

Metastasierung des Pankreaskarzinoms:
Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf Stammzeleigenschaften
und Differenzierung von Pankreasgangepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Hendrike Knaack

Kiel, 2018

Erste Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2018

Zum Druck genehmigt: 13.07.2018

Auszüge aus der vorliegenden Arbeit wurden bereits unter folgenden Titeln in Originalarbeiten und Kongressbeiträgen der Öffentlichkeit vorgestellt.

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

Knaack, H., Viol, F., Lenk, L., Hengstler, J., Mikulits, W., Will, O., Glüer, C.-C., Egberts, J.-H., Hauser, C., Gundlach, J.-P. & Sebens, S. Die hepatische Mikroumgebung beeinflusst das Krebsstammzellpotenzial disseminierter Pankreasgangepithelzellen sowie ihr Wachstumsverhalten *in vivo*. 37. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., Greifswald, Deutschland. 2017.

Knaack, H., Lenk, L., Viol, F., Fabian, A., Buttlar, J., Mikulits, W., Schäfer, H. & Sebens, S. Metastasierung des duktales Pankreaskarzinoms - Die hepatische Mikroumgebung beeinflusst das Wachstumsverhalten und Krebsstammzeleigenschaften disseminierter Pankreasgangepithelzellen über die Modulation des Metabolismus. 36. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., München/Freising, Deutschland. 2016.

Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) stellt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen dar und die Inzidenz wird in den nächsten Jahren weiter zunehmen. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 80 % der Patienten bereits ein fortgeschrittenes Stadium auf, häufig mit Metastasen in der Leber, sodass nur eine palliative Behandlung in Frage kommt. Selbst nach erfolgreicher Resektion und adjuvanter Chemotherapie kommt es in vielen Fällen zur Entwicklung von lokalen Rezidiven oder Metastasen. Krebsstammzellen (CSCs) zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Pluripotenz und Zytostatikaresistenz aus und konnten bereits im PDAC nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist der Erwerb von CSC-Eigenschaften mit dem Vorgang der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert. CSCs sind essentiell für die Entstehung des Primärtumors, ihr Beitrag zum Prozess der Metastasierung ist hingegen wenig verstanden.

Ziel dieser Studie war es daher zu untersuchen, welchen Einfluss die hepatische Mikroumgebung, abhängig von ihrem inflammatorischen Zustand, auf Pankreasgang-epithelzellen (PDEZ) hinsichtlich ihrer EMT- und CSC-Eigenschaften hat. Darüber hinaus sollte die Tumorigenität von PDEZ mit unterschiedlichem Selbsterneuerungspotential *in vitro* und *in vivo* bestimmt werden. Für diese Analysen wurden prä maligne (H6c7-kras) und maligne (Panc1) PDEZ in einem indirekten Kokultursystem mit Hepatozyten alleine, einer Kombination aus Hepatozyten und 5 % hepatischen Sternzellen (HSC), repräsentativ für eine physiologische Lebermikroumgebung, oder Hepatozyten und 5 % hepatischen Myofibroblasten (HMF) kultiviert, die aus HSC transdifferenziert und als Modell für ein entzündliches Lebermilieu verwendet wurden.

Während der Einfluss der hepatischen Stromazellen auf die EMT-Charakteristika der Gesamtpopulation beider PDEZ gering war, konnte ein größeres Koloniebildungspotential der malignen im Vergleich zu prä malignen PDEZ festgestellt werden. Dabei bildete sich die größte Anzahl an Kolonien in beiden Zelllinien in Gegenwart von Hepatozyten und 5 % HSC, was mit einer erhöhten Expression der CSC-Marker Nestin und Nanog einherging. Weiterhin konnten verschiedene Kolonieformen detektiert werden, nämlich Holoklone, die mit der höchsten CSC-Dichte assoziiert werden, Paraklone, die mehr differenzierte Zellen enthalten, und Meroklone, die ein Intermediat dieser beiden Formen darstellen. Um Unterschiede des CSC-Potentials dieser Kolonieformen zu untersuchen, wurden PDEZ, die zuvor in Gegenwart von Hepatozyten und 5 % HSC kokultiviert wurden, aus einem Holo- sowie Paraklon (Panc1) bzw. Mero- sowie Paraklon (H6c7-kras) expandiert und charakterisiert.

In vivo führte die Inokulation von 10.000 Panc1-Paraklon-expandierten Zellen in nur 2/10 SCID-beige Mäusen zu Tumorwachstum, während die gleiche Anzahl Holoklon-expandierter Zellen in 7/10 Tieren Tumorwachstum auslöste. Die Tumore waren durch eine hohe Expression des CSC-Markers Nestin sowie von mesenchymalen Markern in Abwesenheit von E-Cadherin gekennzeichnet. *In vitro* waren Holoklon- verglichen mit Paraklon-Zellen durch die vermehrte Bildung von Holoklonen zusammen mit einer erhöhten Expression von CSC-Markern charakterisiert, was zusätzlich mit einem stärker mesenchymalen Phänotyp einherging. Durch die Blockade von TNF- α mit Etanercept waren diese Eigenschaften teilweise reversibel. Die Herunterregulierung von Nestin mittels siRNA verdeutlichte die Bedeutung dieses Intermediärfilaments für CSC- und EMT-Eigenschaften von PDEZ mit hohem Selbsterneuerungspotential.

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass die hepatische Mikroumgebung ein wichtiger Modulator von CSC- und EMT-Eigenschaften disseminierter PDEZ ist und so zu der Entwicklung von Lebermetastasen des PDAC beiträgt.

Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) represents one of the most fatal neoplastic malignancies with a 5-year survival rate of less than 10 % and a still rising incidence. At diagnosis, 80 % of patients present in an advanced state that is often accompanied with liver metastasis and only leaves palliative treatment options. Even after successful resection and adjuvant chemotherapy, many patients develop local relapse or metastasis. Cancer stem cells (CSCs) are characterised by their self-renewal ability, pluripotency and resistance towards cytostatics and have been detected in PDAC. The acquisition of CSC-features is associated with the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT). CSCs are essential for the development of the primary tumour, their contribution towards the process of metastasis formation, however, is still poorly understood.

Therefore, this study aimed at understanding the impact of the hepatic microenvironment, depending on its inflammatory conditions, on pancreatic ductal epithelial cells (PDEC) regarding their EMT- and CSC-properties. Moreover, the tumorigenicity of PDECs with different self-renewal potential was to be determined *in vitro* and *in vivo*. For these analyses, premalignant (H6c7-kras) and malignant (Panc1) PDECs were cultured in an indirect coculture system together with either hepatocytes alone, a combination of hepatocytes and 5 % hepatic stellate cells (HSC), representing a physiologic liver milieu, or hepatocytes and 5 % hepatic myofibroblasts (HMF) that had been transdifferentiated from HSC and serve as a model for an inflammatory liver microenvironment.

While the influence of the hepatic stromal cells on the population of both PDECs regarding their EMT-characteristics was small, malignant PDECs displayed a higher colony formation potential than premalignant cells. In both PDECs, the highest number of colonies was detected after coculture with hepatocytes supplemented with 5 % HSC and was associated with an enhanced expression of CSC-markers Nestin and Nanog. Furthermore, different colony forms could be detected, namely holoclones that are associated with the highest CSC-density, paraclones that contain more differentiated cells and meroclones that display an intermediate colony form. To analyse differences between those colony forms regarding their CSC-potential, holo- and paraclones (Panc1) and mero- and paraclones (H6c7-kras), respectively, were expanded from single PDECs cultured in the presence of hepatocytes and 5 % HSC and were characterised. *In vivo*, the inoculation of 10,000 Panc1-paraclone cells led to tumour formation in 2/10 SCID-beige mice, while the same number of holoclone cells evoked tumour formation in 7/10 animals. These tumours displayed high expression levels of CSC-marker Nestin as well

as mesenchymal markers in the absence of E-cadherin. *In vitro*, holoclone cells were characterised by an enhanced formation of holoclones and an increased expression of CSC-markers together with a stronger mesenchymal phenotype compared to paraclone cells. Blocking of TNF- α by etanercept partly reverted these features. A knockdown of Nestin by siRNA illustrated the importance of this intermediate filament for the CSC- and EMT-properties of PDECs with high self-renewing properties.

All in all, these data point towards the hepatic microenvironment as an important modulator of the CSC- and EMT-properties of disseminated PDECs and thereby a contributor to the formation of liver metastasis of PDAC.

Abkürzungsverzeichnis

Neben den allgemein üblichen Abkürzungen wurden folgende Kurzformen verwendet.

° C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
5-FU	5-Fluorouracil
ABCG2	<i>ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2</i>
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
AT	Österreich
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i> , Fläche unter der Kurve
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Kanada
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDKN2A	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFA	<i>Colony Formation Assay</i>
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
co	Kokultiviert
co H	Kokultur mit Hepatozyten
co H+5HMF	Kokultur mit Hepatozyten und 5 % hepatischen Myofibroblasten
co H+5HSC	Kokultur mit Hepatozyten und 5 % hepatischen Sternzellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	Cisplatin

CSC	Krebsstammzelle
CTC	Zirkulierende Tumorzelle
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTC	Disseminierte Tumorzelle
E-Cad	E-Cadherin
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FR	Frankreich
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gem	Gemcitabin
H	Hepatozyten
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H6c7-kras	Humane Pankreasgangepithel-Zelllinie H6c7eR-Kr
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämalaun-Eosin
HMF	Hepatischer Myofibroblast
HPDE	Humanes Pankreasgangepithel
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSC	Hepatische Sternzelle
HSP90	<i>Heat Shock Protein</i> 90
IgG	Immunglobulin G

IL	Interleukin
ITS	<i>Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement</i>
JP	Japan
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KPC	Mausmodell mit Pankreas-spezifischen Mutationen in <i>kras</i> und <i>p53</i> (LSL-Kras ^{G12D/+} ; LSL-Trp53 ^{R172H/+} ; Pdx-1-Cre)
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
MIF	<i>Migration Inhibitory Factor</i>
min	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mono	Monokultiviert
N	Normal
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
PAA	Rotiphorese gel 40 (37,5:1) Acrylamid/Bisacrylamid 40 % Lösung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom
PDEC	<i>Pancreatic Ductal Epithelial Cells</i>
PDEZ	Duktale Pankreasepithelzellen
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
POD	Tag nach Operation
p-p65	Phosphoryliertes p65
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTCA	<i>Real Time Cell Analysis</i>
s	Sekunde
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siCtrl	<i>Small interfering RNA</i> gegen eine Kontroll-Sequenz
siNestin	<i>Small interfering RNA</i> gegen Nestin
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Sox2	<i>Sex-determining Region Y-Box 2</i>
T	Tween 20
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β
TIMP1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1</i>
t_{\max}	Zeitpunkt des maximalen Effekts
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>

UK	Vereinigtes Königreich
US	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vim	Vimentin
w/v	Masse pro Volumen
x g	Einheit der Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung g

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2 Pathogenese und Pathologie	3
1.1.3 Therapieoptionen und -herausforderungen.....	5
1.2 Maligne Progression	7
1.2.1 Invasions- und Metastasierungskaskade.....	7
1.2.2 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT).....	8
1.2.3 Limitierungen in der Effizienz der Invasions- und Metastasierungskaskade.....	10
1.2.4 Metastasierung im PDAC	10
1.3 Krebsstammzellen und ihre Eigenschaften	13
1.3.1 Konzept der Krebsstammzellen.....	13
1.3.2 CSC-Marker Nanog und Nestin.....	15
1.3.3 EMT-Eigenschaften und Plastizität von Krebsstammzellen	17
1.4 Zielsetzung	18
2 Material	20
2.1 Geräte und Zubehör	20
2.1.1 Pipetten	20
2.1.2 Zentrifugen	20
2.1.3 Sterilwerkbänke	20
2.1.4 Inkubatoren	21
2.1.5 Messgeräte	21

2.1.6	Mikroskope	21
2.1.7	Histologiezubehör	22
2.1.8	Waagen	22
2.1.9	Weitere Geräte	22
2.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.3	Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Gele	24
2.3.1	Chemikalien und Reagenzien	24
2.3.2	Pufferzusammensetzungen	25
2.3.3	Zusammensetzung der Western Blot-Gele	27
2.4	Material und Reagenzien für zellbiologische Untersuchungen	27
2.4.1	Primäre Zellen und Zelllinien	27
2.4.2	Zellkulturzusätze	28
2.4.3	Zusammensetzung von Zellkulturmedien	29
2.4.4	Apoptosestimuli	30
2.4.5	<i>Small interfering</i> RNA (siRNA) und Fusionsproteine	30
2.5	Antikörper und Reagenzien	30
2.5.1	Antikörper und Reagenzien für Immunfluoreszenz- und immunzytochemische Färbungen	30
2.5.2	Antikörper für Western Blot-Untersuchungen	32
2.6	Primer für qPCR-Analyse	33
2.6.1	Primer des Herstellers Eurofins (Ebersberg, DE)	33
2.6.2	Primer des Herstellers RealTimePrimers (via Biomol, Hamburg, DE)	33
2.7	Materialien für <i>in vivo</i>-Experimente	34
2.7.1	Material und Verbrauchsmaterial für <i>in vivo</i> -Experimente	34
2.7.2	Injektionslösungen	34
2.8	Kits	35
2.9	Software	35

3	Methoden.....	36
3.1	Zellbiologische Methoden	36
3.1.1	Kultivierung und Passagierung der PDEZ.....	36
3.1.2	Kultivierung der hepatischen Sternzellen und hepatischen Myofibroblasten	36
3.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen und Zelllinien	37
3.1.4	Kollagenbeschichtung der Kulturplatten	37
3.1.5	Kultivierung der Hepatozyten.....	37
3.1.6	Indirekte Kokultur	38
3.1.7	<i>Colony Formation Assay</i> (CFA).....	40
3.1.8	Expansion von Holo-, Mero- und Paraklonzellen aus PDEZ.....	40
3.1.9	siRNA-vermittelter Knockdown von Nestin	41
3.1.10	Blockierung von TNF- α	41
3.2	Methoden zur funktionellen Charakterisierung der PDEZ	42
3.2.1	Behandlung der PDEZ mit Apoptosestimuli	42
3.2.2	Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität.....	42
3.2.3	Bestimmung der Invasionsrate mit xCELLigence.....	43
3.3	Gewinnung und Aufreinigung von RNA und Proteinen.....	43
3.3.1	RNA-Extraktion.....	43
3.3.2	cDNA-Synthese	44
3.3.3	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	44
3.3.4	Kombinierte Protein- und RNA-Isolation	45
3.3.5	Herstellung von Gesamtzellysat	45
3.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
3.3.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
3.3.8	Western Blot und Immundetektion von Proteinen	46
3.4	<i>In vivo</i>-Untersuchungen zur Tumorigenität	47
3.4.1	Tierhaltung und Applikation der PDEZ	47
3.4.2	Kontrolle des Tumorwachstums	48
3.4.3	Gewebeentnahme und Aufbereitung	49
3.4.4	Herstellung serieller Gewebeschnitte	49
3.4.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten.....	49

3.5	Immunbiologische Methoden	50
3.5.1	Immunzytochemische und Immunfluoreszenz-Färbung von PDEZ auf Deckgläschen	50
3.5.2	Immunfluoreszenz-Färbung von Gewebeschnitten	51
3.5.3	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	52
3.6	Statistische Auswertung.....	52
4	Ergebnisse	54
4.1	Einfluss hepatischer Stromazellen auf das Zellwachstum von PDEZ.....	54
4.1.1	Bestimmung der Vital-Zellzahl der PDEZ	54
4.1.2	Bestimmung der PDEZ-Proliferation mittels Ki67-Färbung.....	55
4.1.3	Bestimmung der basalen Apoptoserate der PDEZ	56
4.2	Einfluss hepatischer Stromazellen auf das Ansprechen von PDEZ auf Apoptosestimuli	57
4.2.1	Ansprechen von PDEZ auf den endogenen Apoptosestimulus TRAIL	58
4.2.2	Ansprechen von PDEZ auf die Zytostatika Gemcitabin, 5-Fluorouracil und Cisplatin	59
4.3	Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf die EMT in PDEZ.....	60
4.3.1	Western Blot zur Detektion der EMT-Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin in PDEZ	61
4.3.2	Immunzytochemische Färbung der EMT-Marker E-Cadherin und L1CAM in PDEZ	62
4.3.3	Invasionsvermögen der PDEZ unter Einfluss einer hepatischen Mikroumgebung..	64
4.4	Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ	65
4.4.1	Koloniebildungseigenschaften von PDEZ.....	66
4.4.2	Expression der CSC-Marker Nestin, Nanog und ABCG2 in PDEZ	68
4.5	Charakterisierung von Holo-, Mero- und Paraklonen <i>in vitro</i>.....	69
4.5.1	Charakterisierung der PDEZ-Klone aus Panc1- und H6c7-kras-Einzelzellen hinsichtlich ihres Koloniebildungsvermögens.....	70

4.5.2	Charakterisierung der PDEZ-Klone aus Panc1- und H6c7-kras-Einzelzellen hinsichtlich ihrer CSC-Marker-Expression	72
4.5.3	Charakterisierung der PDEZ-Klone aus Panc1- und H6c7-kras-Einzelzellen hinsichtlich ihrer basalen Apoptoserate und des Ansprechens auf Apoptosestimuli	74
4.5.4	Gegenseitiger Einfluss einer indirekten Kokultur von PDEZ-Klonen unterschiedlicher Charakteristika	76
4.5.4.1	Zellzahl von PDEZ-Klonen nach indirekter Kokultur mit anderen Klonformen	77
4.5.4.2	Koloniebildungsvermögen von PDEZ-Klonen nach indirekter Kokultur mit anderen Klonformen.....	78
4.5.4.3	Expression der CSC-Marker in PDEZ-Klonen nach indirekter Kokultur mit anderen Klonformen.....	79
4.6	Tumorigenität von Panc1-Holo- und Paraklonen <i>in vivo</i>	81
4.6.1	Tumorstadium von Panc1-Holo- und Paraklonen <i>in vivo</i>	81
4.6.2	Nestin-Expression in Panc1-Holoklon- und Paraklon-Tumoren <i>in vivo</i>	82
4.6.3	EMT-Marker-Expression in Panc1-Holoklon- und Paraklon-Tumoren <i>in vivo</i>	84
4.7	Charakterisierung der EMT-Eigenschaften von Panc1- und H6c7-kras-Klonen <i>in vitro</i>	85
4.7.1	Expression von EMT-Markern in Panc1- und H6c7-kras-Klonen	85
4.7.2	Invasionsvermögen von Panc1-Para- und Holoklonen.....	87
4.8	Blockade von TNF-α mittels Etanercept	88
4.8.1	Einfluss der Blockade von TNF- α auf die Zellzahl von Panc1-Holoklonen.....	88
4.8.2	Einfluss der Blockade von TNF- α auf EMT- und Invasionseigenschaften von Panc1-Holoklonen	89
4.8.3	Einfluss der Blockade von TNF- α auf CSC-Eigenschaften von Panc1-Holoklonen	91
4.9	Bedeutung von Nestin für die Aufrechterhaltung von Panc1-Holoklon-Eigenschaften	93
4.9.1	Validierung des Nestin-Knockdowns in Panc1-Holoklon-Zellen	93
4.9.2	Einfluss von Nestin auf das Koloniebildungsvermögen von Panc1-Holoklonen.....	94
4.9.3	Einfluss von Nestin auf die Zellzahl von Panc1-Holoklonen.....	95
4.9.4	Einfluss von Nestin auf EMT und Invasionsvermögen von Panc1-Holoklonen.....	96

5	Diskussion.....	98
5.1	Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf das Wachstumsverhalten und das Ansprechen auf Apoptosestimuli von PDEZ	98
5.2	Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf EMT-Eigenschaften von PDEZ	101
5.3	Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf CSC-Eigenschaften von PDEZ.	105
5.4	Charakterisierung von PDEZ mit unterschiedlichen CSC-Eigenschaften <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	106
5.5	Kritische Reflektion des Zellmodells	113
5.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	116
	Literaturverzeichnis.....	119
	Abbildungsverzeichnis	141
	Publikationsverzeichnis	144
	Danksagung.....	147
	Erklärung.....	148

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

Maligne Veränderungen des Pankreas können unter anderem als neuroendokrine Tumore, Azinuszellkarzinom, Intraduktales papillär-muzinöses Karzinom oder Solide pseudopapilläre Tumore vorliegen, jedoch stellt das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) die häufigste Form dieser malignen Neoplasien dar (Pelosi et al., 2017).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Obwohl das PDAC mit weniger als 4 % nur einen kleinen Anteil der neu detektierten Krebserkrankungen ausmacht, stellt es die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar, an der in Deutschland im Jahr 2014 über 17.000 Menschen erkrankten (Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017; Siegel et al., 2018). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei unter 10 % (Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017; Siegel et al., 2018), wobei die Inzidenz entgegen der Entwicklungen in anderen Tumorentitäten in den letzten Jahren sogar gestiegen ist, sodass vorhergesagt wird, dass das PDAC bis 2030 die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache darstellen wird (Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017; Rahib et al., 2014; Siegel et al., 2018). Mit über 16.500 entsprach die Zahl der Sterbefälle in Deutschland im Jahr 2014 nahezu der der Neuerkrankungen, was auch dadurch bedingt ist, dass das PDAC keine frühen oder spezifischen diagnostischen Symptome aufweist (Giovannetti et al., 2017; Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017), sodass bei 80 % der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Stadium oder Metastasen diagnostiziert werden (Bilimoria et al., 2007; Giovannetti et al., 2017; Pelosi et al., 2017; Siegel et al., 2016). Nur in Patienten mit lokalem PDAC ist eine operative Resektion möglich, die bislang die einzige Option für ein Langzeitüberleben darstellt (Groot et al., 2018; Sperti et al., 1997; Wagner et al., 2004). Selbst nach erfolgreicher Resektion liegt das mediane Überleben jedoch bei nur 18 bis 23 Monaten (Allen et al., 2017; van den Broeck et al., 2009), da über 75 % der Patienten lokale Rezidive oder Metastasen, vornehmlich in Leber, Peritoneum oder Lunge, entwickeln (van den Broeck et al., 2009; Groot et al., 2018; Sperti et al., 1997). Trotz intensiver Forschungsarbeiten konnte in den letzten Jahren kein wesentlicher Fortschritt bei der Therapie und somit bei der Verbesserung des Gesamtüberlebens von PDAC-Patienten erreicht werden (Fokas et al., 2015; Hessmann et al., 2017; Oldfield et al., 2017).

Als Risikofaktor für die Entwicklung eines PDAC ist zum einen ein hohes Alter zu nennen. In Deutschland liegt das mittlere Erkrankungsalter von Männern bei 72, von Frauen bei 75 Jahren (Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017). Nur etwa 5 bis 10 % der Erkrankungen lassen sich auf familiäre Ursachen zurückführen (Becker et al., 2014; Petersen, 2016), wie z. B. Keimbahnmutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* sowie in *Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)*, die mit der Entstehung des PDAC in Verbindung gebracht werden (Hingorani et al., 2003; Makohon-Moore et al., 2017; Petersen, 2016). Auch bei einem familiären Kontext ist das mittlere Erkrankungsalter mit etwa 65 Jahren nur wenig geringer als bei einer sporadischen Entwicklung (Petersen, 2016). Neben genetischen Ursachen gelten vor allem Faktoren des Lebensstils als Risiko für die Entwicklung eines PDAC (Becker et al., 2014; Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017). So trägt Rauchen zu 20 bis 35 % aller PDAC-Erkrankungen bei und verdoppelt das Risiko, ein PDAC zu entwickeln (Bosetti et al., 2012; Iodice et al., 2008). Alkoholkonsum allein scheint hingegen nur in starkem Ausmaß mit der PDAC-Entwicklung assoziiert zu sein, in Kombination mit Rauchen trägt Alkohol allerdings zu einem signifikant erhöhten Erkrankungsrisiko und zu erhöhter Mortalität bei (Gapstur et al., 2011; Rahman et al., 2015). Darüber hinaus werden andauernde und auch akute Entzündungsprozesse als größte Risikofaktoren für das PDAC gesehen (Ahn et al., 2018; Ansari et al., 2018; Grivennikov et al., 2010; Steele et al., 2016). So legen Metaanalysen dar, dass das relative Risiko für die Entwicklung eines PDAC durch chronische Pankreatitis um das 16,2- bzw. 13,3-fache erhöht ist (Kirkegård et al., 2017; Raimondi et al., 2010). Übergewicht und eine hochkalorische oder fettreiche Ernährung scheinen ebenfalls das PDAC-Risiko zu steigern, die zugrunde liegenden Mechanismen werden allerdings noch nicht genau verstanden (Becker et al., 2014; Gukovsky et al., 2013). Da Übergewicht mit inflammatorischen Prozessen assoziiert ist, gilt dieses sowohl als Risikofaktor für Pankreatitis als auch für das PDAC (Gukovsky et al., 2013). Unklar ist allerdings weiterhin, inwieweit es die Tumorentwicklung direkt beeinflusst, auch wenn in einem murinen PDAC-Modell ein Zusammenhang von einer fettreichen Ernährung in Kombination mit genetischen Veränderungen mit einer vermehrten Bildung von Vorläuferläsionen und des PDAC sowie vermindertem Überleben nachgewiesen werden konnte (Philip et al., 2013). Metabolische Veränderungen wie Diabetes mellitus Typ II stellen ebenfalls einen Risikofaktor für die PDAC-Entwicklung dar. So entwickeln etwa 25 bis 50 % aller PDAC-Patienten zuvor einen Diabetes mellitus, jedoch bilden nur 1 % der Diabetes mellitus-Patienten ein PDAC aus (Becker et al., 2014; Huxley et al., 2005; Yadav & Lowenfels, 2013). Weiterhin konnte ein Zusammenhang von *Helicobacter pylori*-Infektionen zum PDAC

hergestellt werden, wobei auch hier die genauen Mechanismen bisher unklar sind (Trikudanathan et al., 2011).

