67. Yen TW, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP, Bell RH Jr. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinoma. *Surgery.* 2002; **131**: 129-34.
 68. Farrow B, Evers BM. Inflammation and the development of pancreatic cancer. *Surg Oncol.* 2002; **10**: 153-69.
 69. Hartel M, Di Mola FF, Gardini A, Zimmermann A, Di Sebastiano P, Guweidhi A, Innocenti P, Giese T, Giese N, Buchler MW, Friess H. Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg.* 2004; **28**(8): 818-25.
 70. Arlt A, Vorndamm J, Breitenbroich M, Fölsch UR, Kalthoff H, Schmidt WE, Schäfer H. Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene.* 2001; **20**(7):859-68.
 71. Mürköster S, Arlt A, Witt M, Gehrz A, Haye S, March C, Grohmann F, Wegehenkel

- K, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H. Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2003; **104**(4):469-76.
72. Kisenge RR, Toyoda H, Kang J, Tanaka S, Yamamoto H, Azuma E, Komada Y. Expression of short-form caspase 8 correlates with decreased sensitivity to Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Sci*. 2003; **94**(7): 598-605.
73. Johnson CR, Jarvis WD. Caspase-9 regulation: an update. *Apoptosis*. 2004; **9**(4): 423-7.
74. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Lizard-Nacol S. Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance. *Bull Cancer*. 2005; **92**(3): 219-26.
75. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med*. 2000; **6**(5): 529-35.
76. Poulaki V, Mitsiades CS, McMullan C, Fanourakis G, Negri J, Goudopoulou A, Halikias IX, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Miller JW, Mitsiades N. Human retinoblastoma cells are resistant to apoptosis induced by death receptors: role of caspase-8 gene silencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; **46**(1): 358-66.
77. Warlick ED, Smith BD. Myelodysplastic syndromes: review of pathophysiology and current novel treatment approaches. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; **7**(6):541-58.
78. Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, McCormick C, Strathdee G, Lee C, Barrett S, Reade S, Jadayel D, Tang A, Bellenger K, Mackay L, Setanoians A, Schätzlein A, Twelves C, Kaye SB, Brown R. Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol*. 2007; **25**(29):4603-9.
79. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. 2008; **123**(1): 8-13.
80. Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004; **4**: 97-105.
81. Kanda T, Tada M, Imazeki F, Yokosuka O, Nagao K, Saisho H. 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes hepatoma and pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2005; **14**(4): 975-9.
82. Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Patti M, Bartucci M, Ricci-Vitiani L, Signore M, Stassi G, Larocca LM, Crinò L, Peschle C, De Maria R. Inhibition of DNA

methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction. *Cancer Res.* 2005; **65**(24):11469-77.

83. Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science.* 1996; **272**: 719-22.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. nat. Susanne Sebens. Für ihr stetiges Engagement, die Formulierung des Dissertationsthemas, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie für ihre außerordentlich gute Betreuung, die hervorragende Arbeitatmosphäre und ihr immer offenes Ohr bin ich ihr sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer, dem Leiter des Labors für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, Klinik für Allgemeine Innere Medizin der Universität Schleswig-Holstein Campus Kiel, danke ich besonders für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung der benötigten Mittel zur Durchführung der Doktorarbeit und für die hervorragende Betreuung während der Anfertigung.

Dem Direktor der Klinik für Allgemeine Innere Medizin der Universität Schleswig-Holstein Campus Kiel, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Fölsch, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Gastroenterologie und Hepatologie bedanken. Ihre ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitatmosphäre haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vor allem meiner Mitdoktorandin Dr. med. vet. Veronika Werbing danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Zu großem Dank bin ich meinen Eltern Sabine Koch und Dr. rer. nat. Dietrich Koch verpflichtet. Sie ermöglichten mir das Studium der Humanmedizin und standen mir jederzeit bei.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit danke ich Hjördis Becker, M.A.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Dorothee Koch
Geburtsdatum: 27.03.1979
Geburtsort: Insel Nordstrand
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

08 / 1985 – 06 / 1998 Grundschule und Theodor-Storm-Schule, Städtisches
Gymnasium, Husum, Allgemeine Hochschulreife

Studium

10 / 2001 – 04 / 2008 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
07 / 2008 Approbation als Ärztin
04 / 2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08 / 2003 Ärztliche Vorprüfung

Praktisches Jahr

08 / 2006 – 12 / 2006 Gynäkologie / Geburtshilfe, Kantonsspital St. Gallen, Klinik
für Frauenkrankheiten, Ausbildungskrankenhaus der
Universität Zürich, Schweiz
12 / 2006 – 04 / 2007 Innere Medizin, DIAKO Flensburg, Akademisches
Lehrkrankenhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
und der Medizinischen Universität zu Lübeck
04 / 2007 – 07 / 2007 Chirurgie, Klinik für Allgemeine Chirurgie und
Thoraxchirurgie, UK S-H Campus Kiel

Berufsausbildung

Seit 10 / 2008 Assistenzärztin in der II. Medizinischen Klinik des UK S-H
Campus Kiel

Dissertation

05 / 2005 – 05 / 2006

Wissenschaftliche Arbeiten zu dem Thema „Der Einfluss von Pankreasmyofibroblasten auf die intrinsische Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms – epigenetische Regulation von Caspasen in der pankreatischen Gangzelllinie HPDE6c7“ im Labor für molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, Arbeitsgruppe Tumorbilogie, Klinik für Allgemeine Innere Medizin in der I. Medizinischen Klinik UK S-H Campus Kiel.