1.1.2 Pathogenese und Pathologie

Das Pankreas kennzeichnet sich durch einen endokrinen und einen exokrinen Teil, in dem sich 95 % der Neoplasien entwickeln (Cid-Arregui & Juarez, 2015; Pelosi et al., 2017). Dabei stellt das PDAC mit einer Prävalenz von etwa 90 % die häufigste Form der Pankreastumore dar (Pelosi et al., 2017).

Die Entstehung des PDAC ist durch genetische Alterationen gekennzeichnet, die sowohl in späten Stadien der Erkrankung detektiert werden können als auch in distinkten Vorläuferläsionen des Gangepithels, die sich in drei Haupttypen unterteilen lassen (Basturk et al., 2015; Distler et al., 2014). Neben den Intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien und Muzinösen zystischen Neoplasien stellen die Pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs) die am besten charakterisierte Gruppe der nicht-invasiven Vorläuferläsionen dar (Distler et al., 2014; Ott et al., 2007). Auch eine Azinär-duktales Metaplasie wird mit der Entstehung des PDAC in Verbindung gebracht (Basturk et al., 2015; Hruban et al., 2008; Pelosi et al., 2017). PanINs entstehen zumeist in Gängen, die kleiner als 0,5 cm sind und lassen sich anhand des Grades ihrer Dysplasie des duktales Epithels morphologisch in drei Gruppen einteilen (Hruban et al., 2001, 2008; Ott et al., 2007). PanIN-1, wiederum in PanIN-1A und -1B aufgeteilt, ist durch säulenartige Epithelzellen charakterisiert, die gleichmäßige Nuklei aufweisen und basal orientiert sind, während sich das PanIN-2-Stadium durch nukleäre Unregelmäßigkeiten kennzeichnet wie den Verlust der Polarität oder Unterschiede in der Größe der Nuklei. PanIN-3-Läsionen weisen die größte Dysplasie auf und sind durch eine papilläre Struktur mit dem Verlust von Zellpolarität und gleichförmigen Nuklei, eine hohe Zahl atypischer Mitosen und auch durch ins Lumen abgeschnürte Zellcluster charakterisiert (Hruban et al., 2001, 2008; Ott et al., 2007). Diese Läsionen stellen ein *Carcinoma in situ* dar, also ein nicht-invasives Karzinom, welches die Basallamina noch nicht durchbrochen hat (Distler et al., 2014; Hruban et al., 2001, 2008).

Mit der Progression der PanIN-Läsionen gehen molekulare Veränderungen in den duktales Pankreasepithelzellen (PDEZ) einher. Eine der frühesten genetischen Veränderungen, die in über 90 % aller PanINs und bereits in PanIN-1-Läsionen nachgewiesen werden kann (Kanda et al., 2012), ist eine aktivierende Punkt-Mutation des Onkogens *kras*, die für das Überleben von

PDAC-Zellen essentiell zu sein scheint und somit auch als *Driver*-Mutation für die PDAC-Entstehung gesehen wird (Eser et al., 2014; Hingorani et al., 2003). Auch Telomer-Verkürzungen treten bereits in einem frühen Stadium der Läsionen auf (van Heek et al., 2002; Hruban et al., 2008), gefolgt von der Inaktivierung von CDKN2A/p16 (in 90 % der PDACs) zumeist in PanIN-2 (Hruban et al., 2008; Pelosi et al., 2017). Weitere häufige Mutationen, die meist mit späteren Stadien assoziiert sind, bewirken eine Inaktivierung des Tumorsuppressors p53, was in 70 % der PDACs detektiert werden kann sowie eine Inaktivierung von SMAD4 in 55 % der PDACs (Distler et al., 2014; Pelosi et al., 2017).

Neben genetischen Veränderungen, die zur Entstehung des PDAC beitragen, werden auch epigenetische Modifikationen beim PDAC beschrieben. So konnte bislang vor allem der Einfluss durch aberrante Methylierungsmuster auf unterschiedliche Gene nachgewiesen werden. Als Beispiel dafür sei *CDKN2A/p16* genannt, welches nicht nur genetisch inaktiviert vorliegen kann, sondern auch durch die Hypermethylierung des Promoters in 15 bis 20 % der PDACs inaktiviert werden kann und dessen Methylierung mit einem kürzeren Überleben von PDAC-Patienten assoziiert ist (Schutte et al., 1997; Tang et al., 2015). Vergleichbar mit genetischen Modifikationen können auch epigenetische Veränderungen wie Hypermethylierungen in CpG-Inseln in frühen PanIN-Stadien entdeckt werden, deren Prävalenz im Verlauf der Progression zunimmt (Sato et al., 2008).

Histopathologisch zeichnet sich das PDAC durch ein ausgeprägtes Tumorstroma aus, das auch als Desmoplasie bezeichnet wird (Kleeff et al., 2007; Neesse et al., 2015; Pelosi et al., 2017). Das Stroma macht bis zu 90 % des PDAC aus und ist durch ein komplexes Zusammenspiel an Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM), Immunzellen, pankreatischen Sternzellen bzw. aktivierten Myofibroblasten, Gefäßen und Neuralzellen, aber auch durch die Sekretion von löslichen Faktoren wie Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) oder *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) gekennzeichnet (Neesse et al., 2015; Pelosi et al., 2017). Inwiefern das Stroma die Tumorprogression beeinflusst, ist bisher unzureichend verstanden. Es konnten bereits Zusammenhänge von Stroma und Wachstum, Differenzierung, Überleben und Motilität von Krebszellen in unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich des PDAC nachgewiesen werden und auch das Therapieansprechen scheint durch das Tumorstroma beeinflusst zu werden (Kleeff et al., 2007; Neesse et al., 2014). Einerseits wird angenommen, dass das Stroma eine Barriere zum Tumor darstellt, die zwar für einen verschlechterten Transport von Sauerstoff und Nährstoffen sorgt, andererseits jedoch auch eine Barriere für Zytostatika darstellt (Neesse et al., 2014; Olive et al., 2009; Xie & Xie, 2015). Vor allem pankreatische Sternzellen, die durch ihre Aktivierung zu

Myofibroblasten transdifferenzieren, scheinen dabei durch die Bildung von ECM-Proteinen sowie einer Vielzahl an inflammatorischen Mediatoren eine wichtige Rolle zu spielen (Hwang et al., 2008; Kleeff et al., 2007; Xie & Xie, 2015). Darüber hinaus konnten ECM-reiche Tumore mit einem kürzeren Überleben von PDAC-Patienten assoziiert werden (Erkan et al., 2008; Neesse et al., 2014). Allerdings wurde in weiteren Studien beispielsweise eine geringere Anzahl an Myofibroblasten mit einem kürzeren Überleben korreliert (Özdemir et al., 2014) und in einem Tiermodell ging die Reduktion des Stromas mit erhöhtem Tumorwachstum und Metastasenbildung einher (Rhim et al., 2014a). Ob das Stroma eher zur Förderung oder Unterdrückung des Tumorwachstums beiträgt, ist bislang also nicht eindeutig geklärt, was auf komplexe Mechanismen der Interaktionen hinweist.

1.1.3 Therapieoptionen und -herausforderungen

Die große Heterogenität und Plastizität von Tumor- und Stromazellen ist mit einer hohen Resistenz des PDAC gegenüber konventionellen und zielgerichteten (*targeted*) Therapieansätzen assoziiert, was zur schwierigen Therapierbarkeit dieser Erkrankung beiträgt (Adamska et al., 2017; Dauer et al., 2017; Hessmann et al., 2017; Neesse et al., 2014). Bis heute stellt die operative Entfernung die beste Möglichkeit einer kurativen Behandlung des PDAC dar, obwohl sich auch trotz adjuvanter Therapie häufig Rezidive und Metastasen entwickeln (van den Broeck et al., 2009; Groot et al., 2018; Sperti et al., 1997; Wagner et al., 2004). Als adjuvante Therapeutika werden das Nukleosidanalogon Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin) und 5-Fluorouracil/Folinsäure eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013), wobei Gemcitabin geringere Nebenwirkungen verursacht und zusätzlich PDAC-assoziierte Symptome verringert (Burriss et al., 1997). Ein Großteil der PDAC-Patienten weist jedoch bereits zum Zeitpunkt der Diagnose ein nicht-resektierbares, fortgeschrittenes Stadium oder Metastasen auf, sodass eine palliative Behandlung die einzige Therapieoption darstellt (Ellenrieder et al., 2016; Pelosi et al., 2017). Als Standardbehandlung für diese Patienten galt in den letzten Jahren ebenfalls die Chemotherapie mit Gemcitabin, welche, verglichen mit der Behandlung mit dem vorangegangenen Standardtherapeutikum 5-Fluorouracil, mit einer Verlängerung des mittleren Überlebens von 4,4 auf 5,6 Monate einhergeht (Burriss et al., 1997). Zur weiteren Verbesserung des progressionsfreien und Gesamtüberlebens wurden unterschiedliche Chemotherapeutika wie Cisplatin, Oxaliplatin oder Irinotecan als Ergänzung zu Gemcitabin in der palliativen Therapie getestet, erreichten in der Klinik jedoch keine

signifikanten Erfolge (Ellenrieder et al., 2016). Auch auf eine Kombinationstherapie von Gemcitabin mit Erlotinib, einem *Small Molecule Inhibitor* des Epithelialer Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptors, spricht nur ein kleiner Teil der Patienten an. Selbst wenn die genauen Mechanismen bislang nicht geklärt sind, geht das Ansprechen dieser Therapie mit einem Hautausschlag einher, der als Indikator für den Therapieerfolg gesehen werden kann und mit einem mittleren Gesamtüberleben dieser Patienten von bis zu 10,5 Monaten assoziiert ist (Moore et al., 2007). 2011 wurde FOLFIRINOX, eine Kombination aus Oxaliplatin, Leucovorin, Irinotecan und 5-Fluorouracil, in einer randomisierten, multi-zentrischen Studie mit der Gemcitabin-Monotherapie in der palliativen Behandlung verglichen. Das mediane Gesamtüberleben nach FOLFIRINOX-Behandlung war mit 11,1 Monaten deutlich verlängert im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie mit 6,8 Monaten (Conroy et al., 2011). Es ging jedoch mit stärkeren Nebenwirkungen einher, sodass heute nur Patienten in einem guten Allgemeinzustand und ohne Komorbiditäten für diese Form der Therapie berücksichtigt werden (Conroy et al., 2011; Gourgou-Bourgade et al., 2013). Eine Alternative zur palliativen PDAC-Behandlung mit FOLFIRINOX besteht in einer Kombinationstherapie aus Gemcitabin und nab-Paclitaxel, welches Paclitaxel mit kovalent gebundenen Albumin-Nanopartikeln darstellt (Von Hoff et al., 2013). 2013 konnte in einer Studie mit dieser Kombination eine Verlängerung des medianen Überlebens von 8,5 gegenüber 6,7 Monaten bei alleiniger Gemcitabin-Therapie festgestellt werden (Von Hoff et al., 2013). Vor allem Patienten mit einem schlechten Allgemeinzustand, einem voluminösen Tumor mit Lebermetastasen oder Metastasen an mehr als drei Orten profitierten von dieser Therapie (Von Hoff et al., 2013). In einem PDAC-Mausmodell bewirkte die Behandlung mit nab-Paclitaxel und Gemcitabin eine erhöhte Gemcitabin-Konzentration im intratumoralen Gewebe und ging mit geringerer Metastasenbildung sowie verlängertem Überleben einher (Frese et al., 2012).

Ähnliche Effekte konnten auch durch die Depletion des Tumorstromas erreicht werden, wie in einem genetisch-modifizierten Mausmodell gezeigt wurde (Olive et al., 2009). In diesem PDAC-Modell ging die Depletion des Tumorstromas mit einer Erhöhung von Perfusion und Gefäßdichte einher, sodass die intratumorale Gemcitabin-Versorgung erhöht war, was zu einem Anstieg im medianen Überleben führte (Olive et al., 2009). In einer weiteren Studie konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten intratumoralen Gemcitabin-Konzentration und der Apoptoserate von Tumorzellen detektiert werden, sodass auch das Tumorwachstum insgesamt nicht beeinflusst war (Neesse et al., 2013).

Trotz intensiver Bemühungen in der Forschung mit unterschiedlichen Ansätzen konnten bislang nur kleine Fortschritte in der PDAC-Therapie erreicht werden. Dies liegt auch darin

begründet, dass bei Diagnosestellung bereits oftmals ein fortgeschrittenes Stadium vorliegt und der Tumor früh metastasiert.

1.2 Maligne Progression

Die Fähigkeit zur lokalen Invasion und Metastasierung von Tumorzellen gilt als eines der *Hallmarks of Cancer* (Hanahan & Weinberg, 2011). Über 90 % der Mortalität von Krebserkrankungen geht auf das Vorhandensein von Metastasen zurück (Valastyan & Weinberg, 2011).

1.2.1 Invasions- und Metastasierungskaskade

Um Metastasen auszubilden, müssen sich Tumor- bzw. Epithelzellen aus ihrem primären Zellverband lösen und auswandern, sich in sekundären Organen ansiedeln und auswachsen (Fidler, 2003). Diese Prozesse der Invasion und Metastasierung können in verschiedene Schritte unterteilt werden, die als Invasions- und Metastasierungskaskade bezeichnet werden (Fidler, 2003; Talmadge & Fidler, 2010). Nach dem Durchbrechen der Basalmembran wandern neoplastische Zellen im Prozess der lokalen Invasion in das umliegende Stroma und Parenchym, bevor die Intravasation in Lymph- oder Blutgefäße folgt. Als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) vorliegend gelangen sie durch das Gefäßsystem zu einem Sekundärorgan, arretieren dort und extravadiieren in das umliegende Parenchym. Für die erfolgreiche Kolonisierung und die Ausbildung von Mikro- und später Makrometastasen ist es notwendig, dass diese disseminierten Tumorzellen (DTCs) sowohl den Einflüssen des Immunsystems und Organ-spezifischen Faktoren entgehen als auch, dass ein Gefäßsystem zur Verfügung steht bzw. entwickelt wird, um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherzustellen (Fidler, 2003; Kang et al., 2011; Talmadge & Fidler, 2010; Valastyan & Weinberg, 2011). Der Prozess der Metastasierung ist kein zellautonomes Vorgehen der neoplastischen Zellen, sondern wird von der Mikroumgebung beeinflusst (Fidler, 2003; Kang et al., 2011; Valastyan & Weinberg, 2011). Schon 1889 postulierte Stephen Paget in seiner *Seed-and-Soil*-Theorie, dass für die Metastasierung von Krebszellen bestimmte Bedingungen im Metastasierungsorgan vorliegen

müssen und verglich dies mit Saat (*seed*), die nur auswachen kann, wenn sie auf fruchtbaren Boden (*soil*) trifft (Paget, 1889).

1.2.2 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT)

Voraussetzung für die Prozesse der malignen Progression sind Veränderungen der zellulären Eigenschaften, wie sie auch in der Entwicklungsbiologie, beispielsweise bei der Gastrulation oder der Bildung der Neuralleiste, als physiologische Antwort auf Verletzungen und Entzündungsprozesse, wie bei der Wundheilung oder der Regeneration von Gewebe, oder der Organfibrose beschrieben werden (Kalluri & Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Im reversiblen Prozess der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) verlieren Zellen ihre epithelialen Eigenschaften, wodurch Zell-Zell-Kontakte gelöst werden und die Polarität der Zellen verloren geht. Dabei nehmen sie einen mesenchymalen Phänotyp an, der mit einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie einer gesteigerten Apoptoseresistenz assoziiert ist (Polyak & Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009). Der experimentelle Nachweis einer EMT erfolgt über die Detektion des Verlusts epithelialer Marker wie E-Cadherin, Occludinen oder Zytokeratinen und die erhöhte Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin, Vimentin oder LICAM (Nieto et al., 2016; Thiery et al., 2009). Aus unterschiedlichen Studien geht jedoch hervor, dass nicht immer eine vollständige EMT von Tumorzellen vorliegt, sondern auch unterschiedliche partielle EMT-Stadien nachgewiesen werden können (Beerling et al., 2016; Chaffer et al., 2016; Chao et al., 2012a; Lambert et al., 2016; Nieto et al., 2016). Darüber hinaus können selbst in verschiedenen Arealen eines Tumors unterschiedliche EMT-Stadien vorliegen, die zu einer Heterogenität der Tumorzellpopulation beitragen (Nieto et al., 2016; Prall, 2007). So konnte bereits gezeigt werden, dass die EMT an der Invasionsfront von Tumoren oder auch Metastasen mit der Abtrennung einzelner E-Cadherin-negativer Zellen oder Zellcluster aus dem Tumor einhergeht (Brabletz et al., 2001). Für die Ansiedlung von DTCs im Sekundärorgan und das Auswachsen von Metastasen scheint der reverse Prozess, die Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET), eine Rolle zu spielen (Thiery et al., 2009; Tsai et al., 2012).

Während DTCs den Prozess der MET auch zu durchlaufen scheinen, wenn EMT-induzierende Signale, wie sie beispielweise in der Umgebung des Primärtumors auftreten, ausbleiben (Gupta et al., 2009; Kalluri & Weinberg, 2009), ist für die Induktion der EMT eine Vielzahl an extrazellulären Signalen von Bedeutung. Damit kommt der Tumormikroumgebung eine

zentrale Rolle in diesem Prozess zu (Chaffer et al., 2016; Polyak & Weinberg, 2009; Thiery & Sleeman, 2006). Dabei wurden nicht nur Signalmoleküle wie TGF- β , Wnt oder Notch, sondern auch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren wie EGF, Hepatozyten-Wachstumsfaktor, FGF oder *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) mit der EMT in Verbindung gebracht, die zur Aktivierung von intrazellulären Effektormolekülen wie z. B. GTPasen führen und so zu Veränderungen des Zytoskeletts und der Zell-Zell-Kontakte der Zellen beitragen. Diese Aktivierung von unterschiedlichen Signalwegen resultiert in der Regulation der EMT auf verschiedenen Ebenen, wobei vor allem das Zusammenspiel von intrazellulären Signalwegen, ausgelöst durch EMT-induzierende Signale, mit Regulatoren der Transkription wie Snail, Twist oder Zeb zu nennen ist (Chaffer et al., 2016; Thiery & Sleeman, 2006). Bekannt ist daneben aber auch die Regulation der EMT durch epigenetische Modifikationen, alternatives Spleißen, Modifikationen in der Stabilität oder der subzellulären Lokalisation von Proteinen (Nieto et al., 2016), wobei der Verlust von E-Cadherin unabhängig des Mechanismus als entscheidender Schritt der EMT gesehen wird (Thiery & Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009). Neben den Veränderungen auf genetischer Ebene kann die Regulation von E-Cadherin zum einen über die Repression seines Promoters durch Faktoren wie Snail oder Zeb verlaufen, zum anderen über eine Unterdrückung der Transkription durch z. B. Twist (Nieto et al., 2016; Yang & Weinberg, 2008). Nicht-kodierende microRNAs (miR) stellen eine weitere Komponente in der Regulation der EMT dar, die zum Teil über die Regulation von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren verläuft (Kalluri & Weinberg, 2009; Polyak & Weinberg, 2009). So inhibieren Mitglieder der miR200-Familie und miR205 Zeb1 und Zeb2, zwei Repressoren der E-Cadherin-Expression, in einem negativen *Feedback-Loop* und tragen so zu einem epithelialen Phänotyp bei (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008). Im Brustkrebs korreliert der Verlust von miR200 außerdem mit einer erhöhten Vimentin- und verminderten E-Cadherin-Expression, also mit einem mesenchymalen Phänotyp (Gregory et al., 2008; Park et al., 2008).

Darüber hinaus beeinflussen auch durch Hypoxie induzierte Signale wie die Hochregulation des Hypoxie-induzierter Faktor-1 α sowie inflammatorische Signale und Zytokine wie *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells* (NF- κ B), Interleukin (IL)-1 β und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) die Regulation der EMT (Chaffer et al., 2016; Kalluri & Weinberg, 2009; Polyak & Weinberg, 2009; Thiery & Sleeman, 2006; Thiery et al., 2009).

1.2.3 Limitierungen in der Effizienz der Invasions- und Metastasierungskaskade

Obwohl über 90 % aller krebsbedingten Todesfälle auf Metastasen zurückzuführen sind, ist der Prozess der Metastasierung sehr ineffizient (Chambers et al., 2002; Labelle & Hynes, 2012; Luzzi et al., 1998). In einem Mausmodell wurde beobachtet, dass nur 0,02 % der Tumorzellen, die intraportal injiziert wurden, zu Makrometastasen auswuchsen (Luzzi et al., 1998).

Im Blutssystem sind CTCs unterschiedlichen Gefahren ausgesetzt. Während der Verlust der Anheftung und Scherspannungen physikalische Herausforderungen bergen, stellt auch die Eliminierung der CTCs durch das Immunsystem, vor allem durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), eine Limitierung der Metastasierung dar (Headley et al., 2016; Labelle & Hynes, 2012; Lambert et al., 2016). Daher bedürfen CTCs verschiedener Überlebensstrategien, um sich entsprechend zu schützen. Zum Beispiel kann eine Interaktion mit Thrombozyten vor der Eliminierung durch NK-Zellen schützen oder eine Interaktion mit Neutrophilen die Adhäsion an Lebersinusoide und dadurch auch die Extravasation erleichtern (Labelle & Hynes, 2012; Lambert et al., 2016). Während im oben genannten Mausmodell des Melanoms von Luzzi et al. etwa 80 % der Tumorzellen extravadiert waren, wuchs nur eine von 40 dieser Zellen zu Mikro- und sogar nur 1 % der Mikro- zu Makrometastasen aus (Luzzi et al., 1998). Die Fähigkeit zum Wachstum in einer sekundären Mikroumgebung kann deshalb als weitere Limitierung der Metastasierung angesehen werden (Lambert et al., 2016; Luzzi et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass schlecht an das sekundäre Mikromilieu angepasste CTCs entweder durch das Immunsystem eliminiert werden oder in ein dormantes Stadium fallen und für das Auswachsen auf Veränderungen im lokalen Mikromilieu angewiesen sind (Ghajar, 2015; Kang et al., 2011; Lambert et al., 2016). Klinisch wird diese Annahme dadurch belegt, dass Metastasen teilweise erst Jahre nach der Entfernung des Primärtumors auftreten (van den Broeck et al., 2009; Groot et al., 2018; Sperti et al., 1997).

1.2.4 Metastasierung im PDAC

Metastasierte Primärtumore weisen bestimmte Metastasierungsmuster auf. So ist der Ort der meisten Metastasen von Adenokarzinomen, inklusive des PDAC, die Leber (Hess et al., 2006). Traditionell gesehen ist die Ausbildung von Metastasen die letzte Stufe der fortschreitenden Tumorprogression (Greaves & Maley, 2012). Genomweite Sequenzanalysen von Primärtumor und Metastasen von PDAC-Patienten zeigen, dass nahezu alle Mutationen, die in Subklonen in

Metastasen auftreten, auch im Primärtumor nachzuweisen sind (Yachida et al., 2010). Eine mathematische Modellierung auf Grundlage dieser Daten weist auf einen Zeitraum von über 20 Jahren zwischen den initialen tumorigenen Veränderungen, der Entstehung von primären Klonen und der Metastasierung bis zum Tod des Patienten hin (Yachida et al., 2010). Aus den Daten dieses Modells schließen die Autoren, dass Metastasen die genetische Vielfalt von Primärtumoren reflektieren und die Disseminierung somit als ein spätes Ereignis der Tumorprogression angesehen werden kann (Yachida et al., 2010).

Whole-genome sequencing-Analysen von Metastasen und korrespondierenden PDAC-Primärtumoren weisen ebenfalls auf identische Mutationen in *Driver*-Genen hin, während *Passenger*-Mutationen, also Veränderungen ohne bekannte funktionelle Auswirkungen auf die PDAC-Tumorigenese, zur intratumoralen Heterogenität beitragen (Makohon-Moore et al., 2017). Diese Erkenntnisse postulieren das Fehlen von spezifischen *Driver*-Mutationen, die für die Metastasenbildung verantwortlich sind, woraus die Autoren auf einen Vorteil für die Therapie schließen, sofern effektive Methoden zur PDAC-Behandlung gefunden werden (Collisson & Maitra, 2017; Makohon-Moore et al., 2017). McDonald et al. erklären die geringe genetische Heterogenität von Primär- und Sekundärtumoren, jedoch trotzdem schlechte Therapierbarkeit, mit dem Auftreten von epigenetischen Veränderungen. Sie konnten nachweisen, dass Chromatin-Modifikationen in der Metastasen-Entwicklung zu veränderten metabolischen Eigenschaften führen, die mit einer erhöhten Tumorigenität assoziiert sind (McDonald et al., 2017).

Dies stellt eine mögliche Erklärung für die klinischen Beobachtungen dar, die sich mit dem Konzept der späten Disseminierung von Tumorzellen jedoch nur schwer in Einklang bringen lassen (Rhim et al., 2012; Valastyan & Weinberg, 2011), da bei den meisten PDAC-Patienten zum Zeitpunkt der Detektion des Primärtumors auch Metastasen nachgewiesen werden können oder eine Entwicklung von Metastasen nach Entfernung des Primärtumors erfolgt, die zum Zeitpunkt der Resektion nicht detektiert werden konnte (van den Broeck et al., 2009; Groot et al., 2018; Sperti et al., 1997). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich bereits in prämaligen PanIN-Stadien zirkulierende und disseminierte pankreatische Zellen finden lassen (Rhim et al., 2012). Dies weist auf eine parallele Entwicklung von Primärtumor und Disseminierung in Sekundärorgane hin. Ähnliche Ergebnisse konnten aus einem Brustkrebs-Mausmodell abgeleitet werden, in dem 80 % der Metastasen auf DTCs aus früh entstandenen Läsionen zurückzuführen waren (Harper et al., 2016; Hosseini et al., 2016).

Neben Peritoneum und Lunge ist die Leber das Hauptmetastasierungsorgan des PDAC (Hess et al., 2006). Während der Einfluss der Lebermikroumgebung auf EMT-Eigenschaften in

Prostata- und Brustkrebszellen bereits nachgewiesen werden konnte (Chao et al., 2010; Yates et al., 2007), ist dies im PDAC bislang wenig untersucht. Die Lebermikroumgebung wird sowohl durch nicht-zelluläre Faktoren wie TGF- β , PDGF, ECM oder proteolytische Enzyme als auch durch zelluläre Komponenten bestimmt (Brodt, 2016; Kang et al., 2011). Hepatozyten stellen die größte Population der Leberzellen dar und machen zusammen mit Cholangiozyten rund 70 % der Leberzellen aus (Clark et al., 2016). Durch den Einfluss von Hepatozyten konnten *in vitro* Steigerungen der E-Cadherin-Expression in Prostata- und Brustkrebszellen beobachtet werden (Chao et al., 2010; Yates et al., 2007), die möglicherweise zu einem Überlebens- oder Wachstumsvorteil in der Lebermikroumgebung beitragen (Yates et al., 2007). Neben Hepatozyten bestimmen hepatische Sternzellen (HSC) und ihre aktivierte Form, hepatische Myofibroblasten (HMF), die hepatische Mikroumgebung (Friedman, 2008; Geerts, 2001; Kang et al., 2011; Proell et al., 2005). Sie machen etwa 5 bis 8 % der zellulären Bestandteile der Leber aus (Geerts, 2001) und spielen eine wichtige Rolle bei der Leberhomöostase, Entzündungsprozessen sowie Verletzungen (Proell et al., 2005, 2007; Weiskirchen & Tacke, 2014). Die spindelförmigen HSC kommen in der physiologischen Leber im perisinusoidalen Raum, auch Disse-Raum genannt, zwischen Hepatozyten und den sinusoidalen Endothelzellen vor und zeichnen sich durch die zytoplasmatische Speicherung von Vitamin A aus (Friedman, 2008). Während einer Leberverletzung oder -entzündung transdifferenzieren HSC in hochproliferative und motile HMF, die durch die Bildung von Zytokinen wie TGF- β , Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ECM-Komponenten wie Kollagen I charakterisiert sind (Friedman, 2008; Kang et al., 2011; Proell et al., 2005, 2007). Darüber hinaus scheinen HMF für die Ausbildung einer prämetastatischen Nische von Bedeutung zu sein (Eveno et al., 2015; Grünwald et al., 2016). In einem Tumormodell zum Kolorektalkarzinom waren schon Mikrometastasen von einem Netzwerk aus HMF und Laminin umgeben und die Koinjektion von Tumorzellen mit HMF führte zu einer größeren Zahl an Lebermetastasen als von Tumorzellen alleine (Eveno et al., 2015).

Zur Entstehung einer prämetastatischen Nische scheinen jedoch nicht nur Komponenten aus der Leber selbst, sondern auch vom Primärtumor abgeleitete Faktoren beizutragen (Costa-Silva et al., 2015; Grünwald et al., 2016). Costa-Silva et al. konnten zeigen, dass die Aufnahme von PDAC-abgeleiteten Exosomen durch Kupffer-Zellen in der Leber zu einer erhöhten Sekretion von TGF- β führte und dadurch eine verstärkte Fibronectin-Produktion durch aktivierte HSCs ausgelöst wurde. Durch das Fibronectin wurden vermehrt Makrophagen aus dem Knochenmark und Neutrophile in der Leber arretiert, die so zur Bildung der prämetastatischen Nische beitrugen. *Migration Inhibitory Factor* (MIF) war in den PDAC-Exosomen stark exprimiert

und seine Blockierung verhinderte die Freisetzung von TGF- β durch die Kupffer-Zellen, somit die Bildung der prämetastatischen Nische und das Auswachsen von Metastasen (Costa-Silva et al., 2015).

Grünwald et al. konnten die Aktivierung von HSCs mit der Expression von *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1* (TIMP1) in Gewebe von Chronischer Pankreatitis, PanINs und auch PDAC in Zusammenhang bringen. Dabei führte TIMP1 zur Aktivierung von HSCs, deren *Stromal Cell-derived Factor-1*-Sekretion wiederum zur Rekrutierung von Neutrophilen führte (Grünwald et al., 2016). Die Entstehung einer prämetastatischen Nische kann somit schon in einem prämaligen Stadium gefördert werden, was Aufschluss darüber gibt, wie sich bereits prämalige PDEZ in der Leber ansiedeln können (Grünwald et al., 2016; Rhim et al., 2012).

1.3 Krebsstammzellen und ihre Eigenschaften

Da Tumore ein kontinuierliches Wachstum zeigen, wurde postuliert, dass die Tumormasse aus einer kleinen Anzahl an Stammzellen entsteht, die eine ähnliche Funktion erfüllen wie adulte Stammzellen in Geweben wie Darm oder im hämatopoetischen System (Aponte & Caicedo, 2017; Batlle & Clevers, 2017). Diese adulten Stammzellen zeichnen sich durch Langlebigkeit und kontinuierliche Selbsterneuerung aus, aus der differenzierte kurzlebige Zellen hervorgehen, die die Organfunktion ausmachen (Batlle & Clevers, 2017). Der erste Nachweis von Krebsstammzellen (CSC) erfolgte in Leukämien (Batlle & Clevers, 2017; Bonnet & Dick, 1997; Clarke et al., 2006; Hanahan & Weinberg, 2011). CSCs wurden später jedoch auch in soliden Tumoren wie Brust-, Prostata-, Hirntumoren und dem PDAC identifiziert (Al-Hajj et al., 2003; Bonnet & Dick, 1997; Kise et al., 2016; Li et al., 2007; Patrawala et al., 2006; Singh et al., 2004), in denen ihnen ein Beitrag zu Tumorigenität, Tumorprogression, Metastasierung, Rezidivbildung und auch zur Therapieresistenz nachgewiesen wurde (Aponte & Caicedo, 2017; Batlle & Clevers, 2017; Herreros-Villanueva et al., 2014; Valle et al., 2018; Zhao et al., 2017).

1.3.1 Konzept der Krebsstammzellen

CSCs gelten als kleine Tumorzellpopulation, deren Zellen in der Lage zur asymmetrischen Teilung sind, sich also selbst zu erneuern, aber auch differenzierte Tumorzellen

hervorzubringen und so zur Heterogenität eines Tumors beizutragen (Batlle & Clevers, 2017; Fulawka et al., 2014; Han et al., 2013). Diese Heterogenität kann sich dabei unter anderem auf die Morphologie, die Proliferationsrate, den Metabolismus oder die Fähigkeit zur Metastasierung beziehen und lässt sich auf genomische Instabilität in der Tumorprogression, eine hierarchische Organisation des Tumorgewebes mit Zellen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung oder auf Einflüsse der Mikroumgebung zurückführen (Fulawka et al., 2014; Hanahan & Weinberg, 2011). Ein weiteres Kennzeichen von CSCs stellt ihre ausgeprägte Therapieresistenz dar (Batlle & Clevers, 2017; Valle et al., 2018; Zhou et al., 2017). Viele Therapieoptionen wie beispielsweise eine Chemotherapie zielen darauf ab, die Anzahl an proliferierenden Tumorzellen zu vermindern. Selbst wenn die Hauptpopulation der Tumorzellen durch eine solche Therapie eliminiert werden kann, kommt es in vielen Fällen zur Entwicklung von lokalen Rezidiven oder Metastasen. Für dieses Auswachsen können chemoresistente proliferierende Tumorzellen oder Zellen, die zum Zeitpunkt der Therapie in einem Ruhestadium vorlagen, verantwortlich sein (Aponte & Caicedo, 2017; Batlle & Clevers, 2017; Fulawka et al., 2014). Diese Zellen können entweder intrinsische Resistenzmechanismen aufweisen, die zum Fortbestehen unter Therapie beitragen, oder durch extrinsische Signale aus der Mikroumgebung Resistenzmechanismen entwickeln (Aponte & Caicedo, 2017; Fulawka et al., 2014; Nassar & Blanpain, 2016). Schon Hermann et al. konnten bei der Beschreibung von pankreatischen CSCs eine erhöhte Gemcitabin-Resistenz dieser Zellen gegenüber Nicht-CSCs feststellen (Hermann et al., 2007). Dies konnte später für CSCs verschiedener PDAC-Zelllinien bestätigt werden, da CSCs stärker resistent gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutika waren als die Gesamtpopulationen der Zelllinien, aus denen diese CSCs generiert wurden (Dalla Pozza et al., 2015).

Das Konzept der CSCs lässt sich funktionell überprüfen, da (humane) CSCs als Zellen angesehen werden, die in geringer Zellzahl in der Lage sind, in immundefizienten Tieren Tumore zu initiieren (Fulawka et al., 2014; Hanahan & Weinberg, 2011). *In vitro* zeichnen sich CSCs unter anderem durch ihre Fähigkeit zum Wachstum unter nicht-adhärenenten Bedingungen aus sowie durch ihre Eigenschaft, aus Einzelzellen Kolonien bilden zu können (Franken et al., 2006; Han et al., 2013). In diesen *Colony Formation Assays* (CFA) lassen sich drei Kolonieformen unterschiedlicher Morphologie unterscheiden (Beaver et al., 2014; Li et al., 2007; Tan et al., 2011). Während Holoklone, die als Kolonieform mit der größten Anzahl an CSCs gelten, aus kleinen, dicht gepackten, homogenen Zellen mit einer klaren und regelmäßigen Begrenzung bestehen, zeichnen sich Paraklone, die durch weiter differenzierte Zellen gekennzeichnet sind, durch verstreut liegende Zellen mit unregelmäßiger oder zerteilter

Begrenzung aus (Beaver et al., 2014; Tan et al., 2011). Meroklone bilden eine Zwischenstufe dieser beiden Kolonieformen (Beaver et al., 2014; Tan et al., 2011) und unterscheiden sich von Holoklonen vor allem in ihrem geringeren Anteil an CSCs (Beaver et al., 2014). Studien dieser Kolonieformen *in vitro* machten deutlich, dass Zellen aus einem Holoklon in der Lage sind, differenzierte Zellen hervorzubringen. Auch Zellen aus Meroklonen sind in der Lage, alle drei Kolonieformen zu bilden, wobei Holoklone allerdings nur vereinzelt geformt werden (Beaver et al., 2014; Tan et al., 2011). Dies deutet nicht nur auf heterogene Zellpopulationen innerhalb der Klone, sondern auch auf eine Plastizität dieser Zellen hin.

Die Detektion von CSCs im PDAC erfolgte in einem murinen Xenotransplantationsmodell, in dem eine tumorigene Subpopulation von PDAC-Zellen nachgewiesen werden konnte, die durch die Expression der Marker *Cluster of Differentiation 24* (CD24), CD44 und Epitheliales Zelladhäsionsmolekül gekennzeichnet war (Li et al., 2007). Hermann et al. konnten eine Population von CD133- und CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4)-positiven Zellen an der Invasionsfront von humanen PDAC-Geweben ausmachen. In einem Mausmodell machte die Depletion dieser Proteine keinen Unterschied in der Tumorigenität der verwendeten PDAC-Zellen aus, jedoch wurde deutlich, dass diese Proteine für die Metastasierung des PDAC essentiell waren (Hermann et al., 2007). Neben diesen Markern wurden in unterschiedlichen Studien auch weitere Marker wie das Membranprotein *ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2* (ABCG2), zytoplasmatische Proteine wie Nestin und Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) oder Transkriptionsfaktoren wie Nanog, Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 (Oct4) und *Sex-determining Region Y-Box 2* (Sox2) für die Detektion von CSCs im PDAC verwendet (Herreros-Villanueva et al., 2014; Kure et al., 2012; Neradil & Veselska, 2015). Dies deutet wiederum auf eine große Heterogenität und auch Plastizität dieser Zellen hin und macht funktionelle Untersuchungen wie CFAs unerlässlich (Han et al., 2013).

1.3.2 CSC-Marker Nanog und Nestin

Der Homöobox-Domäne-Transkriptionsfaktor Nanog spielt für das Selbsterneuerungspotential und die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Status von embryonalen und induziert pluripotenten Stammzellen eine wichtige Rolle (Gawlik-Rzemieniewska & Bednarek, 2016; Jeter et al., 2015). In der Regulation dieser Prozesse agiert Nanog in komplexen Interaktionen mit Faktoren wie Oct4, Sox2 oder KLF4 (Gawlik-Rzemieniewska & Bednarek, 2016; Jeter et al., 2015). Neben seiner Rolle in der Entwicklungsbiologie konnte die Expression von Nanog

bereits in diversen humanen Tumorentitäten nachgewiesen werden und wurde dabei experimentell mit erhöhter Tumorigenität, klonalem Tumorwachstum, Invasivität und Therapieresistenz in Verbindung gebracht (Jeter et al., 2015). Durch die Überexpression von Nanog in Zellen des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) konnte überdies eine Verbindung zur EMT hergestellt werden (Sun et al., 2013; Yin et al., 2015). Auch für die Entwicklung des PDAC scheint Nanog von Bedeutung zu sein, denn eine gleichzeitige Herunterregulierung von Nanog und Oct4 wurde in PDAC-Zellen mit verminderter Proliferation, Migration, Invasion, Chemoresistenz und Tumorigenität *in vitro* und *in vivo* assoziiert (Lu et al., 2013). Weiterhin ging eine starke Expression von Nanog und Oct4 in einem PDAC-*Tissue Microarray* mit einer schlechteren Prognose und einem kürzeren Überleben einher (Lu et al., 2013). Der Beitrag von Nanog zur Tumorprogression wurde jedoch vor allem im Zusammenhang mit weiteren Faktoren wie z. B. Oct4 oder Wnt-1 beobachtet, sodass Nanog nicht die Rolle eines klassischen Onkogens zu übernehmen scheint, sondern eher als Faktor gesehen werden kann, der in Kooperation eine verstärkte protumorigene Wirkung auslöst (Jeter et al., 2015).

Nestin zählt zu den Intermediärfilamenten Typ VI und scheint neben seiner Rolle im Zytoskelett zur Regulation der Proliferation beizutragen. Dies geschieht durch Phosphorylierung und Reorganisation von Vimentin sowie durch Modulation der Aktivität der proapoptotischen Cyclin-abhängigen Kinase 5 (Chou et al., 2003; Sahlgren et al., 2003, 2006). Die Expression von Nestin wurde zuerst in der Entwicklung von spezifischen Regionen des zentralen Nervensystems sowie in nicht-neuronalen Zellen des peripheren Nervensystems beschrieben, weshalb es vor allem als Marker für neuronale Stamm- und Vorläuferzellen gilt (Lendahl et al., 1990; Neradil & Veselska, 2015). Es konnte jedoch auch in Krebszellen von unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich des PDAC detektiert werden (Krupkova et al., 2010). Humane PDAC-Proben weisen in 5 bis 46 % eine hohe Nestin-Expression auf (Kawamoto et al., 2009; Kim et al., 2012; Ohike et al., 2007; Yang et al., 2008), die im Gegensatz zur Expression in anderen Tumortypen allerdings nicht mit dem klinischen Verlauf in Verbindung zu stehen scheint (Kim et al., 2012; Krupkova et al., 2010; Lenz et al., 2011; Neradil & Veselska, 2015). In mehreren Studien konnte hingegen nachgewiesen werden, dass die Herunterregulierung von Nestin eine verminderte Migrations- und Invasionsfähigkeit in Zelllinien des PDAC bewirkt und mit einem verminderten Tumorwachstum sowie einer verminderten Metastasenbildung *in vivo* einhergeht (Matsuda et al., 2011, 2014, 2015; Su et al., 2013). Dies scheint mit den Phosphorylierungsleveln von Nestin an Threonin 315 und Threonin 1299 zusammenzuhängen (Matsuda et al., 2017). Weiterhin äußert sich die

gleichzeitige Herunterregulierung von Nestin und die Behandlung von PDAC-Zellen mit Gemcitabin in einer verminderten Viabilität dieser Zellen, sodass Nestin auch eine Rolle in der Chemoresistenz zuzukommen scheint (Matsuda et al., 2015).

Unterschiedliche PDAC-Zelllinien sowie metastatische Zellen in PDAC-Mausmodellen waren neben einer erhöhten Expression von CSC-Markern wie Nestin, ABCG2 und ALDH auch durch die verminderte Expression des Epithelmarkers E-Cadherin charakterisiert, was auf eine Verbindung zwischen der CSC-Marker-Expression und EMT hindeutet (Hagio et al., 2013; Matsuda et al., 2014; Su et al., 2013).

1.3.3 EMT-Eigenschaften und Plastizität von Krebsstammzellen

Mani et al. waren die ersten, die zeigen konnten, dass Brustkrebszellen, die im Zuge einer EMT mesenchymale Eigenschaften angenommen haben, auch durch einen CSC-Phänotyp gekennzeichnet sind und umgekehrt, dass CSCs solchen Zellen ähneln, die sich durch einen EMT-Phänotyp auszeichnen (Mani et al., 2008). Auch in PDAC-Zelllinien geht eine Herunterregulierung des CSC-Markers Nestin mit einer verminderten Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie einer verstärkten Expression epithelialer, bei gleichzeitiger Verminderung mesenchymaler Marker einher (Su et al., 2013). Entgegen des klassischen, hierarchischen CSC-Modells, in dem CSCs eine stabile Zellpopulation darstellen, weisen mehrere Studien darauf hin, dass CSC-Eigenschaften spontan oder in Abhängigkeit der Mikroumgebung erworben bzw. verloren werden können (Andriani et al., 2016; Chaffer et al., 2011, 2013; Mani et al., 2008; Schwitalla et al., 2013). Diese bidirektionale Veränderung des CSC-Phänotyps konnte auch für pankreatische CSCs nachgewiesen werden (Dalla Pozza et al., 2015), wobei die Plastizität durch Einflüsse der Mikroumgebung wie z. B. TGF- β bedingt werden kann, die auch den EMT-Phänotyp dieser Zellen modulieren (Andriani et al., 2016; Chaffer et al., 2013; Mani et al., 2008). Darüber hinaus konnte für den EMT-Transkriptionsfaktor *Zeb1* bereits eine Verbindung zwischen EMT- und CSC-Phänotyp in Tumorzellen hergestellt werden (Chaffer et al., 2013; Krebs et al., 2017). In einem PDAC-Mausmodell ging die Depletion von *Zeb1* mit einem verminderten CSC-Potential sowie verminderter Plastizität der Tumorzellen einher, was sich unter anderem auf die Bildung von Vorläuferläsionen und Metastasen auswirkte (Krebs et al., 2017). Diese Ergebnisse deuten auf *Zeb1* als einen wesentlichen Faktor für die Initiierung von metastatischem Wachstum hin (Krebs et al., 2017). De Cock et al. konnten beobachten, dass eine inflammatorische

Mikroumgebung mit einer erhöhten Zeb1-Expression assoziiert ist (De Cock et al., 2016). In ihrer Studie ging das Auswachsen von zuvor inokulierten, latenten, disseminierten Mammakarzinomzellen in der Lunge mit dem Auftreten von Entzündungsprozessen und dies wiederum mit einer Zeb1- und Twist-abhängigen EMT-Induktion einher. Dies führte zur Bildung von Zellen mit CSC-Eigenschaften und zum Auswachsen von Metastasen (De Cock et al., 2016). Das CSC-Potential von intestinalen Epithelzellen wurde ebenfalls mit Entzündungsprozessen in Zusammenhang gebracht, wobei die Expression von CSC-Markern unter inflammatorischen Bedingungen mit der Aktivierung von Wnt durch NF- κ B korreliert war (Schwitalla et al., 2013).

Inwieweit die Metastasierung des PDAC durch CSC-Eigenschaften der disseminierten Zellen beeinflusst wird und welche Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist bislang wenig verstanden.

1.4 Zielsetzung

Trotz intensiver Forschungsarbeiten gilt das PDAC als Tumorerkrankung, bei der die Inzidenz der Erkrankung nahezu ihrer Mortalität gleicht (Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017; Siegel et al., 2018). Ein Großteil der Patienten weist bereits zum Zeitpunkt der Diagnose Lebermetastasen auf, sodass nur eine palliative Behandlung in Frage kommt und selbst nach erfolgreicher Resektion des Primärtumors und adjuvanter Chemotherapie kommt es oftmals zur Entwicklung von lokalen Rezidiven oder Metastasen (van den Broeck et al., 2009; Groot et al., 2018; Sperti et al., 1997), vornehmlich in der Leber (Hess et al., 2006). Das frühe Auftreten von Metastasen trägt zur niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate des PDAC von unter 10 % bei (Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017; Siegel et al., 2016). Zirkulierende und disseminierte PDEZ können bereits in prämaligen PanIN-Stadien nachgewiesen werden, noch bevor ein Primärtumor detektiert werden kann (Rhim et al., 2012).

Der Einfluss von hepatischen Stromazellen auf die Ausbildung von Metastasen des PDAC ist bisher wenig untersucht. Für Hepatozyten, der Hauptzellpopulation in der Leber, konnte jedoch *in vitro* bereits nachgewiesen werden, dass sie den Wiedererhalt von epithelialen Eigenschaften in Mamma- und Prostatakarzinomzellen fördern und so möglicherweise ein Anwachsen von disseminierten Tumorzellen in der Leber erleichtern (Chao et al., 2010, 2012b; Yates et al., 2007).

Inflammatorische Prozesse werden mit der Entwicklung des PDAC in Verbindung gebracht, der Zusammenhang zur Metastasierung ist bisher hingegen wenig untersucht (Ansari et al.,

2018; Guerra et al., 2007; Steele et al., 2016). Studien von anderen Tumorentitäten weisen jedoch auf einen Einfluss von Entzündungsprozessen auf die Ausbildung von Metastasen hin (De Cock et al., 2016; Grivennikov et al., 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). Neben Hepatozyten stellen HSC und aus ihnen transdifferenzierte HMF Stromazellen in der Leber dar, die in Prozesse der Antwort auf Leberverletzungen und in Entzündungsreaktionen involviert sind. In einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe konnte bereits ein Einfluss der Leberumgebung auf PDEZ bezüglich ihres Dormanz- und Proliferationsverhaltens *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden. Dabei ging eine inflammatorische Mikroumgebung, *in vitro* durch ein Kokulturmodell von PDEZ mit HMF dargestellt, mit einem verminderten ruhenden Phänotyp und verstärkter Proliferation der PDEZ einher und löste *in vivo* verstärktes Metastasenwachstum aus (Lenk et al., 2017). Eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung, -progression und Therapieresistenz scheinen CSCs zu spielen. Populationen dieser Zellen, die sich durch ihr Selbsterneuerungspotenzial auszeichnen, konnten bereits in mehreren Tumorentitäten inklusive des PDAC nachgewiesen werden (Batlle & Clevers, 2017; Hermann et al., 2007). Unklar ist jedoch, welche Bedeutung ihnen im Prozess des Auswachsens von Metastasen, insbesondere beim PDAC, zukommt.

Insgesamt ist demnach wenig darüber bekannt, welchen Einfluss die Lebermikroumgebung auf das Auswachsen von prämaligen und malignen PDEZ, insbesondere hinsichtlich ihrer EMT- und CSC-Eigenschaften, nimmt und wurde daher in dieser Studie untersucht. Dafür wurde ein indirektes Kokultursystem verwendet, in dem PDEZ zum einen einer physiologischen, zum anderen einer inflammatorischen Mikroumgebung ausgesetzt wurden. Hepatozyten alleine oder mit 5 % HSC angereicherte Hepatozyten stellten dabei ein physiologisches Milieu dar, während eine inflammatorische Leberumgebung durch mit 5 % HMF angereicherte Hepatozyten simuliert wurde. Zur Berücksichtigung des zeitlichen Aspekts der Metastasierung wurde zum einen die prä maligne Zelllinie H6c7-*kras* eingesetzt, die sich durch eine *kras*-Mutation als einzige PDAC-assoziierte genetische Veränderung auszeichnet, zum anderen wurde die Zelllinie Panc1 als Modell für maligne PDEZ verwendet. EMT- und CSC-Eigenschaften wurden auf RNA- und Proteinebene sowie funktionell untersucht. Darüber hinaus wurde das tumorigene Potenzial von PDEZ mit unterschiedlichen CSC-Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* charakterisiert.

Nur durch ein besseres Verständnis der Metastasierung, des Einflusses von Stromazellen auf disseminierte Zellen in der Leber sowie der zeitlichen Abfolge dieser Prozesse ist es möglich, eine Verbesserung der Therapie des PDAC zu erreichen und für ein längeres und besseres Leben der Patienten zu sorgen.

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

2.1.1 Pipetten

Pipette	Hersteller
Finnpipette F1 0,2-2 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 1-10 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 2-20 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 20-200 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 100-1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Macro Pipette Controller	Brand, Wertheim, DE
Pipetboy-Acu	Integra Biosciences, Fernwald, DE

2.1.2 Zentrifugen

Zentrifuge	Hersteller
Heraeus Biofuge pico	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, DE
Sprout Mini Zentrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, US

2.1.3 Sterilwerkbänke

Sterilwerkbank	Hersteller
HERA Safe	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
HERA Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.1.4 Inkubatoren

Inkubator	Hersteller
BBD 6220 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
GyroTwister 3D Schüttler	Labnet, Woodbridge, US
HERA Cell 240 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
PMS 1000 Mikroplatten-Schüttler	Grant bio, Essex, UK
QBA1 Tischinkubator	Grant, Cambridge, UK
Stuart SRT9 Rollenmischer	Bibby Scientific Ltd., Stone, UK
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, DE
WTC ED-53 Inkubator	Binder, Tuttlingen, DE

2.1.5 Messgeräte

Messgerät	Hersteller
Fusion SL Detektionssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Infinite® 200 PRO Mikroplatten-Reader	Tecan, Crailsheim, DE
LightCycler® 480 II	Roche, Basel, CH
NanoQuant Platte	Tecan, Crailsheim, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Koenigshofen, DE
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, DE
Vevo770® High-Resolution <i>in vivo</i> Imaging System	FujiFilm VisualSonics Inc., Toronto, CA

2.1.6 Mikroskope

Mikroskop	Hersteller
AE2000	Motic, Wetzlar, DE
Axio Scope.A1	Zeiss, Jena, DE
Axioskop 40	Zeiss, Jena, DE
Axiovert 25	Zeiss, Jena, DE
BZ-9000 II	Keyence, Osaka, JP
Evos XL Core Cell Imaging System	AMG, Bothell, US
NyONE	Syntec, Elmshorn, DE

2.1.7 Histologiezubehör

Histologiezubehör	Hersteller
FS20 MultiGourmet	Braun, Aschaffenburg, DE
Heizplatte 100 °C	Jürgens, Bremen, DE
HM430 Mikrotom	Thermo Fisher, Darmstadt, DE
Mikrotom-Klinge C-35	Feather Safety Razor, Osaka, JP
Paraffin Streckbad	Medax, Neumünster, DE
TES 99 Paraffin embedding system	Medite, Burgdorf, DE

2.1.8 Waagen

Waage	Hersteller
Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

2.1.9 Weitere Geräte

Gerät	Hersteller
ARPEGE 110 Stickstofftank	AirLiquide, Paris, FR
CS-300V Power supply	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
HERAfreeze Basic freezer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, DE
MILLI-Q Reagent Water System	Merck Millipore, Billerica, US
MR Hei-Mix S Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
OmniPAGE VS10D Gelkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
SD20 Semi Dry Maxi Transferkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
Sonopuls Ultraschall-Homogenisator	Bandelin, Berlin, DE
Sunrise remote control	Tecan, Crailsheim, DE
VORTEX GENIUS 3 Vortex-Mischer	IKA-Werke, Staufen, DE
xCELLigence RTCA DP	ACEA Biosciences, San Diego, US

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,05 ml, 0,5 ml, 1,25 ml, 5,0 ml Ritips®	Ritter, Schwabmünchen, DE
0,1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Sarstedt, Nuembrecht, DE
Pipettenspitzen	
1,5 ml, 2 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
15 ml, 50 ml Zentrifugengefäße	Sarstedt, Nuembrecht, DE
18 mm Deckgläschen	Menzel, Braunschweig, DE
5 ml, 10 ml, 50 ml Serumpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
6-, 12-, 96-Well-Platten, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
6-, 12-Well ThinCert™ Zellkultur-Einsätze, Porengröße 0,4 µm (Transwells)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
96-Well-PCR-Platte, weiß	Roche, Basel, CH
96-Well-Platte, transparent	Sarstedt, Nuembrecht, DE
96-Well-Platte, weiß	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
CIM-Plate 16	ACEA Biosciences, San Diego, US
CryoPure Gefäß, 1,0 ml, weiß	Sarstedt, Nuembrecht, DE
Micro-Touch Nitril Handschuhe	Ansell, München, DE
Nalgene™ Rapid-Flow™ Sterile Einweg- Filtrationsgeräte mit SFCA-Membran (Porengröße 0,2 µm)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Parafilm M	Brand, Wertheim, DE
RA Lamb Deckglas und Färbegestell zum Eindecken	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
SuperFrost Objektträger, 76 x 26 mm	Menzel, Braunschweig, DE
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nuembrecht, DE
Uhrmacher-Pinzette Nr. 6	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Wattestäbchen	NOBA Verbandmaterial Danz, Wetter, DE
Westran Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran 0,45 µm	Th.Geyer GmbH, Renningen, DE
Whatman-3MM Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen Cellstar® TC, 25 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellkulturflaschen Cellstar® TC, 75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nuembrecht, DE

2.3 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Gele

2.3.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DE
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, München, DE
AEC Substrate-Chromogen	Dako Diagnostika, Hamburg, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V	Biomol, Hamburg, DE
Bromphenolblau	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Citronensäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, München, DE
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Essigsäure 10 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethanol 99 %, vollvergällt	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Ethanol, reinst	Merck Millipore, Darmstadt, DE
FluorSave Reagenz	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, DE
Grams Kristallviolettlösung	Merck Millipore, Darmstadt, DE
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, DE
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kollagen (<i>from calf skin</i>)	Sigma-Aldrich, München, DE
Kollagen (<i>rat tail</i>)	Roche, Basel, CH
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Mayer's Hämalun	Applichem, Darmstadt, DE
Methanol	Th.Geyer GmbH, Renningen, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Nagellack Pro Shine Base Coat	Manhattan, Paris, FR
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natronlauge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra-pur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumorthovanadat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Chemikalie / Reagenz (Fortsetzung)	Hersteller (Fortsetzung)
Paraformaldehyd (PFA) 4,5 % (w/v)	BUEFA Chemikalien GmbH Co. KG, Hude, DE
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	PAA, Pasching, AT
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	PAA, Pasching, AT
Rotiphorese gel 40 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid/Bisacrylamid 40 % Lösung (PAA)	
Salzsäure 1,0 M	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Sudan Black B	Sigma-Aldrich, München, DE
SuperSignal West Dura Substrat	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypanblau Lösung Fluka 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	PAA, Pasching, AT
Tween 20	Serva, Heidelberg, DE
Wasserstoffperoxid 30 %	Th.Geyer GmbH, Renningen, DE
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

2.3.2 Pufferzusammensetzungen

Puffer	Zusammensetzung
Blotto	50 g/l Milchpulver in TBS-T (1x)
Citratpuffer (10x)	20 mM Citronensäure 82 mM Tri-Natriumcitrat Dihydrat pH 6,0
Citratpuffer (1x)	10 % (v/v) Citratpuffer (10x) 0,05 % (v/v) Tween 20 pH 6,0
Ladepuffer (4x)	0,005 % (w/v) Bromphenolblau 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in Laemmli-Puffer (2x)
Laemmli-Puffer (2x)	128 mM Tris-Base 4,6 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 1 mM Natriumorthovanadat pH 7,6

Puffer (Fortsetzung)	Zusammensetzung (Fortsetzung)
PBS (10x)	1,37 M NaCl 26,8 mM KCl 97,8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 17,6 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-Tween (PBS-T)	10 % (v/v) PBS (10x) 0,05 % (v/v) Tween 20
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
Tris-gepufferte Saline (TBS; 10x)	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl pH 7,6
TBS-Tween (TBS-T)	10 % (v/v) TBS (10x) 0,05 % (v/v) Tween 20
Transferpuffer A	300 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 11
Transferpuffer B	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol pH 10,6
Transferpuffer C	25 mM Tris-Base 20 % (v/v) Methanol 40 mM 6-Aminocapronsäure pH 10,6
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8
Western Blot-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

2.3.3 Zusammensetzung der Western Blot-Gele

Western Blot-Gel	Zusammensetzung
Sammelgel	1575 μ l Aqua dest. 625 μ l Sammelgel-Puffer 250 μ l PAA 13 μ l 10 % APS 2,5 μ l TEMED
Trenngel (10 %)	3 ml Aqua dest. 1,5 ml Trenngel-Puffer 1,5 ml PAA 22 μ l 10 % APS 4,4 μ l TEMED

2.4 Material und Reagenzien für zellbiologische Untersuchungen

2.4.1 Primäre Zellen und Zelllinien

Primäre Zellen und Zelllinie	Information und Herkunft
Primäre hepatische Zellen	
Hepatozyten	Murine primäre Hepatozyten wurden aus sechs bis zwölf Wochen alten C57BL/6-Mäusen isoliert (Klingmüller et al., 2006). Die Zellen wurden von Prof. Hengstler (Leibniz-Institut für Arbeitsforschung, Technische Universität Dortmund, Dortmund, DE) zur Verfügung gestellt.
Hepatische Zelllinie	
M1-4HSC (HSC)	Murine HSC-Linie, die aus p19 ^{ARF} Null-Mäusen isoliert wurde, spontan immortalisierte und einen Phänotyp von früh-aktivierten HSCs darstellt (Proell et al., 2005). Die Zellen wurden von Prof. Mikulits (Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien, Wien, AT) zur Verfügung gestellt.
M-HT (HMF)	Murine M1-4HSC-Linie, die durch die Langzeit-Behandlung mit TGF- β 1 (1 ng/ml für mindestens drei Wochen) zu hepatischen Myofibroblasten transdifferenziert (Proell et al., 2005).

Primäre Zellen und Zelllinie (Fortsetzung)	Information und Herkunft (Fortsetzung)
Pankreatische Zelllinie	
H6c7eR-Kr (H6c7-kras)	Humane Pankreasgangepithel (HPDE)-Zelllinie, die durch HPV16-E6E7 immortalisiert und mit dem retroviralen Vektor pBabepuro-K- <i>ras</i> 4B ^{G12V} transduziert wurde (Qian et al., 2005). PDAC-relevante Mutation: <i>kras</i> Die Zellen wurden von Dr. Tsao (Institut für Pathologie, Montreal General Hospital, Montreal, CA) zur Verfügung gestellt.
Panc1	Maligne PDEZ-Linie, die aus dem Adenokarzinom im Pankreaskopf eines 56-jährigen Mannes hervorgeht (Lieber et al., 1975). PDAC-relevante Mutationen: <i>kras</i> , <i>p53</i> , <i>CDKN2A/p16</i> Die Zellen wurden von der <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC) bezogen.

2.4.2 Zellkulturzusätze

Zellkulturzusatz	Hersteller
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA, Pasching, AT
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	BioLegend, Fell, DE
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, DE
Gentamicin	Gibco Life Technologies, Darmstadt, DE
Insulin-Transferrin-Sodium Selenite Supplement 100 x (ITS)	Sigma-Aldrich, München, DE
Keratinocyten Serum-freies Medium	Life Technologies, Darmstadt, DE
L-Glutamin	PAA, Pasching, AT
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, DE
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	PAA, Pasching, AT
Puromycin	InvivoGen, Toulouse, FR
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Darmstadt, DE
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Biochrom, Berlin, DE
SeraPlus	PAN Biotech, Aidenbach, Germany

Zellkulturzusatz (Fortsetzung)	Hersteller (Fortsetzung)
Transforming Growth Factor- β 1 (human) (TGF- β 1)	BioLegend, Fell, DE
Williams' Medium E	Biochrom, Berlin, DE

2.4.3 Zusammensetzung von Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Hepatozyten-Medium	Williams' Medium E 1 % L-Glutamin 1 % Pen/Strep 2 ng/ μ l ITS 10 μ g/ml Gentamicin 100 nM Dexamethason (für die ersten 3 h nach Hepatozyten-Aussaat zusätzlich 10 % (v/v) SeraPlus)
HPDE-Medium	50 % (v/v) Keratinozyten Serum-freies Medium 50 % (v/v) RPMI 1640 5 % (v/v) FCS 0,5 % (v/v) L-Glutamin 50 μ g/ml Rinderhypophysenextrakt 5 ng/ml EGF 4 μ g/ml Puromycin
MI-Medium	DMEM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Natriumpyruvat 1 % (v/v) L-Glutamin (für die Kultur der HSC und HMF zusätzlich 1 % (v/v) Pen/Strep)
Panc-Medium	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Natriumpyruvat 1 % (v/v) L-Glutamin

2.4.4 Apoptosestimuli

Apoptosestimulus	Hersteller
5-Fluorouracil	Medac, Wedel, DE
Cisplatin	Teva, Ulm, DE
Gemcitabin	Hexal AG, Holzkirchen, DE
KillerTRAIL, <i>soluble human recombinant</i>	Enzo Life Science, Lörrach, DE

2.4.5 Small interfering RNA (siRNA) und Fusionsproteine

siRNA	Hersteller
Control siRNA-A	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Nestin siRNA (h)	Santa Cruz, Heidelberg, DE

Fusionsprotein	Hersteller
Etanercept	Pfizer Deutschland, Berlin, DE

2.5 Antikörper und Reagenzien

2.5.1 Antikörper und Reagenzien für Immunfluoreszenz- und immunzytochemische Färbungen

Primärer Antikörper (Klon)	Spezies / Isotyp	Konzentration [mg/ml]	Verdünnungsfaktor	Hersteller
E-Cadherin (32A8)	Maus / IgG1		50	Cell Signaling, Frankfurt, DE
Pan-Cytokeratin	Maus	0,13	100	Immunotech, Prag, CZ
Ki67 (B56)	Maus / IgG1, Kappa	0,50	250	BD Biosciences, Heidelberg, DE
L1CAM (14.10)	Maus		200	Bereitgestellt durch Prof. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, DE
Nanog (D73G4)	Kaninchen / IgG	0,02	100	Cell Signaling, Frankfurt, DE

Primärer Antikörper (Klon) (Fortsetzung)	Spezies / Isotyp (Fortsetzung)	Konzentration [mg/ml] (Fortsetzung)	Verdünnungsfaktor (Fortsetzung)	Hersteller (Fortsetzung)
Nestin (10C2)	Maus / IgG	1,00	200	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Isotypen-Kontrolle (MAB002)	Maus / IgG1	0,50	Entsprechend des	R&D Systems, Abingdon, UK
Isotypen-Kontrolle (SP137)	Kaninchen / IgG	0,20	spezifischen Antikörpers	Abcam, Cambridge, UK

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konzentration [mg/ml]	Verdünnungsfaktor	Hersteller
AlexaFluor 488 anti-mouse	Ziege	2,00	500	Life Technologies, Darmstadt, DE
AlexaFluor 546 anti-rabbit	Ziege	2,00	500	Life Technologies, Darmstadt, DE

Alle primären und sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenz- und immunzytochemischen Färbungen wurden in 1 % BSA in PBS mit 0,3 % Triton verdünnt.

Sekundäres Reagenz	Hersteller
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer anti-mouse	Dako Diagnostika, Hamburg, DE
EnVision+ System-HRP Labelled Polymer anti-rabbit	Dako Diagnostika, Hamburg, DE
Lab Vision™ MultiVision Polymer Detection System: anti-mouse-AP and anti-rabbit-HRP	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Lab Vision™ MultiVision Polymer Detection System: anti-mouse-HRP and anti-rabbit-AP	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.5.2 Antikörper für Western Blot-Untersuchungen

Primärer Antikörper (Klon)	Spezies / Isotyp	Verdünnungs- faktor	Hersteller
E-Cadherin (32A8)	Maus / IgG1	1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
HSP 90 α / β (F-8)	Maus / IgG2A	1000	Santa Cruz, Heidelberg, DE
HSP 90 α / β (H-114)	Kaninchen / polyklonal	2000	Santa Cruz, Heidelberg, DE
L1CAM (9.3)	Maus	1000	Bereitgestellt durch Prof. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, DE
phospho-p65 (12H11)	Maus / IgG3	500	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Vimentin (V9)	Maus / IgG1	200	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Zeb1	Kaninchen / polyklonal	1000	Novus Biologicals, Wiesbaden-Nordenstadt, DE

Sekundärer Antikörper	Spezies	Verdünnungs- faktor	Hersteller
anti-mouse IgG (HRP-gekoppelt)	Pferd	2000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
anti-rabbit IgG (HRP-gekoppelt)	Ziege	2000	Cell Signaling, Frankfurt, DE

2.6 Primer für qPCR-Analyse

2.6.1 Primer des Herstellers Eurofins (Ebersberg, DE)

Primer		Primersequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur [°C]
ABCG2	forward	GTTTATCCGTGGTGTGTCTGG	61
	reverse	CTGAGCTATAGAGGCCCTGGG	
GAPDH	forward	TCCATGACAACCTTTGGTATCGTGG	58
	reverse	GACGCCTGCTTCACCACCTTCT	
Nestin	forward	GAAACAGCCATAGAGGGCAAA	58
	reverse	TGGTTTTCCAGAGTCTTCAGTGA	
TNF- α	forward	TCCTTCAGACACCCTCAACC	58
	reverse	AGGCCCCAGTTTGAATTCTT	
Zeb1	forward	TCCATGCTTAAGAGCGCTAGCT	61
	reverse	ACCGTAGTTGAGTAGGTGTATGCCA	

2.6.2 Primer des Herstellers RealTimePrimers (via Biomol, Hamburg, DE)

Primer		Primersequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur [°C]
E-Cadherin	forward	TGCTCTTGCTGTTTCTTCGG	55
	reverse	TGCCCCATTCGTTCAAGTAG	
L1CAM	forward	GAACTGGATGTGGTGGAGAG	58
	reverse	GAGGGTGGTAGAGGTCTGGT	
Nanog	forward	ACCTACCTACCCCAGCCTTT	58
	reverse	CATGCAGGACTGCAGAGATT	
Vimentin	forward	TCCAAGTTTGCTGACCTCTC	58
	reverse	TCAACGGCAAAGTTCTCTTC	

2.7 Materialien für *in vivo*-Experimente

Die *in vivo*-Untersuchungen wurden an weiblichen *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID)-beige Mäusen in einem Alter von acht Wochen durchgeführt (Charles River, Sulzfeld, DE).

2.7.1 Material und Verbrauchsmaterial für *in vivo*-Experimente

Material	Hersteller
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen DE
ES-Kompressen (10 x 10 cm)	Hartmann, Heidenheim, DE
Feine Schere (gerade, spitz)	Aesculap, Tuttlingen, DE
Insulinspritze U-40 (1 ml, 29,5 GA / 0,33 x 12,7 mm)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
Kodan®	Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Mikro-Nadelhalter nach Müller	Aesculap, Tuttlingen, DE
Mikro-Pinzette mit Ring (Durchmesser 1,2 mm)	Aesculap, Tuttlingen, DE
Mikro-Pinzette nach Müller	Aesculap, Tuttlingen, DE
Mullkompressen (6 x 6 cm)	NOBA Verbandmaterial, Wetter, DE
Sterile Wattestäbchen	Beese, Barsbüttel, DE
Veet Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Slough, UK
Vicryl 6-0	Ethicon, Somerville, US

2.7.2 Injektionslösungen

Injektionslösung (Konzentration)	Hersteller
Glukose 5 % B. Braun Infusionslösung	Braun, Melsungen, DE
Anexate® (Flumazenil, 0,1 mg/ml)	Roche, Grenzach-Wyhen, DE
Antisedan® (Atipamezol, 5 mg/ml)	Pfizer, Karlsruhe, DE
Dormitor® (Medetomidin, 1 mg/ml)	Pfizer, Karlsruhe, DE
Fentanyl® (0,05 mg/ml)	Janssen-Cilag, Neuss, DE
Isotonische Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	Braun, Melsungen, DE
Midazolam® (1 mg/ml)	Roche, Grenzach-Wyhen, DE
Naloxon® (0,4 mg/ml)	CuraMed, Karlsruhe, DE
Temgesic® (0,3 mg/ml)	Reckitt Benckiser, Slough, UK

2.8 Kits

Kit	Hersteller
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Mannheim, DE
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, DE
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Rockland, US
NucleoSpin® RNA/Protein	Macherey-Nagel, Düren, DE
RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Total RNA Kit peqGOLD	PeqLab, Erlangen, DE

2.9 Software

Software	Hersteller
Axiovision 4.6	Zeiss, Jena, DE
BIOREVO	Keyence, Osaka, JP
FUSION-CAPT 16.06	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim, DE
ImageJ 1.51n	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, US
LightCycler480 Software	Roche, Basel, CH
Mendeley Desktop 1.17.10	Mendeley, London, UK
Microsoft Office 2007/2013	Microsoft Corporation, Redmond, US
NyONE Reader	Synentec, Elmshorn, DE
SigmaPlot 12.5	Systat Software, Chicago, US
Vevo® Software	FujiFilm VisualSonics, Toronto, CA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Passagierung der PDEZ

Die Zellen der Zelllinien Panc1 und H6c7-kras wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % in Panc- bzw. HPDE-Medium kultiviert. Nach Entfernen des Mediums mittels Vakuumpumpe wurde der Zellrasen zunächst mit PBS gewaschen und für 10 min in Trypsin-EDTA inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in einem 50 ml-Röhrchen mit gleichem Volumen an Medium versetzt, um die Trypsin-Reaktion zu stoppen. Nach Zentrifugation (300 x g, 5 min) wurde das Pellet in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl in einem Aliquot von 10 µl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die PDEZ wurden entsprechend der Versuchsreihe in einer bestimmten Zahl weiterverarbeitet und die restlichen Zellen zur weiteren Kultivierung auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und 85 % relativer Luftfeuchte. Alle Kulturmedien und Trypsin-EDTA wurden vor der Verwendung stets auf 37 °C vorgewärmt.

Bei allen Zelllinien erfolgte die regelmäßige Kontrolle auf Mykoplasmen-Kontamination (MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit). Diese Kontrollen waren durchgehend negativ.

3.1.2 Kultivierung der hepatischen Sternzellen und hepatischen Myofibroblasten

Hepatische Sternzellen der Zelllinie M1-4HSC (HSC) und aus ihnen durch TGF-β1 transdifferenzierte hepatische Myofibroblasten der Linie M-HT (HMF) wurden bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert und wie in Abschnitt 3.1.1 für PDEZ beschrieben passagiert. Außerhalb der Versuchsreihen wurden diese Zellen in MI-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin gehalten. Zusätzlich wurde dem Medium der HMF 1 ng/ml TGF-β1 zugefügt, um einen stabilen Phänotyp zu erhalten.

3.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen und Zelllinien

Um neue Zellen aufzutauen, wurden 5 ml des entsprechenden Zellkulturmediums in ein 50 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Direkt nach der Entnahme der Zellen aus dem Stickstofftank wurden diese durch Verdünnung mit dem vorbereiteten Medium aufgetaut und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Das Medium wurde entfernt und die Zellen in je 10 ml frischem Medium in einer bzw. bei entsprechend großer Zellzahl in zwei Kulturflaschen kultiviert.

Um Zellen einzufrieren, wurden diese mit Trypsin-EDTA wie oben beschrieben gelöst und zentrifugiert. Zur Entfernung des Zellkulturmediums wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml 10 % DMSO in FCS gelöst und in ein Kryogefäß überführt. Diese Zellsuspension wurde in einem Kryokarussell bis -80 °C kontrolliert heruntergekühlt und zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.4 Kollagenbeschichtung der Kulturplatten

Für die Kultivierung von primären murinen Hepatozyten war eine Kollagenbeschichtung der Kulturplatten notwendig. Hierzu wurden 1,5 ml einer Kollagenlösung (*rat tail*) mit 150 µl DMEM (10x) und 3350 µl 0,2 % Essigsäure versetzt und durch die Zugabe von 1 N Natronlauge neutralisiert. Pro Well einer 6-Well-Platte wurde je 1 ml der Kollagenlösung aufgetragen. Nach vollständiger Benetzung wurde der Überstand entfernt, die Kollagenbeschichtung für etwa 1,5 h getrocknet und war so für die Hepatozyten-Kultur vorbereitet.

3.1.5 Kultivierung der Hepatozyten

Primäre murine Hepatozyten wurden durch Prof. Hengstler (Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der Technischen Universität Dortmund, Dortmund, DE) bereitgestellt. Die Zellen wurden wie von Klingmüller et al. (2006) beschrieben isoliert und in Suspensionspuffer auf Eis versendet. Am folgenden Tag wurde die Zellsuspension zentrifugiert (50 x g, 5 min), bevor das Pellet in 50 ml des Suspensionspuffers gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Zellpellet in 20 ml des Puffers aufgenommen, 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl einer Trypanblau-Lösung versetzt und die

Zahl der vitalen Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Drei Stunden nach Aussaat von 5×10^4 Hepatozyten in 2 ml Hepatozyten-Medium mit 10 % SeraPlus pro Well einer kollagenbeschichteten 6-Well-Platte, wurden die Zellen zweimal mit etwa 1 ml Hepatozyten-Medium gewaschen und anschließend über Nacht in 2 ml SeraPlus-freiem Hepatozyten-Medium kultiviert. Alternativ wurden nach dem Waschen zu insgesamt $4,75 \times 10^4$ Hepatozyten in 1 ml Hepatozyten-Medium $0,25 \times 10^4$ HSC oder HMF in 1 ml MI-Medium ohne Penicillin/Streptomycin hinzugegeben und über Nacht kultiviert.

3.1.6 Indirekte Kokultur

Die indirekte Kokultur von PDEZ mit hepatischen Stromazellen erfolgte unter Verwendung von ThinCert Zellkultur-Einsätzen (Transwells) mit einem Porendurchmesser von $0,4 \mu\text{m}$, sodass lösliche Bestandteile ausgetauscht werden konnten, jedoch kein Zell-Zell-Kontakt zustande kam (Abbildung 1).

Sowohl die Hepatozyten in den Kulturplatten, je nach Versuchsreihe alleine, mit 5 % HSC oder 5 % HMF versetzt, als auch die PDEZ in den Transwells wurden über Nacht in ihrem jeweiligen Kulturmedium wachsen gelassen, bevor am nächsten Tag die Kokultur durch das Übersetzen der Transwells in die entsprechenden Wells gestartet wurde. Für die 6-tägige Kokultur wurde ein Mischmedium aus 50 % Panc- und 50 % -MI-Medium verwendet.

In 6-Well-Platten wurden für die Kokultur pro Ansatz 1×10^4 PDEZ in 1,5 ml Medium in Transwells ausgesät und 5×10^4 Hepatozyten in 2 ml Medium. Für die Kokultur-Bedingungen der mit HSC bzw. HMF angereicherten Hepatozyten wurden $4,75 \times 10^4$ Hepatozyten $0,25 \times 10^4$ der HSC bzw. HMF zugefügt. Für die Kultur in 12-Well-Platten und entsprechenden Transwells wurde jeweils die Hälfte der angegebenen Zellzahlen verwendet.

Zur Bestimmung der Vitalität der Hepatozyten nach der Kokultur wurde ein Trypanblau-Ausschluss durchgeführt. Dazu wurde das Medium vom Zellrasen abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend kurz mit Trypanblau-Lösung (1:10 in PBS) inkubiert. Zwei weiteren PBS-Waschschritten folgte die Bestimmung der Vitalität anhand von drei repräsentativen Bereichen im Well, in denen die Zahl der vitalen Zellen auf die Gesamtzellzahl bezogen wurde.

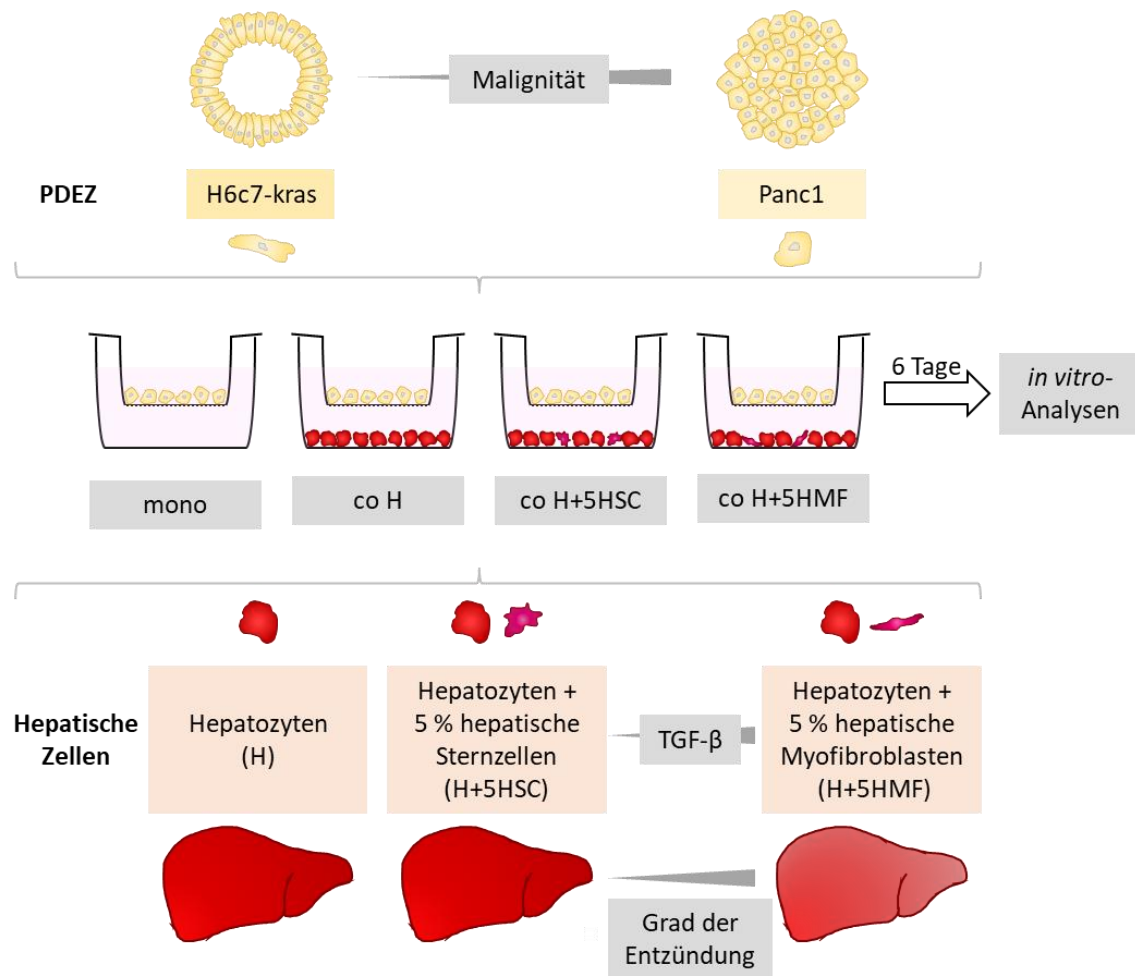


Abbildung 1: Schematischer Überblick über die Durchführung der Mono- bzw. Kokultur von PDEZ mit hepatischen Stromazellen. Als PDEZ dienten dabei entweder prämaligene H6c7-kras- oder maligne Panc1-Zellen. Diese wurden für sechs Tage in Monokultur bzw. mit hepatischen Stromazellen in Kokultur gehalten, bevor weitergehende Analysen bezüglich Wachstums-, EMT- und CSC-Eigenschaften durchgeführt wurden. Die Leberzellen für die Kokultur waren Hepatozyten alleine (co H) oder Hepatozyten mit 5 % HSC (co H+5HSC) und repräsentierten eine physiologische Mikroumgebung bzw. Hepatozyten mit 5 % HMF (co H+5HMF) für das Modell eines inflammatorischen Mikromilieus. HMF wurden dabei aus HSC durch den Zusatz von 1 ng/ml TGF-β1 generiert (geändert nach Lenk, 2017).

Für die indirekte Kokultur von PDEZ-Klonen mit anderen PDEZ-Klonformen wurde die oben beschriebene Methode mit wenigen Modifikationen angewandt. Die Zellen jeder Klonform wurden in einer Zahl von 1×10^4 PDEZ in 6-Well-Platten bzw. den entsprechenden Transwells für einen Tag alleine kultiviert, bevor die 6-tägige Kokultur nach einem Mediumwechsel am folgenden Tag startete. Dabei wurde für die Kokultur von Zellen aus H6c7-kras-Klonen HPDE-, für die von Zellen aus Panc1-Klonen Panc-Medium verwendet.

3.1.7 Colony Formation Assay (CFA)

Die Untersuchung des Koloniebildungsvermögens erfolgte mittels vereinzelt ausgesäter PDEZ in klonaler Dichte. Dazu wurden PDEZ mittels Trypsin-EDTA, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, in Suspension gebracht, gezählt und je 400 Zellen in 2,5 ml des jeweiligen Mediums als Duplikate oder Triplikate in den Wells einer 6-Well-Platte kultiviert. Je nach Zelllinie und Versuchsreihe, wurden die Kolonien nach acht bis 14 Tagen nach einmaliger PBS-Wäsche zur Entfernung des Mediums mit 1 ml 4,5 % PFA für 10 min fixiert, das wiederum durch zweimalige Wäsche mit destilliertem Wasser entfernt wurde. Anschließend folgte die Inkubation in 1 ml Grams Kristallviolettlösung (1 h, Raumtemperatur (RT)) und fünf Waschschrte mit destilliertem Wasser, bevor die Platten über Nacht getrocknet wurden.

Zur Auswertung wurden die Anzahl der Zellen (20 bis 50 und über 50) und die Kolonieform (Holo-, Mero- und Paraklon) aller Kolonien eines Wells unter Verwendung des Evos XL Core Cell Imaging Systems bestimmt.

3.1.8 Expansion von Holo-, Mero- und Paraklonzellen aus PDEZ

Um Holo-, Mero- und Paraklone weitergehend zu charakterisieren, wurden diese aus Einzelzellen expandiert.

Panc1- bzw. H6c7-kras-Zellen wurden mit Trypsin-EDTA, entweder direkt aus der Kulturflasche oder nach 6-tägiger indirekter Kokultur mit 5 % HSC-angereicherten Hepatozyten, gelöst und gezählt (wie unter 3.1.1, 3.1.5 und 3.1.6 beschrieben). Für die Aussaat wurden 1.000 Zellen in 1 ml Medium vorverdünnt, um daraus eine Zellsuspension mit 100 Zellen pro 20 ml herzustellen, wovon 200 μ l, in denen also theoretisch genau eine Einzelzelle enthalten war, in eine flache 96-Well-Platte pipettiert wurden. 3 h nach Aussaat wurde die 96-Well-Platte bei 30 x g für 2 min zentrifugiert, bevor die erste Messung zur Detektion der Einzelzellen im Hellfeld-Kanal des NyONE startete. Die Messung wurde in den drei folgenden Tagen täglich, danach zweimal pro Woche wiederholt. Nur Wells mit genau einer Zelle in der ersten Messung wurden für die weitere Expansion in Betracht gezogen. Nach etwa zwölf Tagen wurden die Kolonieformen bestimmt und bis zur 80 %-igen Konfluenz beobachtet. Klone mit stabilem Phänotyp wurden mit Trypsin-EDTA gelöst und zur weiteren Expansion in ein Well einer 6-Well-Platte überführt. Parallel dazu wurden 400 Zellen für einen CFA entnommen. Drei Klone mit dem besten CFA-Ergebnis wurden zunächst in einer 25 cm²,

später in einer 75 cm²-Zellkulturflasche expandiert und kultiviert und bei jedem Expansionsschritt mittels CFA auf ihren Phänotyp überprüft.

3.1.9 siRNA-vermittelter Knockdown von Nestin

Der Einfluss von Nestin auf CSC-Eigenschaften und Differenzierung von Panc1-Holoklonen wurde mittels siRNA-vermittelter transients Herunterregulierung von Nestin untersucht.

Dafür wurden 6×10^4 Panc1-Holoklon-Zellen in 1 ml Panc-Medium pro Well in einer 12-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gegen 1 ml frisches Panc-Medium ausgetauscht und die Transfektionslösung hinzugegeben. Diese bestand aus 100 µl FCS-freiem Medium, 2 µl der Nestin- bzw. Kontroll-siRNA und 6 µl HiPerFect-Transfektionsreagenz. Nach dreitägiger Inkubation wurde die Zellzahl wie oben beschrieben bestimmt, ein CFA für zwölf bis 14 Tage angelegt (Kapitel 3.1.7) und die RNA dieser Zellen zur Genexpressionsanalyse gewonnen (Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3). Funktionell wurde das Invasionsvermögen dieser Zellen in dem xCELLigence-System getestet (Kapitel 3.2.3).

3.1.10 Blockierung von TNF- α

Um den Effekt von TNF- α auf die Ausbildung von CSC-Eigenschaften und Differenzierung von PDEZ zu untersuchen, wurde dieses Zytokin in Panc1-Holoklon-Kulturen mittels Etanercept blockiert.

Die aus einem Holoklon expandierten Panc1-Zellen wurden in einer Zahl von $2,5 \times 10^4$ in 1 ml Kulturmedium in einer 12-Well-Platte in Doppelansätzen für die Behandlung ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert, 10 µg/ml Etanercept hinzugegeben und für 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Invasionsfähigkeit dieser Zellen in dem xCELLigence-System geprüft (siehe Kapitel 3.2.3) und aus den restlichen Zellen wurden RNA und Protein für weitere Untersuchungen gewonnen. Für die Untersuchung der Auswirkung auf die Koloniebildung wurden 400 Zellen für einen CFA in 2,5 ml Panc-Medium in einer 6-Well-Platte ausgesät (siehe 3.1.7) und am nächsten Tag wie beschrieben mit Etanercept behandelt. Dem CFA wurden an Tag 7 erneut 10 µg/ml Etanercept zugefügt, bevor an Tag 11 eine

Kristallviolett-Färbung der Kolonien durchgeführt wurde. Parallel kultivierte, unbehandelte Panc1-Holoklon-Zellen dienten in beiden Kulturansätzen als Referenz.

3.2 Methoden zur funktionellen Charakterisierung der PDEZ

3.2.1 Behandlung der PDEZ mit Apoptosestimuli

An Tag 4 der Kokultur wurde dem Kulturmedium in den entsprechenden Versuchen für 24 h Gemcitabin (20 µg/ml), 5-Fluorouracil (10 µg/ml), Cisplatin (10 µg/ml) oder KillerTRAIL (100 ng/ml) zugegeben. Die gleichen Konzentrationen der Apoptosestimuli fanden bei der Behandlung der unterschiedlichen PDEZ-Klonformen Anwendung. Im Anschluss wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wie unten beschrieben (Kapitel 3.2.2) bestimmt.

3.2.2 Bestimmung der Caspase 3/7-Aktivität

Die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 wurde mit dem CaspaseGlo® 3/7-Assay (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt.

Die PDEZ wurden je nach Fragestellung der Versuchsreihe in einer 12-Well-Platte kultiviert und mit Apoptosestimuli versetzt. In jeder Versuchsreihe wurde als Kontrolle jeweils eine Probe für die Bestimmung der basalen Caspase-Aktivität unbehandelt gelassen. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium abgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden tryptisch gelöst (siehe 3.1.1) und die Reaktion durch Zugabe des zuvor entnommenen Mediumüberstandes gestoppt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (300 x g, 5 min), nach dem das Zellpellet in 500 µl PBS gelöst wurde und zweimal 25 µl der erhaltenen Zellsuspension in eine weiße 96-Well-Flachboden-Platte übertragen wurde. Das gleiche Volumen des CaspaseGlo® 3/7-Reagenzes wurde hinzugefügt und für 30 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde die Chemolumineszenz im Infinite® 200 PRO Mikroplatten-Reader gemessen und auf die Proteinkonzentration normalisiert, um unterschiedliche Zellzahlen nach der Kultur zu berücksichtigen. Dafür wurden die übrigen Zellen der Zellsuspension als Gesamtzelllysat aufgearbeitet (siehe 3.3.5) und die Proteinkonzentration kolorimetrisch bestimmt (siehe 3.3.6).

3.2.3 Bestimmung der Invasionsrate mit xCELLigence

Mit dem *Real Time Cell Analysis (RTCA)*-Gerät xCELLigence (ACEA Biosciences Inc.) ist es möglich, Zellinvasion kontinuierlich über einen bestimmten Zeitraum in Echtzeit zu verfolgen. Dazu werden Kollagen-beschichtete CIM-Platten verwendet, die in ihrem Aufbau 16-Well-Platten mit 2-Kammer-Systemen entsprechen. Die beiden Kompartimente sind durch eine Membran mit einer Porengröße von 8 µm getrennt, die auf der Unterseite mit einer Goldelektrode beschichtet ist, sodass eine kontinuierliche Impedanz-Messung ermöglicht wird. So lassen sich aus der oberen in die untere Kammer invadierte Zellen nachweisen.

Im Einzelnen wurden die Membranen, die die Kompartimente trennen, zunächst mit 30 µl Kollagen-Lösung (entspricht 12 µg Kollagen pro Well) beschichtet. Die Lösung wurde für etwa 2 h getrocknet, bevor dieser obere Teil der Platte auf die mit 165 µl Kulturmedium mit 1 % FCS gefüllte untere Kammer gesetzt wurde. Jedes Well wurde mit weiteren 30 µl dieses Kulturmediums gefüllt und für mindestens 1 h bei 37 °C äquilibriert, worauf eine Hintergrundmessung im xCELLigence-Gerät folgte. Anschließend wurden 4×10^4 PDEZ, die zuvor mit Trypsin gelöst und nachfolgend gezählt wurden (siehe 3.1.1), in Doppel- oder Dreifachansätzen in je 100 µl 1 %-FCS-Kulturmedium in die Wells gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend folgte die erste Messung der Impedanz, die für 24 h alle 15 min wiederholt wurde.

Zur Auswertung der invadierten Zellen wurde die Fläche unter der Kurve (*Area Under the Curve*, AUC) bis zu dem Zeitpunkt der höchsten Invasion (t_{\max}) berechnet und als n-fache Veränderung zur jeweiligen Kontrolle dargestellt.

3.3 Gewinnung und Aufreinigung von RNA und Proteinen

3.3.1 RNA-Extraktion

Für die Untersuchung der Genexpression der PDEZ wurde die RNA der Zellen im Anschluss an die jeweilige Versuchsreihe extrahiert. Dafür wurden die PDEZ nach Entfernen des Kulturmediums mit PBS gewaschen und anschließend in 300 µl Lysepuffer des Total RNA Kits (VWR Peqlab) aufgenommen. Die folgende Extraktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und enthielt einen DNase I-Verdau. Im letzten Aufreinigungsschritt wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und ihre Konzentration im Infinite® 200

PRO Microplate Reader (Tecan) bestimmt. Die RNA wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese der cDNA wurde die extrahierte RNA (Kapitel 3.3.1) einer reversen Transkription unterzogen. 100 bis 500 ng RNA wurden dafür mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von $11,5\text{ }\mu\text{l}$ gebracht, mit $1\text{ }\mu\text{l}$ eines Primers aus Oligo-dT-Nukleotiden versetzt und bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min inkubiert. Die Proben wurden auf Eis heruntergekühlt und kurz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, bevor $7,5\text{ }\mu\text{l}$ eines Mastermixes aus folgenden Komponenten hinzugegeben wurden: $4\text{ }\mu\text{l}$ Reaktionspuffer, $0,5\text{ }\mu\text{l}$ RNase-Inhibitor, $2\text{ }\mu\text{l}$ dNTPs und $1\text{ }\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase. Die Reaktion der reversen Transkription wurde bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 min durchgeführt und anschließend bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 min gestoppt. Die so synthetisierte cDNA wurde mit $60\text{ }\mu\text{l}$ Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Um die Genexpression der PDEZ unter bestimmten Kulturbedingungen zu untersuchen, wurde die aus RNA gewonnene cDNA einer qPCR unterzogen.

Dafür wurden $2,5\text{ }\mu\text{l}$ cDNA in Duplikaten oder Triplikaten in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert und mit einem Mastermix aus folgenden Komponenten versetzt, der je nach Angaben der Hersteller der Primer variierte:

Hersteller: Eurofins

$5\text{ }\mu\text{l}$ SYBR Green I Mastermix (2x)

$1\text{ }\mu\text{l}$ Forward Primer

$1\text{ }\mu\text{l}$ Reverse Primer

$0,5\text{ }\mu\text{l}$ Nuklease-freies Wasser

Hersteller: Realtimeprimers

$5\text{ }\mu\text{l}$ SYBR Green I Mastermix (2x)

$1,5\text{ }\mu\text{l}$ 1:50 verdünnter Primer

$1\text{ }\mu\text{l}$ Nuklease-freies Wasser

Nach Versiegelung und Zentrifugation der 96-Well-PCR-Platte wurde die qPCR mit bis zu 50 Zyklen und Schmelzkurvenanalyse im LightCycler® 480 II durchgeführt. Die qPCR-Zyklen enthielten jeweils eine Dehybridisierungsphase bei 95 °C für 10 s, eine Annealingphase bei der Primer-spezifischen Temperatur, wie in Kapitel 2.6 angegeben, für 20 s bzw. bei Nanog für 45 s und eine Amplifikationsphase bei 72 °C für 30 s. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software und Microsoft Excel 2007/2013. Die Expression der untersuchten Gene wurde dabei jeweils auf die Expression des Housekeeper-Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert, bevor sie als n-facher Unterschied der PDEZ-Kokultur zur Monokultur bzw. Behandlung zur Kontrollbehandlung dargestellt wurde.

3.3.4 Kombinierte Protein- und RNA-Isolation

Für Versuchsreihen mit einer großen Anzahl an Ansätzen wurde die Protein- und RNA-Isolation mit Hilfe des Kits NucleoSpin® RNA/Protein (Machery-Nagel) kombiniert. Dazu wurde das Kulturmedium der entsprechenden Zellen entfernt und nach PBS-Wäsche erfolgte die Aufnahme der PDEZ in 350 µl RP1-Puffer. Die Durchführung fand nach Empfehlungen des Herstellers statt. Der Vorgang der RNA-Extraktion enthielt einen DNase I-Verdau. Die RNA wurde im letzten Schritt in 40 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert, das Protein bei -20 °C.

3.3.5 Herstellung von Gesamtzelllysat

Die Herstellung von Gesamtzelllysat erfolgte je nach Versuchsreihe entweder direkt im Well oder im Anschluss an die Zellzahlbestimmung. Für die Lyse aller Zellen im Well wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und ein angemessenes Volumen (70 bis 200 µl) 2x Laemmli-Puffer, versetzt mit 1 mM Natriumorthovanadat, direkt auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und durch mehrmaliges Pipettieren weiter lysiert. Für die Lyse der Zellen nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zentrifugiert (300 x g, 5 min) und das Zellpellet in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen (70 bis 200 µl) 2x Laemmli-Puffer, versetzt mit 1 mM Natriumorthovanadat, lysiert.

Anschließend erfolgte der weitere Aufschluss durch eine Ultraschallbehandlung. Die Lagerung des Gesamtzelllysates erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C.

3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Gesamtzelllysate erfolgte mit Hilfe des DC™ Protein Assays (Biorad) nach Herstellerangaben. Für die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 680 nm im Infinite® 200 PRO Microplate Reader wurde eine transparente 96-Well-Platte mit Flachboden verwendet und die Proteinkonzentration anhand einer Standardreihe berechnet.

3.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinlysate einer Versuchsreihe wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel (PAGE) ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurde das OmniPAGE VS10D Gelkammer-System (Clever Scientific) mit einem Western Blot-Laufpuffer (siehe 2.3.2) verwendet. Dafür wurde in der entsprechenden Apparatur zunächst ein Trenngel gegossen, welches mit Isopropanol beschichtet wurde. Nach der Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel hergestellt, welchem mithilfe eines Kammes Taschen zugefügt wurden. 10 µg der Gesamtzelllysate wurden mit 4x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt, bevor sie auf Eis abgekühlt und zusammen mit einem Proteinstandard auf das Gel aufgetragen wurden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte beim Durchlaufen des Sammelgels bei 90 V, des Trenngels bei 120 bis 130 V.

3.3.8 Western Blot und Immundetektion von Proteinen

Der SDS-PAGE anschließend folgte der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran in einem *semi-dry* Verfahren. Die PVDF-Membran wurde auf Größe des SDS-Gels zugeschnitten, für 1 min in Methanol aktiviert und kurz in destilliertem Wasser

(Aqua dest.) inkubiert. Für den Transfer wurde Whatman-Filterpapier ebenfalls auf die Größe des Gels, etwa 6,5 x 9 cm, gebracht. Sechs Lagen des Filterpapiers wurden in Transferpuffer A, drei Lagen in Puffer B getränkt und luftblasenfrei auf die Seite der Anode aufgebracht. Darauf wurden die aktivierte Membran und das SDS-Gel platziert und mit sechs Lagen in Transferpuffer C getränktem Filterpapier überschichtet. Vor dem Schließen der Apparatur durch Auflegen der Kathode wurden erneut sämtliche Luftblasen aus dem System entfernt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 70 mA pro Gel für 1 h.

Um unspezifische Proteinbindungen zu verringern, wurde die Membran für mindestens 1 h bei RT in Blotto blockiert. Die Membran inkubierte in der Primärantikörper-Lösung, die in Blotto verdünnt wurde (Kapitel 2.5.2), bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer. Daraufhin wurde die Membran dreimal 10 min in TBS-T gewaschen und im in Blotto verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei RT auf einem Rollenmischer inkubiert. Dem erneuten dreimaligen Waschen folgte die Detektion im Fusion SL Detektionssystem, für welche die Membran zuvor für 5 min mit dem Substrat Clarity Western ECL Substrat inkubiert wurde. Alternativ wurde für die Detektion das Substrat SuperSignal West Dura verwendet. Anhand des mitgelaufenen Proteinstandards konnte das Molekulargewicht der detektierten Proteine abgeschätzt werden. Als Housekeeper diente *Heat Shock Protein 90* (HSP90).

3.4 *In vivo*-Untersuchungen zur Tumorigenität

Um die Tumorigenität von Panc1-Zellen unterschiedlicher Differenzierung *in vivo* zu untersuchen, wurde ein SCID-beige Mausmodell verwendet. Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung der europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt und waren von den lokalen Behörden genehmigt (V242-77780/2015 (123-10/11)).

3.4.1 Tierhaltung und Applikation der PDEZ

20 weibliche SCID-beige Mäuse wurden in einem Alter von acht Wochen von Charles River (Sulzfeld, DE) bezogen und in der Zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel (Kiel, DE) in einer sterilen S1-Umgebung bei 22 ± 2 °C,

55 ± 10 % relativer Luftfeuchte und einem Zwölf-Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren in Makrolon-Käfigen Typ III mit Filterhauben in Laminar-Flow-Schränken gehalten. Einstreu, Futter und Wasser waren autoklaviert, um die spezifischen Pathogen-freien Bedingungen nach FELASA-Richtlinien zu erhalten.

Für die Applikation wurden Panc1-Holoklon- und Paraklon-Zellen, die aus Panc1-Einzelzellen nach HSC-angereicherter Hepatozyten-Kokultur expandiert wurden (Kapitel 3.1.8), wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben kultiviert, mit Trypsin gelöst und in einer Zahl von 10^4 in 75 µl PBS aufgenommen. Bis zur Applikation wurden die Zellen auf Eis gelagert. Jeweils zehn Tieren wurden 10^4 der Holoklon- oder Paraklon-Zellen appliziert. Die intrasplenale Inokulation der Zellen erfolgte durch Prof. Dr. Jan-Hendrik Egberts, Dr. Charlotte Hauser und Dr. Jan-Paul Gundlach der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des UKSH, Campus Kiel. Dafür erhielten die Tiere eine Kombinationsnarkose aus Fentanyl (0,05 mg/kg Körpergewicht (KGW)), Midazolam (5 mg/kg KGW) und Dormitor (0,5 mg/kg KGW), die unter sterilen Bedingungen vorbereitet und intraperitoneal appliziert wurde. Bei Abwesenheit des Zwischenzehenreflexes wurden die Abdomina der Tiere rasiert und desinfiziert. Nach Laparotomie wurden 75 µl der Zellsuspension in die Milzvene injiziert und die Bauchdecke mit Vicryl 6-0 vernäht. Im Anschluss an die Operation wurden den Tieren 0,5 ml einer Glukose 5 % B. Braun-Infusionslösung subkutan verabreicht und die Narkose mit einer Kombination aus Anexate (0,5 mg/kg KGW), Naloxon (1,2 mg/kg KGW) und Antisedan (2,5 mg/kg KGW) subkutan antagonisiert. Eine Schmerzbehandlung erfolgte mit Temgesic (0,1 mg/kg KGW). Während der gesamten Zeit der Narkose sowie auch post-operativ wurden die Mäuse auf Heizmatten und durch Rotlicht warm gehalten und das Wohlergehen der Tiere im Anschluss täglich kontrolliert.

3.4.2 Kontrolle des Tumorwachstums

Das Wachstum von primären und sekundären Tumoren wurde in regelmäßigen Abständen durch Abtasten des Abdomens und Ultraschall-Untersuchungen überwacht. Für die Ultraschall-Untersuchungen wurden die Mäuse wie oben beschrieben narkotisiert und das Fell des Abdomens mittels Veet Enthaarungscreme entfernt. Während der gesamten Zeit der Narkose sowie post-operativ wurden die Tiere auf Heizmatten warm gehalten. Für die abdominale Untersuchung wurde das Vevo 770 High-Resolution *in vivo* Imaging System (FujiFilm

VisualSonics Inc.) mit einer Auflösung von 30 µm sowie ein RMV706 Ultraschallsensor (20 bis 60 MHz) verwendet, wobei Signale in sagittaler und transversaler Richtung aufgenommen wurden. Die Ultraschall-Untersuchungen wurden von Dr. Olga Will (Molecular Imaging North Competence Center, Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und UKSH, Campus Kiel) durchgeführt.

3.4.3 Gewebeentnahme und Aufbereitung

Nach 145 Tagen wurden die Tiere im Anschluss an eine Ultraschall-Untersuchung unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und Pankreas, Leber und Lunge entnommen. Diese Gewebe wurden in 4,5 % PBS-gepuffertem Formalin fixiert, bevor sie am Institut für Pathologie des UKSH, Campus Kiel, dehydriert und in Paraffin eingebettet wurden.

3.4.4 Herstellung serieller Gewebeschnitte

Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe wurden mit dem Mikrotom HM430 in 2 bis 3 µm Dicke geschnitten. Die Paraffin-Blöcke wurden gekühlt gelagert (4 °C) und auch während der Bearbeitung stets kühl gehalten. Es wurden zehn direkt aufeinanderfolgende Schnitte in ein Wasserbad (RT) überführt, um danach einzeln in einem Warmwasserbad gestreckt und glatt auf einen Objektträger aufgezogen zu werden. Die Paraffin-Schnitte wurden über Nacht bei 42 °C in einem Wärmeschrank getrocknet und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.4.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten

Zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen wurden für alle zu untersuchenden Präparate Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen angefertigt.

Zunächst wurde dafür das Paraffin entfernt und es erfolgte eine Rehydrierung der Gewebe. Dies geschah durch die Inkubation der Schnitte in Xylol (zweimal 10 min) und einer absteigenden Alkoholreihe, die aus 100 % Ethanol (zweimal 10 min), 5 min 95 % Ethanol und je 2 min 70 %, 50 % Ethanol (zweimal 10 min) und 10 min 100 % Ethanol (zweimal 10 min) bestand.

50 % Ethanol und Aqua dest. bestand. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 5 min in PBS und 2 min in Aqua dest. gewaschen. Es folgte die Färbung in Mayer's Hämalaun für 35 bis 40 s, eine 1-sekündige Inkubation in 0,1 % Salzsäure in Aqua dest. und 5-minütiges Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Die Rotfärbung wurde mit 0,5 % wässriger Eosin G-Lösung erreicht, in der die Schnitte 15 bis 25 s inkubierten, bevor auch hier für 30 s unter fließendem Leitungswasser gewaschen wurde. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70 %, 95 % und 100 % Ethanol für je 2 min folgte eine Xylol-Inkubation für zweimal 5 min, bevor die Gewebeschnitte in Xylol-haltigem Medium eingedeckelt wurden.

3.5 Immunbiologische Methoden

3.5.1 Immunzytochemische und Immunfluoreszenz-Färbung von PDEZ auf Deckgläschen

Zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in Zellen wurden PDEZ auf gläsernen Deckgläschen kultiviert, wie im Folgenden beschrieben fixiert und die zu untersuchenden Proteine angefärbt.

Je nach Versuchsreihe wurden die PDEZ bis zu sieben Tage auf Deckgläschen wachsen gelassen. Nach dem Entfernen des Mediums und einmaliger PBS-Wäsche wurden die Zellen mit 500 µl 4,5 % PFA für 10 min fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. In einem zweiten Fixierungsschritt wurden die Zellen mit kaltem Methanol (-20 °C, 10 min) inkubiert und wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Bei Färbungen mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Sekundärantikörper wurde dem Methanol 1,5 % Wasserstoffperoxid zugefügt, um endogene Peroxidasen zu sättigen. Die Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurde mit der Inkubation der Zellen in 4 % BSA in PBS mit 0,3 % Triton (PBS-Triton) erreicht (1 h, RT). Danach wurden die Zellen in 50 µl entsprechend verdünntem Primärantikörper in 1 % BSA in PBS-Triton in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers, der in 1 % BSA in PBS-Triton verdünnt wurde, folgte der dreimaligen PBS-Triton-Wäsche, fand für 1 h bei RT statt und wurde durch das dreimalige Waschen mit PBS beendet. Bei Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgten ab diesem Zeitpunkt alle weiteren Schritte in Dunkelheit, um ein Ausbleichen des Fluorochroms zu vermeiden. Darüber hinaus wurde dem Sekundärantikörper bei diesem Protokoll für die Detektion der Zellkerne Hoechst 33258 in einer Konzentration von 2 µg/ml zugefügt. Eingedeckelt wurden

die Zellen auf den Deckgläschen in FluorSave-Eindeckmedium, welche durch transparenten Nagellack auf einem Objektträger fixiert wurden. Alternativ zu Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern wurden HRP- bzw. Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelte Sekundärreagenzien eingesetzt (EnVision+ System, Lab Vision™ MultiVision Polymer Detection System). Für die Detektion der Signale war ein weiterer Schritt nötig, in dem das jeweilige Substrat zu einem Farbstoff umgesetzt wurde. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben für 10 min bei RT. Die Färbung der Zellkerne wurde durch eine Mayer's Hämalaun-Färbung für 1 s mit anschließendem 5-minütigen Bläuen in fließendem Leitungswasser erreicht. Um das Signal langfristig stabil zu halten, wurden die Zellen auf den Deckgläschen getrocknet und mit Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert.

Für die Kofärbung von Nestin und Nanog, deren primäre Antikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen, wurden diese und auch die verschiedenen Sekundärantikörper parallel inkubiert. Die Kofärbung von E-Cadherin und L1CAM wurde hingegen in zwei Schritten durchgeführt. Dabei wurde zunächst die E-Cadherin-Färbung einschließlich der Substratreaktion vorgenommen, bevor sich nach einem Waschschrift mit PBS die Färbung von L1CAM wie oben beschrieben anschloss. Nach der Substratreaktion folgten die Mayer's Hämalaun-Färbung und die Fixierung des Deckgläschens mit den Zellen auf einem Objektträger.

Die Auswertung wurde an einem geeigneten Mikroskop durchgeführt (Axioskop 40 für immunzytochemische Färbungen und BZ-9000 II für Immunfluoreszenz-Färbungen), indem fünf Bilder aus repräsentativen Bereichen aufgenommen wurden. Mit Microsoft PowerPoint wurde eine horizontale Linie durch diese Bilder gelegt und alle Zellen, die diese Linie berührten, auf ihre Färbung hin untersucht.

Zusätzlich zu allen spezifischen Färbungen wurden parallel Färbungen mit Isotyp-Kontroll-Antikörpern durchgeführt. Diese Kontrollfärbungen waren durchgehend negativ oder zeigten nur sehr schwache oder unspezifische Signale.

3.5.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Gewebeschnitten

Immunfluoreszenz-Färbungen wurden an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben, die seriell in 2 bis 3 μm Dicke geschnitten wurden, durchgeführt.

Dazu wurde das Paraffin zunächst entfernt und die Gewebe wie in Kapitel 3.4.5 beschrieben rehydriert. Es folgte ein 5-minütiger Waschschrift in PBS. Da durch eine Fixierung einige

Antigene maskiert werden können, wurde ein Antigen-Retrieval für 20 min in 1x Citratpuffer mit pH 6,0 knapp unter dem Siedepunkt durchgeführt. Nach dem Abkühlen für 20 min wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen und mit 4 % BSA in PBS-Triton für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurden, je nach Größe des Gewebes, 50 bis 100 µl der Primärantikörper-Lösung in entsprechender Verdünnung in 1 % BSA in PBS-Triton aufgetragen, mit Parafilm abgedeckt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Auf das dreimalige Waschen mit PBS-Triton folgte zur Reduktion der Autofluoreszenz eine Sudan Black B-Behandlung. Dazu wurde das Gewebe mit einem Fettstift umrandet und, je nach Größe, 100 bis 300 µl 0,3 % Sudan Black B in 70 % Ethanol für 20 min bei RT aufgetragen. Die Lösung wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min in PBS entfernt und anschließend folgte die Inkubation des Sekundärantikörpers in entsprechender Verdünnung in 1 % BSA in PBS-Triton für 1 h bei RT. Nach diesem Inkubationsschritt wurde erneut dreimal 5 min in PBS gewaschen, das kurz vor dem Eindeckeln in FluorSave-Eindeckmedium durch Aqua dest. ersetzt wurde. Die Auswertung und die Aufnahme von repräsentativen Ausschnitten erfolgte am Mikroskop BZ-9000 II.

3.5.3 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Die immunhistochemischen Färbungen an Geweben, die in den *in vivo*-Untersuchungen (Kapitel 3.4) gewonnen wurden, wurden durch Prof. Schumacher am Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Hamburg, DE) durchgeführt.

Die Auswertung der Färbungen und die Aufnahme von repräsentativen Ausschnitten erfolgten am Mikroskop Axio Scope.A1.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung von SigmaPlot 12.5. Die Normalverteilung wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Zum Vergleich zweier Gruppen parametrischer Daten wurde ein gepaarter t-Test, für nicht-parametrisch verteilte Daten ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für multiple Gruppen mit parametrisch verteilten

Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (*one-way repeated measures analysis of variance*) ausgeführt, wohingegen nicht-parametrische Datensets im Rahmen einer einfaktoriellen Varianzanalyse der Rangplatzsummen mit dem Kruskal-Wallis-Test (*Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks*) getestet wurden. Statistische Signifikanzen wurden mithilfe des Tukey-Tests bestimmt, wobei p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant betrachtet und mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet wurden.

4 Ergebnisse

Wenn sich disseminierte PDEZ in einem Sekundärorgan ansiedeln, sind sie einer neuen Mikroumgebung ausgesetzt, die Einfluss auf Wachstumsverhalten und Überlebensfähigkeiten dieser Zellen haben kann. In der Leber stellen Hepatozyten, aber auch HSC oder, im Rahmen von Entzündungsprozessen, HMF wesentliche Determinanten dieser Mikroumgebung dar.

Um den Einfluss von hepatischen Stromazellen auf Wachstums-, EMT- und CSC-Eigenschaften von PDEZ zu untersuchen, wurde ein indirektes Kokultursystem verwendet, in dem prä-maligne (H6c7-kras) oder maligne (Panc1) PDEZ mit verschiedenen hepatischen Stromazellen kultiviert wurden. Als Stromazellen dienten entweder Hepatozyten alleine oder Hepatozyten in Verbindung mit 5 % HSC, zur Modellierung einer physiologischen Mikroumgebung, oder mit 5 % HMF, um ein entzündliches Mikromilieu darzustellen (siehe Abbildung 1).

4.1 Einfluss hepatischer Stromazellen auf das Zellwachstum von PDEZ

Zunächst wurde eine 6-tägige indirekte Kokultur von Panc1- bzw. H6c7-kras-Zellen mit unterschiedlichen hepatischen Stromazellen durchgeführt und die Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der PDEZ verglichen mit monokultivierten PDEZ betrachtet.

4.1.1 Bestimmung der Vital-Zellzahl der PDEZ

Zur Untersuchung des Einflusses hepatischer Stromazellen auf das Zellwachstum wurde in einem ersten Schritt die Vital-Zellzahl der prä-malignen und malignen PDEZ nach 6-tägiger Mono- bzw. Kokultur mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

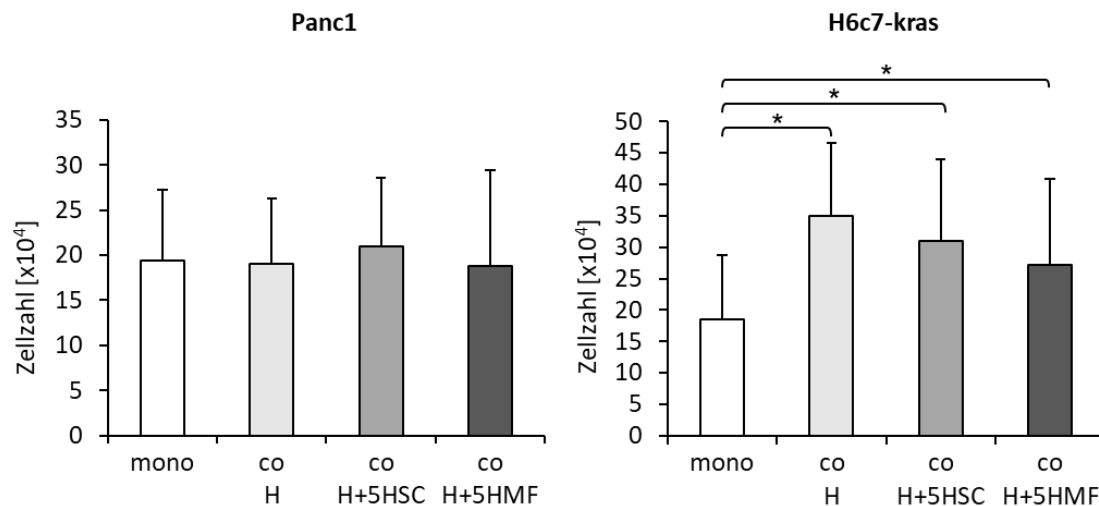


Abbildung 2: Hepatische Stromazellen beeinflussen das Wachstum von Panc1-Zellen nicht, bewirken jedoch einen Anstieg der H6c7-kras-Zellzahl. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer nach 6-tägiger Kultur der Panc1- oder H6c7-kras-Zellen in Transwells. Kultiviert wurden die PDEZ entweder als Monokultur (mono), in indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) aus 18 bis 23 unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet.

Weder Hepatozyten alleine noch mit HSC- oder HMF-angereicherte Hepatozyten hatten einen Einfluss auf die Anzahl der vitalen Panc1-Zellen. Die Zahl der vitalen H6c7-kras-Zellen war hingegen unter allen Kokultur-Bedingungen im Vergleich zur Monokultur signifikant erhöht (Abbildung 2).

4.1.2 Bestimmung der PDEZ-Proliferation mittels Ki67-Färbung

Um zu untersuchen, ob der Anstieg der H6c7-kras-Lebendzellzahl auf eine erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen war, wurden die PDEZ während der Kokultur auf Deckgläsern kultiviert, um anschließend den Proliferationsmarker Ki67 immunzytochemisch zu detektieren (Abbildung 3).

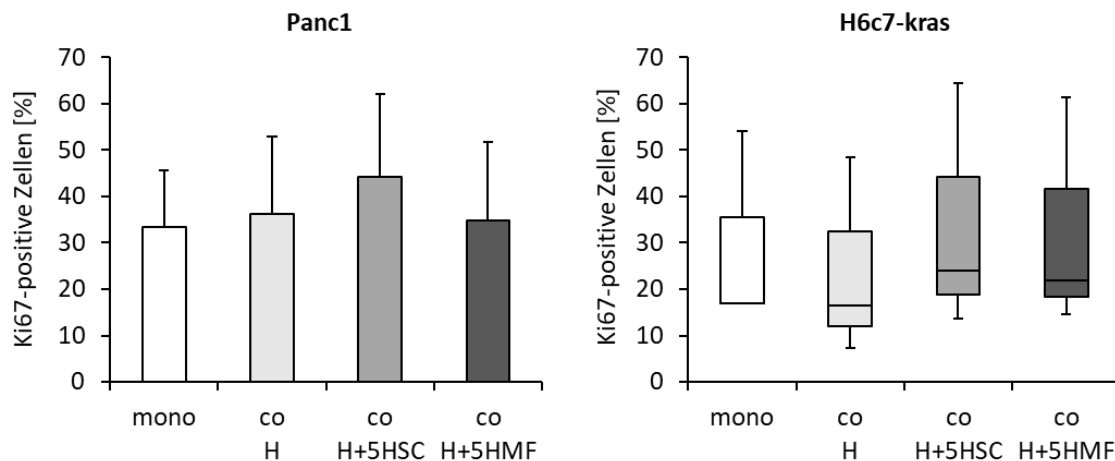


Abbildung 3: Hepatische Stromazellen haben keinen Einfluss auf den Anteil Ki67-positiver PDEZ. Die immunzytochemische Ki67-Färbung von PDEZ auf Deckgläschen erfolgte nach 6-tägiger Kultur in Transwells entweder als Monokultur (mono), in indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten. Ki67-positiv und -negative Zellen wurden in fünf Sichtfeldern bestimmt, wobei die Zellen berücksichtigt wurden, die eine horizontale Linie durch das Sichtfeld berührten. Für Panc1-Zellen sind die Mittelwerte mit SD, für H6c7-kras die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum der Anteile Ki67-positiver PDEZ aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt.

Während bei den Panc1-Zellen 33,5 bis 44,1 % Ki67-positiv Zellen ausgemacht wurden, wurden unter den H6c7-kras-Zellen 16,5 bis 24,0 % Ki67-positiv Zellen detektiert. In beiden Zelllinien unterlag dieser Anteil nur einem geringen Einfluss der Kokultur-Bedingungen. Die Ki67-Färbung deutet demnach weder auf eine verstärkte Proliferation der malignen noch der prä-malignen PDEZ unter Kokultur mit hepatischen Stromazellen hin.

4.1.3 Bestimmung der basalen Apoptoserate der PDEZ

Neben einer erhöhten Proliferationsrate ist es auch möglich, dass eine verringerte basale Apoptoserate zu einem Anstieg der Zellzahl beiträgt. Die Bestimmung der basalen Apoptoserate der PDEZ erfolgte über die Messung der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 nach 5-tägiger Kokultur mit den hepatischen Stromazellen.

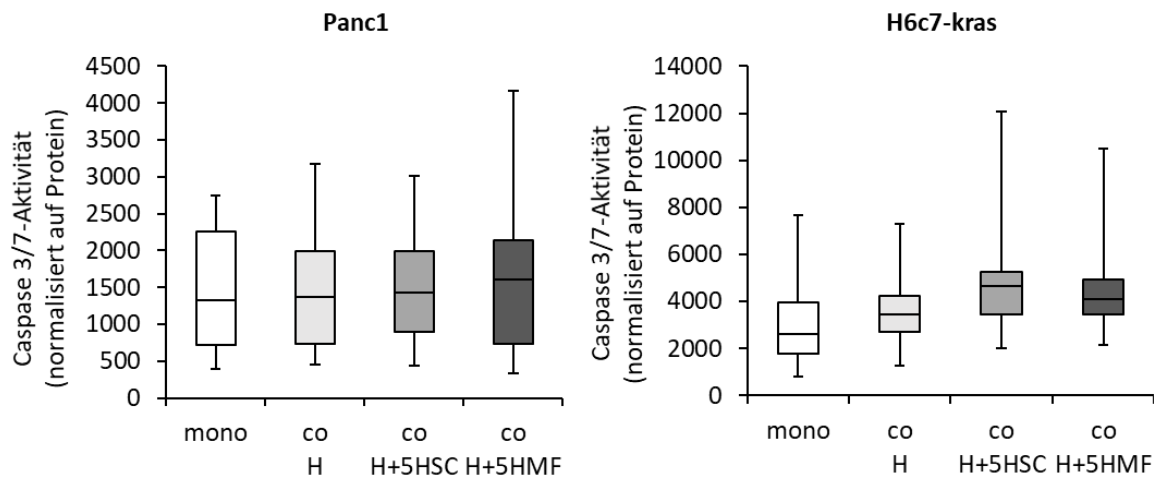


Abbildung 4: Hepatische Stromazellen haben keinen Einfluss auf die basale Apoptoserate der PDEZ. Die Bestimmung der Caspase-Aktivität erfolgte nach 5-tägiger Kultur der PDEZ entweder als Monokultur (mono), in indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten. Mittels Caspase-Glo® 3/7-Assay wurde die basale Aktivität der Caspasen 3 und 7 der PDEZ bestimmt und anschließend auf die Proteinkonzentration normalisiert. Dargestellt sind die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus zwölf bis 14 unabhängigen Experimenten.

H6c7-kras- wiesen im Vergleich zu Panc1-Zellen eine leicht erhöhte Caspase-Aktivität auf, die unter allen Kokultur-Bedingungen zu beobachten war (Abbildung 4). Weder bei den kokultivierten Panc1- noch bei den H6c7-kras-Zellen konnten jedoch signifikante Unterschiede in der Aktivität der Caspasen 3 und 7 im Vergleich zur Monokultur beobachtet werden.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die beobachteten Änderungen der Zellzahlen (Abbildung 2) nicht auf Unterschiede der basalen Apoptoserate unter verschiedenen Einflüssen der hepatischen Kokultur zurückgeführt werden können.

4.2 Einfluss hepatischer Stromazellen auf das Ansprechen von PDEZ auf Apoptosestimuli

Sowohl endogene als auch exogene Faktoren können PDEZ in ihrem Überleben beeinflussen. Dabei gilt die Fähigkeit, Mechanismen des Zelltods zu entkommen, als eines der *Hallmarks of Cancer* (Hanahan & Weinberg, 2011). Ob ein hepatisches Mikromilieu diese Fähigkeit von disseminierten PDEZ beeinflusst, wurde im folgenden Abschnitt analysiert.

4.2.1 Ansprechen von PDEZ auf den endogenen Apoptosestimulus TRAIL

Zunächst wurde untersucht, ob die unterschiedlichen hepatischen Stromabedingungen das Ansprechen von PDEZ auf den endogenen Apoptosestimulus *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL) beeinflussen.

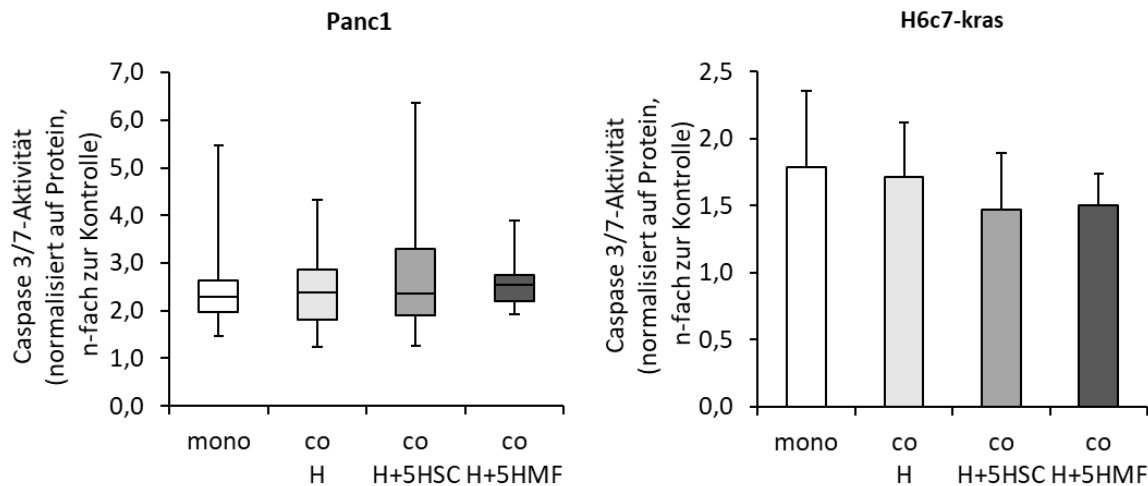


Abbildung 5: Hepatische Stromazellen beeinflussen das Ansprechen von Panc1-Zellen auf den endogenen Apoptosestimulus TRAIL nicht, während H6c7-kras-Zellen eine geringere Apoptoserate aufweisen. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 der PDEZ wurde nach 24-stündiger TRAIL-Inkubation (100 ng/ml) mittels Caspase-Glo® 3/7-Assay gemessen und auf die Proteinkonzentration normalisiert. Die PDEZ wurden dafür fünf Tage entweder als Monokultur (mono), in indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten kultiviert und anschließend für 24 h mit TRAIL inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte PDEZ, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Gezeigt sind die Veränderungen der auf die Proteinkonzentration normalisierten Caspase-Aktivität nach TRAIL-Inkubation, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle, dargestellt als n-fache Veränderung mit Medianen und 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum für Panc1-Zellen und Mittelwerte mit SD für H6c7-kras-Zellen aus sieben bis acht unabhängigen Versuchen.

Beide PDEZ-Linien zeichneten sich nach TRAIL-Behandlung, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen, durch eine etwa verdoppelte Apoptoserate aus (Abbildung 5). Die hepatische Mikroumgebung schien in Panc1-Zellen keinen Einfluss auf die Caspase-Aktivität nach TRAIL-Behandlung zu haben, es war jedoch eine große Streuung der Ergebnisse zu beobachten. Prämaligne H6c7-kras-Zellen hingegen wiesen nach TRAIL-stimulierter Kokultur mit Leberzellen eine leicht verringerte Caspase-Aktivität verglichen mit monokultivierten Zellen auf, die sich zwischen mit HSC- und HMF-angereicherten Hepatozyten kaum unterschied.

Die Daten deuten darauf hin, dass eine hepatische Umgebung maligne Panc1-Zellen nicht in ihrem Ansprechen auf den Apoptosestimulus TRAIL beeinflusst, prä-maligne H6c7-kras-Zellen in der Leberumgebung jedoch eher vor TRAIL-vermittelter Apoptose geschützt sind.

4.2.2 Ansprechen von PDEZ auf die Zytostatika Gemcitabin, 5-Fluorouracil und Cisplatin

Nicht nur endogene Faktoren können das Apoptoseverhalten von PDEZ induzieren, sondern auch exogene Faktoren wie beispielsweise Zytostatika.

Welchen Einfluss die hepatische Mikroumgebung auf das Ansprechen von PDEZ auf unterschiedliche Zytostatika hat, wurde durch die Bestimmung der Apoptoserate nach der Kokultur mit unterschiedlichen Leberzellpopulationen und Stimulation mit Gemcitabin, 5-Fluorouracil und Cisplatin untersucht (Abbildung 6).

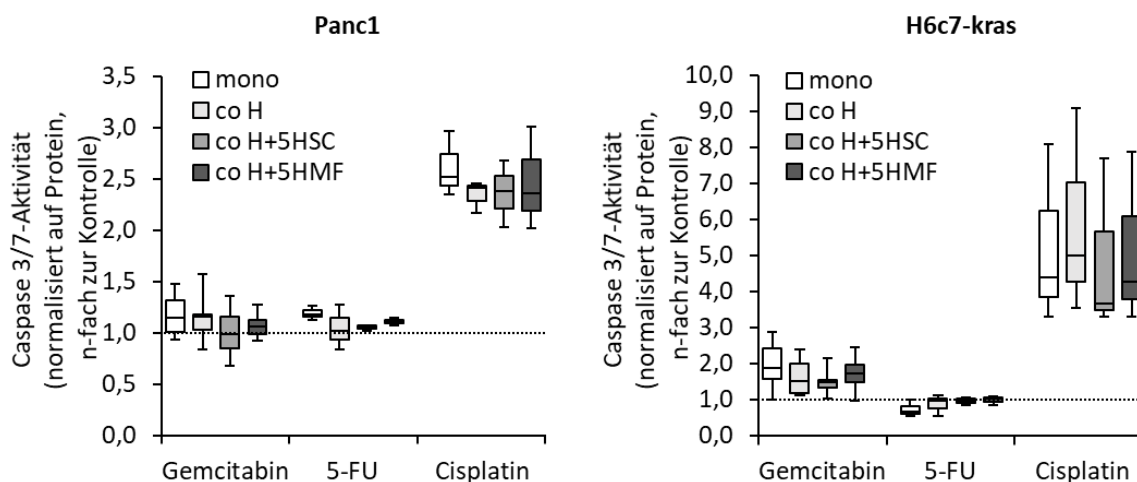


Abbildung 6: Hepatische Stromazellen beeinflussen das Ansprechen von PDEZ nach Zytostatika-Behandlung kaum. Für die Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 mittels Caspase-Glo® 3/7-Assay wurden PDEZ nach 5-tägiger Mono- bzw. Kokultur mit hepatischen Stromazellen für 24 h mit 20 µg/ml Gemcitabin, 10 µg/ml 5-Fluorouracil (5-FU) oder 10 µg/ml Cisplatin behandelt. Als hepatische Stromazellen dienten Hepatozyten alleine (co H) oder angereichert mit 5 % HSC (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF (co H+5HMF). Als Kontrolle dienten unbehandelte PDEZ, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Gezeigt sind die n-fachen Veränderungen der auf die Proteinkonzentration normalisierten Caspase-Aktivität nach Zytostatika-Inkubation, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle, dargestellt als Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus sieben bis acht (Gemcitabin) bzw. drei (5-Fluorouracil, Cisplatin) unabhängigen Experimenten. Die Werte der unbehandelten Kontrolle (= 1,0) sind durch eine Linie markiert.

Die malignen Panc1-Zellen zeigten verglichen mit unbehandelten Zellen sowohl nach Gemcitabin- als auch nach 5-Fluorouracil-Gabe kaum Veränderungen in der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7. Unter Einfluss der hepatischen Stromazellen konnte jeweils eine leicht verringerte Apoptoserate beobachtet werden, die unter physiologischen Bedingungen, also mit Hepatozyten allein oder mit 5 % HSC-angereicherten Hepatozyten, am niedrigsten war. Eine Cisplatin-Behandlung hingegen bewirkte eine etwa 2,5-fache Erhöhung der Apoptoserate in monokultivierten Panc1-Zellen, die ebenfalls unter dem Einfluss aller Leberzellen kokultivierter Bedingungen etwas verringert war.

H6c7-kras-Zellen zeichneten sich durch eine stärkere Erhöhung der Apoptoseraten nach Gemcitabin- und Cisplatin-Behandlungen aus verglichen mit den entsprechenden malignen PDEZ. Während die Gemcitabin-behandelten H6c7-kras-Zellen unter Einfluss der physiologischen Mikroumgebung, das heißt mit Hepatozyten allein oder mit 5 % HSC-angereicherten Hepatozyten, eine leicht verringerte Aktivität der Caspasen zeigten, war dieser Effekt bei Cisplatin nicht zu beobachten. Die Streuung der Ergebnisse war hier allerdings hoch. 5-Fluorouracil hatte keine Auswirkungen auf die Apoptoserate dieser prämaligen Zellen, weder unter Monokultur noch unter Einfluss der hepatischen Zellen.

Insgesamt ließ sich also vor allem eine gesteigerte Apoptoserate nach Cisplatin-Behandlung sowohl bei monokultivierten prämaligen als auch bei malignen PDEZ ausmachen. Eine hepatische Umgebung schien die Zellen eher vor dem Einfluss der Zytostatika zu schützen, dargestellt durch leicht verminderte Aktivitäten der Effektor-Caspasen 3 und 7.

4.3 Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf die EMT in PDEZ

Damit PDEZ sich aus einem Zellverband lösen und in einem sekundären Kontext ansiedeln können, müssen bestimmte zelluläre und molekulare Änderungen eintreten. Im Prozess der EMT verlieren Zellen ihren epithelialen Charakter und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an, der z. B. durch die verstärkte Expression der Proteine Vimentin und LICAM sowie eine erhöhte Migrationsrate gekennzeichnet ist (Thiery et al., 2009). Dass die EMT-Eigenschaften von Tumorzellen auch durch die hepatische Mikroumgebung beeinflusst werden können, konnte bereits für Mamma- und Prostatakarzinomzellen gezeigt werden (Chao et al., 2010, 2012b).

4.3.1 Western Blot zur Detektion der EMT-Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin in PDEZ

Inwieweit die hepatische Mikroumgebung den Prozess der EMT der PDEZ beeinflusst, wurde auf Proteinebene im Western Blot untersucht. Dafür wurde die Proteinexpression von E-Cadherin, L1CAM und Vimentin in Gesamtzelllysaten der PDEZ unter verschiedenen Kulturbedingungen eines Versuchs betrachtet (Abbildung 7).

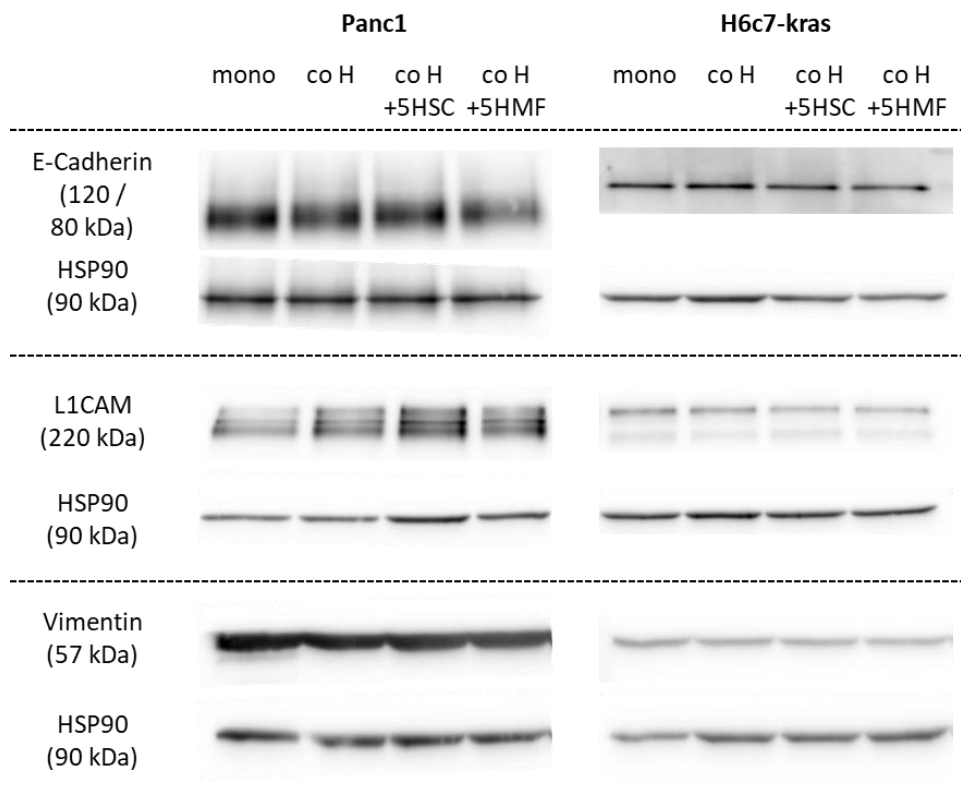


Abbildung 7: Hepatische Stromazellen haben keinen Einfluss auf die Expression der EMT-Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin. Für die Western Blot-Analyse wurden 10 µg eines Gesamtzelllysates der jeweiligen PDEZ verwendet und das epitheliale Markerprotein E-Cadherin sowie die mesenchymalen Markerproteine L1CAM und Vimentin detektiert. Als Housekeeper diente HSP90. Dafür wurden die PDEZ sechs Tage entweder als Monokultur (mono), in indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten kultiviert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus sieben bis 14 unabhängigen Experimenten.

Weder bei Panc1- noch bei H6c7-kras-Zellen beeinflusste die Kokultivierung mit hepatischen Stromazellen die Expression von E-Cadherin, jedoch unterschied sich die Größe des nachgewiesenen Proteins bei beiden Zelllinien. Während E-Cadherin bei H6c7-kras-Zellen eine Größe von etwa 120 kDa aufwies, was der transmembranständigen Form des Proteins

entspricht, wurde in Panc1-Zellen, unabhängig der Kulturbedingungen, ein etwa 80 kDa großes Produkt nachgewiesen. Letzteres entspricht der Größe einer löslichen Variante von E-Cadherin. Unterschiede konnten jedoch bei der Expression des mesenchymalen Markerproteins L1CAM in den PDEZ festgestellt werden. So ließen sich im Gesamtzelllysat der Panc1-Zellen nach Einfluss der Leberzellen gesteigerte L1CAM-Level erkennen. Die prämaligen H6c7-kras-Zellen wiesen dagegen unter diesen Bedingungen keine erhöhte, eher eine leicht verminderte Expression von L1CAM auf.

Die Expression von Vimentin, das wie L1CAM ebenfalls ein Markerprotein für den mesenchymalen Charakter einer Zelle darstellt, unterlag bei keiner der untersuchten Gesamtzelllysate der unterschiedlichen Zelllinien einer Veränderung unter den verschiedenen Kulturbedingungen.

Es ist also festzustellen, dass die Lebermikroumgebung den EMT-Phänotyp von PDEZ vor allem durch den Proteingehalt des L1CAM beeinflusst.

4.3.2 Immunzytochemische Färbung der EMT-Marker E-Cadherin und L1CAM in PDEZ

Während im Western Blot die Lysate aller PDEZ einer Kulturbedingung untersucht werden, besteht bei immunzytochemischen Färbungen die Möglichkeit, die Proteinexpression einzelner Zellen einer Gesamtpopulation zu betrachten. Hierfür wurde neben Einzelfärbungen für E-Cadherin und L1CAM in H6c7-kras- und Panc1-Zellen auch eine Kofärbung dieser Proteine in Panc1-Zellen durchgeführt (Abbildung 8 A).

Vor allem die Kofärbung von E-Cadherin und L1CAM machte deutlich, dass die Verteilung der Expression beider Proteine innerhalb dieser Zellpopulation sehr heterogen war. So waren in der Panc1-Zellpopulation Zellen auszumachen, die nur E-Cadherin oder nur L1CAM exprimierten, jedoch gab es auch Zellen, die eine Färbung für beide Proteine aufwiesen. Darüber hinaus gab es Zellen, die für beide Proteine negativ zu sein schienen. Selbst benachbarte und morphologisch ähnliche Zellen wiesen unterschiedliche Expressionsmuster auf.

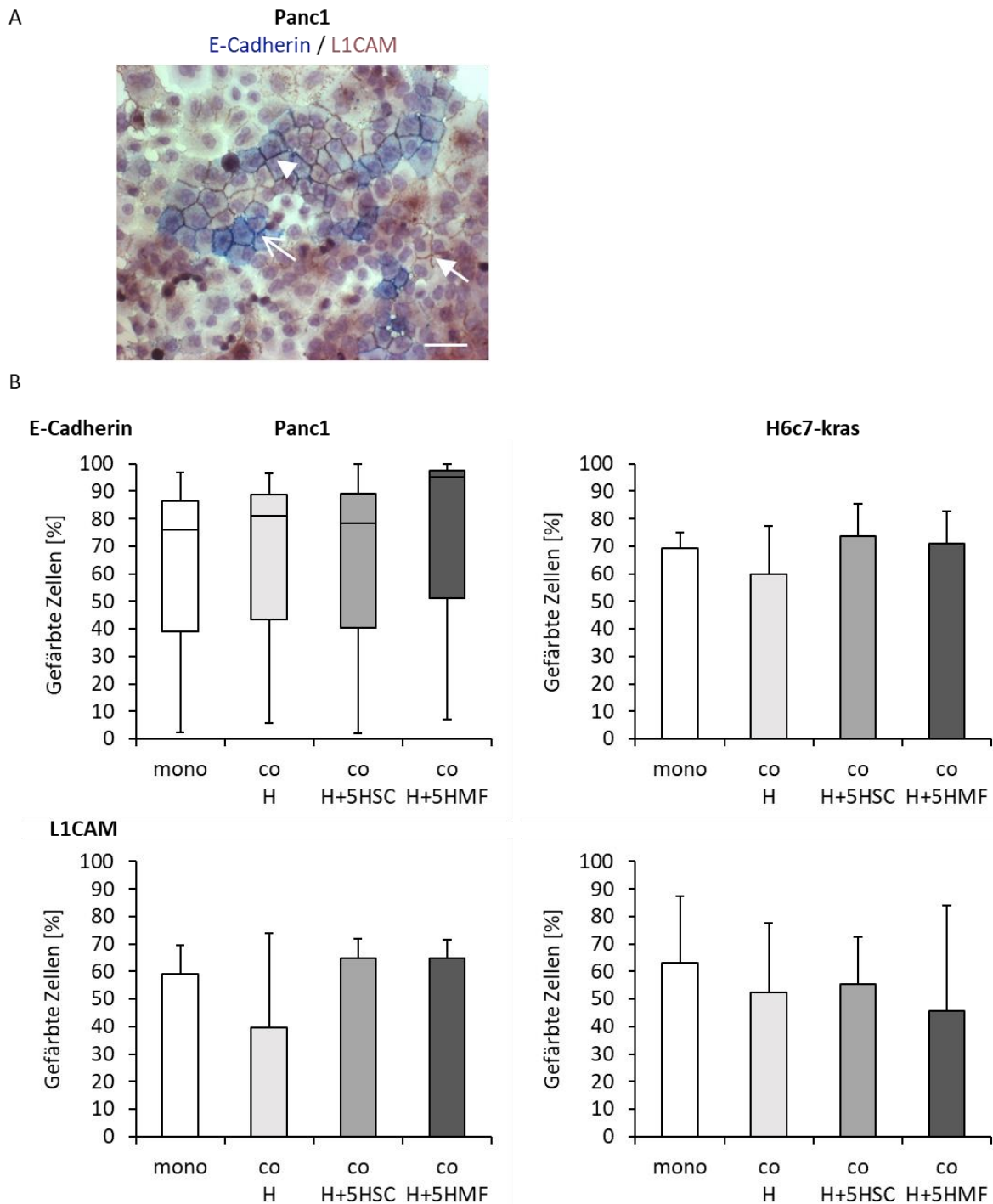


Abbildung 8: PDEZ weisen eine heterogene Verteilung von E-Cadherin und L1CAM auf, die durch hepatische Stromazellen kaum beeinflusst wird. Für die immunzytochemischen Doppel- (A) und Einzelfärbungen (B) von E-Cadherin und L1CAM wurden Panc1-Zellen für sechs Tage in Monokultur (mono), indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder versehen mit 5 % HSC (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF (co H+5HMF) auf Deckgläsern kultiviert. Eine Kernfärbung erfolgte mit Mayer's Hämalaun. (A) Abgebildet ist ein repräsentativer Bereich einer E-Cadherin (blau)-L1CAM (rot)-Doppelfärbung monokultivierter Panc1-Zellen. Der gefüllte Pfeil zeigt auf eine L1CAM-positive Zelle, der ungefüllte Pfeil markiert eine E-Cadherin-positive Zelle, die Pfeilspitze kennzeichnet eine E-Cadherin-L1CAM-positive Zelle. Der Maßstab entspricht 50 μ m. (B) Der Anteil der gefärbten Zellen von Einzelfärbungen für E-Cadherin oder L1CAM wurde in fünf Sichtfeldern pro Probe bestimmt. Dafür wurden alle Zellen berücksichtigt, die eine horizontale Linie berührten. Dargestellt sind

Abbildung 8 (Fortsetzung): Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum bzw. Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Durchführung einer Quantifizierung ergab, dass sich weder die E-Cadherin- noch die L1CAM-Expression in beiden untersuchten Zelllinien unter den verschiedenen Kulturbedingungen signifikant unterschied (Abbildung 8 B). Die Streuung war jedoch besonders bei der E-Cadherin-Expression der Panc1-Zellen hoch. Bei H6c7-kras-Zellen konnte eine leichte Abnahme der L1CAM-Expression unter Einfluss des entzündlichen Mikromilieus (co H+5HMF) verglichen mit der physiologischen Mikroumgebung (co H und co H+5HSC) ausgemacht werden.

Die immunzytochemische Analyse der EMT-Marker E-Cadherin und L1CAM zeigte, dass die Verteilung der Genexpression innerhalb der Zellpopulationen einer Kulturbedingung sehr heterogen ist und sich einzelne Klone innerhalb einer Population voneinander unterscheiden lassen.

4.3.3 Invasionsvermögen der PDEZ unter Einfluss einer hepatischen Mikroumgebung

Der EMT-Phänotyp von PDEZ wird mit der Fähigkeit zur Migration und Invasion dieser Zellen assoziiert. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine verminderte Expression von L1CAM auch das Migrations- und Invasionspotential von PDEZ abschwächt (Geismann et al., 2009). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob hepatische Stromazellen einen Einfluss auf das Invasionsvermögen von PDEZ haben. Dafür wurde das *RTCA*-System xCELLigence (ACEA Biosciences) verwendet, das eine kontinuierliche Beobachtung der invadierenden PDEZ durch eine Kollagenschicht in Echtzeit über 24 h ermöglichte (Abbildung 9).

Das Invasionsvermögen der Panc1-Zellen durch eine Kollagenschicht zeigte nach 6 h ein Maximum und unterschied sich zu diesem Zeitpunkt in der xCELLigence-Analyse im Mittel nach Monokultur oder Kokultur mit hepatischem Mikromilieu nicht. Die Streuung der Ergebnisse war jedoch hoch. Bei H6c7-kras-Zellen konnte im gleichen Zeitraum eine um 27,1 bis 34,9 % verminderte Invasionsrate der mit Leberzellen kokultivierten PDEZ im Vergleich zu monokultivierten Zellen beobachtet werden.

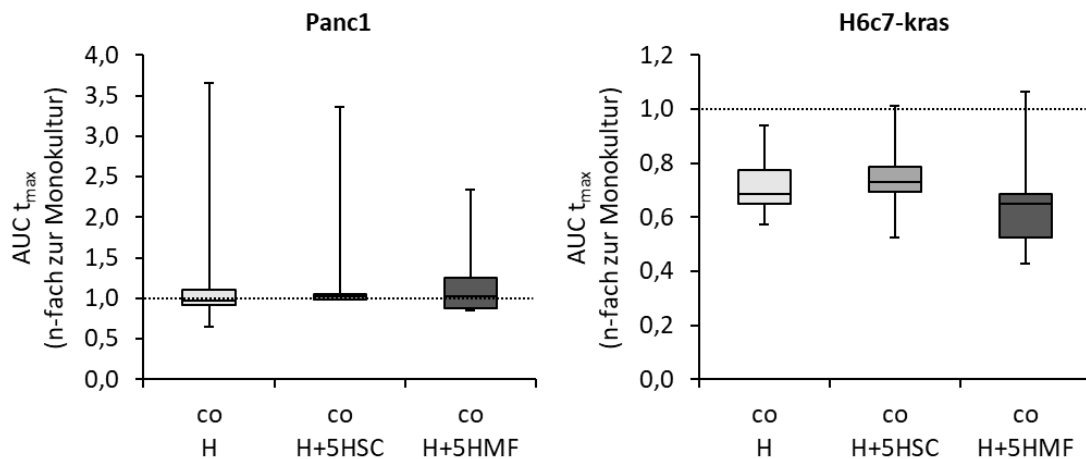


Abbildung 9: Hepatische Stromazellen verringern das Invasionsvermögen von H6c7-kras-, jedoch nicht von Panc1-Zellen. Die Bestimmung des Invasionsverhaltens erfolgte nach 6-tägiger Mono- oder Kokultur der PDEZ mittels Kollagen-beschichteter Kammern des xCELLigence RTCA-Systems. Die indirekte Kokultur wurde mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) bis zum Zeitpunkt des höchsten Invasionswertes (t_{max} entspricht 6 h nach Start des Invasionsassays) der Monokultur für alle Kulturbedingungen berechnet und als n-fache Veränderung zur Monokultur dargestellt. Abgebildet sind die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus fünf bis sieben unabhängigen Versuchen. Die Werte der Monokultur (= 1,0) sind durch eine Linie gekennzeichnet.

Insgesamt scheint eine hepatische Umgebung die Invasionsrate von malignen Panc1-Zellen nicht zu beeinflussen, während prämaligene H6c7-kras-Zellen neben einer leicht verminderten L1CAM-Expression (Abbildung 7 und Abbildung 8) auch ein vermindertes Invasionsvermögen unter Einfluss des Lebermikromilieus aufweisen.

4.4 Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ

Neben der Fähigkeit von PDEZ zur EMT werden auch CSC-Eigenschaften dieser Zellen als entscheidend für die Tumorprogression und Metastasierung angesehen (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007; Mani et al., 2008). In welcher Weise die Lebermikroumgebung die CSC-Eigenschaften von PDEZ beeinflusst, wurde im folgenden Abschnitt analysiert.

4.4.1 Koloniebildungseigenschaften von PDEZ

Als eine charakteristische Eigenschaft von CSCs *in vitro* gilt die Fähigkeit zur Koloniebildung aus Einzelzellen, die in CFAs untersucht wird (Beaver et al., 2014; Li et al., 2008; Tan et al., 2011). Um zu überprüfen, inwieweit sich die hepatische Umgebung auf die Fähigkeit zur Koloniebildung der PDEZ auswirkt, wurden diese nach Kokultur mit unterschiedlichen hepatischen Stromazellen in geringer Dichte als Einzelzellen ausgesät und die Formation von Kolonien im Vergleich zu monokultivierten PDEZ betrachtet (Abbildung 10).

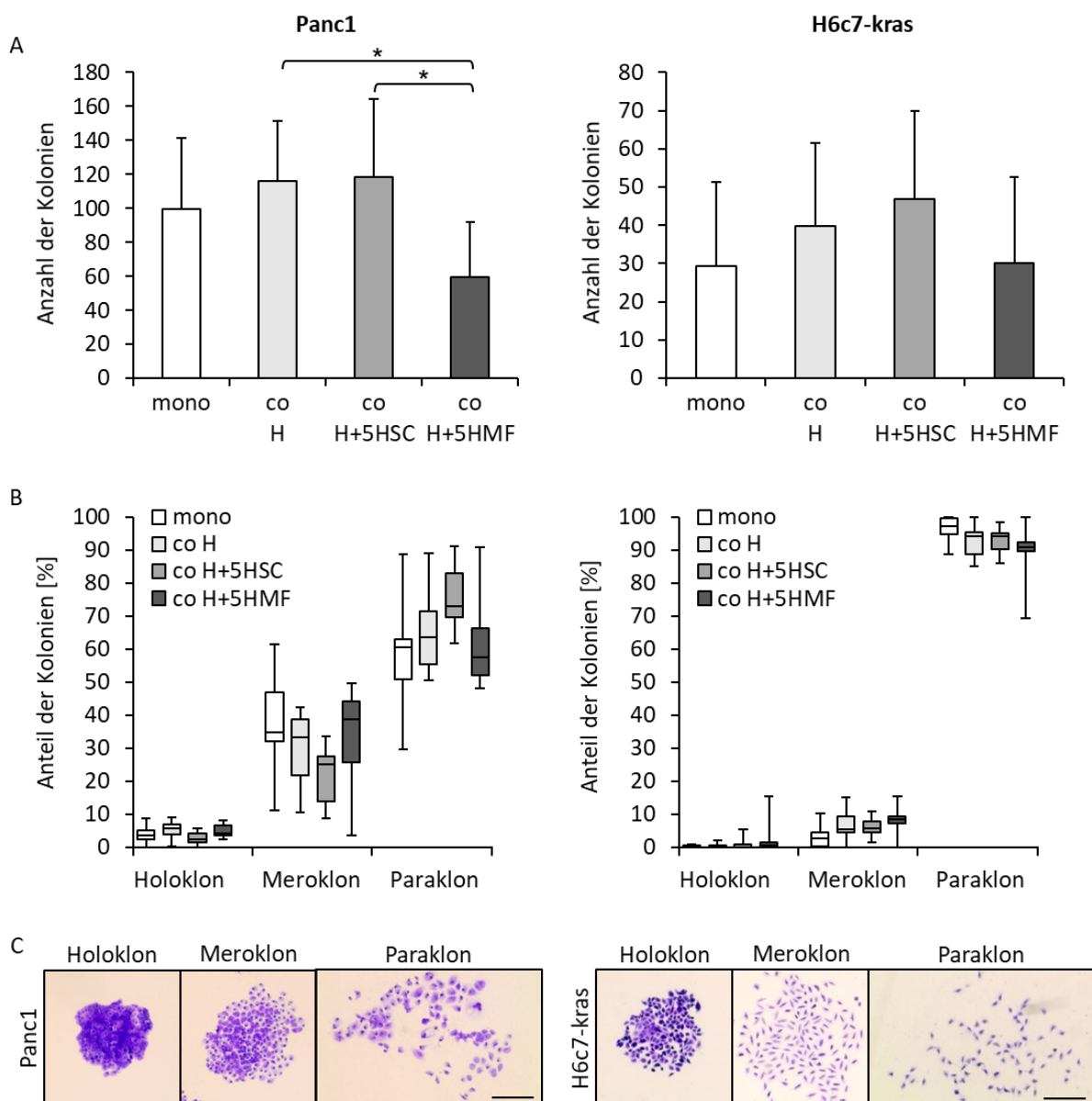


Abbildung 10: Eine physiologische Mikroumgebung bewirkt einen Anstieg der Kolonienzahl von PDEZ im CFA. Nach 6-tägiger Mono- oder Kokultur wurde ein CFA angesetzt, dessen Kolonien nach weiteren zehn Tagen mit Kristallviolett gefärbt wurden, um ihre Anzahl und Kolonieform zu bestimmen. Für die Kultur wurden die

Abbildung 10 (Fortsetzung): Panc1- oder H6c7-kras-Zellen monokultiviert, in indirekter Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten kokultiviert. (A) Die Gesamtanzahl an Kolonien, die aus über 50 Zellen bestanden, wurde als Mittelwert mit SD aus sechs (H6c7-kras) oder sieben (Panc1) unabhängigen Versuchen aufgetragen. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet. (B) Prozentuale Anteile von Holo-, Mero- und Paraklonen an der Gesamtanzahl an Kolonien mit über 50 Zellen, dargestellt als Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum. Auf die Darstellung von Signifikanzen wurde aus Gründen der Übersicht verzichtet, wobei keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen der Kolonien durch verschiedene Kulturbedingungen detektiert wurden. (C) Für Panc1- und H6c7-kras-Zellen sind repräsentative Kristallviolett-gefärbte Kolonien abgebildet, die als Holo-, Mero- oder Paraklon charakterisiert wurden. Der Maßstab entspricht 250 µm.

Zunächst wurde festgestellt, dass die Anzahl an Kolonien von Panc1-Zellen unabhängig ihrer Kulturbedingung höher war als die der prämaligen H6c7-kras-Zellen. Beide Zelllinien zeigten eine verminderte Anzahl an Kolonien aus Zellen, die unter Einfluss eines entzündlichen hepatischen Mikromilieus (co H+5HMF) standen im Vergleich zum Einfluss einer physiologischen Umgebung (co H und co H+5HSC), unter der die meisten Kolonien detektiert werden konnten (Abbildung 10 A). Betrachtete man die Zusammensetzung der Kolonien aus den unterschiedlichen Formen Holo-, Mero- und Paraklon, wie sie beispielhaft in Abbildung 10 C dargestellt sind, so konnte bei Panc1-Kolonien jede dieser Formen ausgemacht werden (Abbildung 10 B). Dabei betrug der Anteil von Paraklonen 57,5 bis 72,9 %, Meroklone machten 25,0 bis 38,8 % aus und 2,5 bis 5,9 % der Kolonien wurden als Holoklon beurteilt. Die erhöhte Anzahl an Panc1-Kolonien nach Kokultur mit HSC-angereicherten Hepatozyten war vor allem auf einen Anstieg der Anzahl an Paraklonen zurückzuführen. Die sonstige Verteilung der Klonformen unterschied sich zwischen den Kulturbedingungen kaum. H6c7-kras-Kolonien hingegen wurden zumeist (90,8 bis 97,2 %) als Paraklon charakterisiert, 2,8 bis 8,4 % wurden als Meroklone gesehen und nur vereinzelt konnte die Bildung von Holoklonen ausgemacht werden. Auch bei diesen Zellen war zwar ein Effekt der hepatischen Stromazellen auf die Anzahl der gebildeten Kolonien zu sehen, es konnten jedoch keine Unterschiede in der Verteilung der Klonformen durch Einfluss der hepatischen Mikroumgebung ausgemacht werden.

In Abbildung 10 B wurde aus Gründen der Übersicht auf die Darstellung von Signifikanzen verzichtet. Eine Mann-Whitney-U-Überprüfung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Kolonien unterschiedlicher Formen, jedoch nicht innerhalb der Kolonieförmlichkeiten unterschiedlicher Kulturbedingungen. Dies galt sowohl bei Panc1- als auch bei H6c7-kras-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass das Koloniebildungsvermögen von PDEZ in einem physiologischen Lebermikromilieu erhalten und gefördert wird.

4.4.2 Expression der CSC-Marker Nestin, Nanog und ABCG2 in PDEZ

Neben der Fähigkeit der Koloniebildung sind CSCs durch die Expression bestimmter Marker gekennzeichnet. Für die hier verwendeten PDEZ-Linien haben sich aus Voruntersuchungen Nestin, Nanog und ABCG2 als relevant erwiesen (Daten nicht gezeigt).

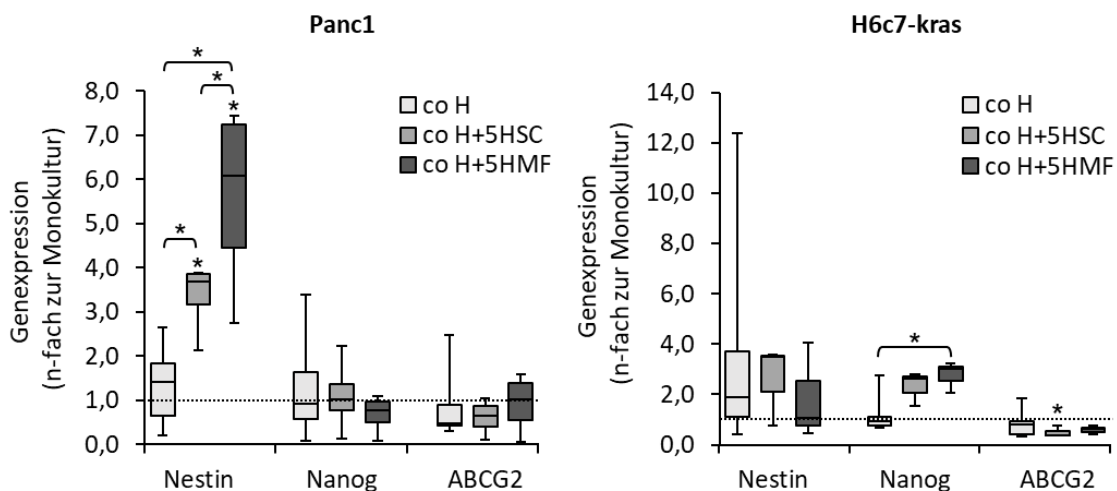


Abbildung 11: Hepatische Stromazellen bewirken einen Anstieg der Genexpression der CSC-Marker Nestin und Nanog in PDEZ. Die Genexpression der CSC-Marker Nestin, Nanog und ABCG2 wurde mittels reverser Transkription und qPCR analysiert. Dafür wurde die RNA der PDEZ nach 6-tägiger Mono- oder indirekter Kokultur gewonnen, wobei die Kokultur mit Hepatozyten alleine (co H) oder mit 5 % HSC- (co H+5HSC) bzw. 5 % HMF- (co H+5HMF) angereicherten Hepatozyten durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden auf den Housekeeper GAPDH normalisiert, als n-fache Veränderung zur Monokultur gezeigt und stellen die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus drei bis acht unabhängigen Versuchen dar. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, wobei ein * ohne Markierung als Signifikanz zur Monokultur zu verstehen ist. Die Werte der Monokultur (= 1,0) sind durch eine Linie markiert.

Während Panc1-Zellen nach Kokultur mit hepatischen Zellen, insbesondere nach Einfluss einer entzündlichen Mikroumgebung (co H+5HMF), vor allem durch einen Anstieg der Nestin-Expression gekennzeichnet waren, konnten keine Veränderungen der Nanog-Expression durch den Einfluss der Leberzellen beobachtet werden (Abbildung 11). Die ABCG2-Expression lag

nach Kokultur mit Hepatozyten alleine sowie HSC-angereicherten Hepatozyten leicht unter der anderen Kulturbedingungen.

In H6c7-kras-Zellen war die Expression von Nestin im Vergleich zur Monokultur unter physiologischen Leberbedingungen (co H und co H+5HSC) in etwa verdoppelt. Ein signifikanter Anstieg von Nanog konnte nach Kokultur mit HMF-angereicherten Hepatozyten im Vergleich zu Hepatozyten alleine (co H) ausgemacht werden. Die ABCG2-Expression war verglichen mit der Monokultur unter allen Kokultur-Bedingungen vermindert.

Insgesamt schienen in den beiden untersuchten PDEZ-Zelllinien unterschiedliche CSC-Marker durch die hepatischen Stromazellen reguliert zu werden. Eine Lebermikroumgebung wirkte sich in Panc1-Zellen vor allem auf die Nestin-Expression aus, während in H6c7-kras-Zellen auch eine verstärkte Expression von Nanog nachgewiesen werden konnte.

4.5 Charakterisierung von Holo-, Mero- und Paraklonen *in vitro*

CSCs machen nur einen kleinen Teil einer Population von PDEZ aus (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007), weshalb es schwierig ist, ihre Funktion und ihre Eigenschaften in einer Gesamtpopulation dieser Zellen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden PDEZ-Klone unterschiedlicher Formen aus Einzelzellen generiert (Abbildung 12) und diese hinsichtlich ihrer CSC-Eigenschaften charakterisiert.

Da die höchste Anzahl an Kolonien in Gegenwart eines HSC-angereicherten Lebermilieus zu beobachten war (Abbildung 10 A), wurden Panc1- und H6c7-kras-Zellen nach einer 6-tägigen Kokultur unter diesen Bedingungen als Einzelzellen in Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und das Koloniewachstum alle zwei bis vier Tage mikroskopisch kontrolliert. Für die weiteren Analysen wurden nur Kolonien betrachtet, die von genau einer PDEZ abstammten und in einem CFA überwiegend Kolonien ihrer ursprünglichen Form bildeten. Da einzelne Klone nur für eine begrenzte Passagenzahl diesen Phänotyp behielten, konnte für die *in vivo*- und *in vitro*-Analysen zwar mit Klonen gleicher CFA-Eigenschaften, nicht aber mit denselben Klonen gearbeitet werden. Für die vereinfachte Herstellung dieser Klone wurden daher auch monokultivierte PDEZ als Ausgangszellen verwendet, deren Charakteristika sich nicht von den mit Hepatozyten und HSC-kokultivierten unterschieden (Daten nicht gezeigt).

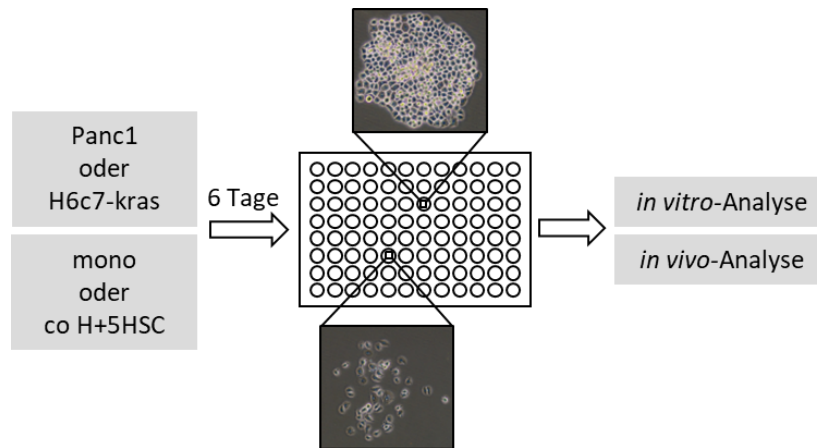


Abbildung 12: Schematischer Überblick über die Erzeugung von Holo-, Mero- und Paraklonen aus Einzelzellen zur weiteren Charakterisierung der Klonformen. Nach 6-tägiger indirekter Kokultur von PDEZ mit HSC-angereicherten Hepatozyten wurden die PDEZ als Einzelzellen in eine 96-Well-Platte überführt. Die Bildung von Kolonien wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und nur Kolonien, die aus genau einer Zelle hervorgegangen waren sowie in einem CFA überwiegend Kolonien ihres Typs formten, wurden für anschließende Analysen verwendet. Alternativ zu kokultivierten wurden monokultivierte PDEZ für die Einzelzellklonierung verwendet.

4.5.1 Charakterisierung der PDEZ-Klone aus Panc1- und H6c7-kras-Einzelzellen hinsichtlich ihres Koloniebildungsvermögens

Aus den Panc1-Zellen konnten über das oben dargelegte Vorgehen (siehe Kapitel 4.5) Paraklon- und Holoklon-Populationen gewonnen werden, die in CFAs über mehrere Passagen einen stabilen Phänotyp aufwiesen. Für H6c7-kras-Zellen gelang dies sowohl für Paraklone als auch für Meroklone (Abbildung 13).

Während sich die Anzahl der Kolonien von Panc1-Para- und Holoklonen nicht unterschied, wiesen H6c7-kras-Meroklone eine signifikant höhere Anzahl an Kolonien auf als die korrespondierenden Paraklone (Abbildung 13 A). Bei Betrachtung der Verteilung der Kolonietypen zeigte sich, dass die Klone einer Form überwiegend Kolonien dieser Form bildeten (Abbildung 13 B). Das bedeutet, dass Panc1-Paraklon-Zellen überwiegend Paraklone formten (100,0 %), Panc1-Holoklon-Zellen dagegen vorwiegend Holo- (63,6 %) und Meroklone (31,8 %) und nur vereinzelt Paraklone (4,5 %). Ähnlich verhielten sich die H6c7-kras-Paraklon-Zellen, die zu 98,9 % Paraklone bildeten. Bei den H6c7-kras-Meroklon-Zellen konnte ein Anteil an Meroklonen von 33,1 % erreicht werden, wobei diese Zellen zu 65,8 % Paraklone formten.

Insgesamt ließ sich demnach eine deutliche Anreicherung an Kolonien der unterschiedlichen Phänotypen durch die Expansion aus den entsprechenden Einzelzellen erzielen.

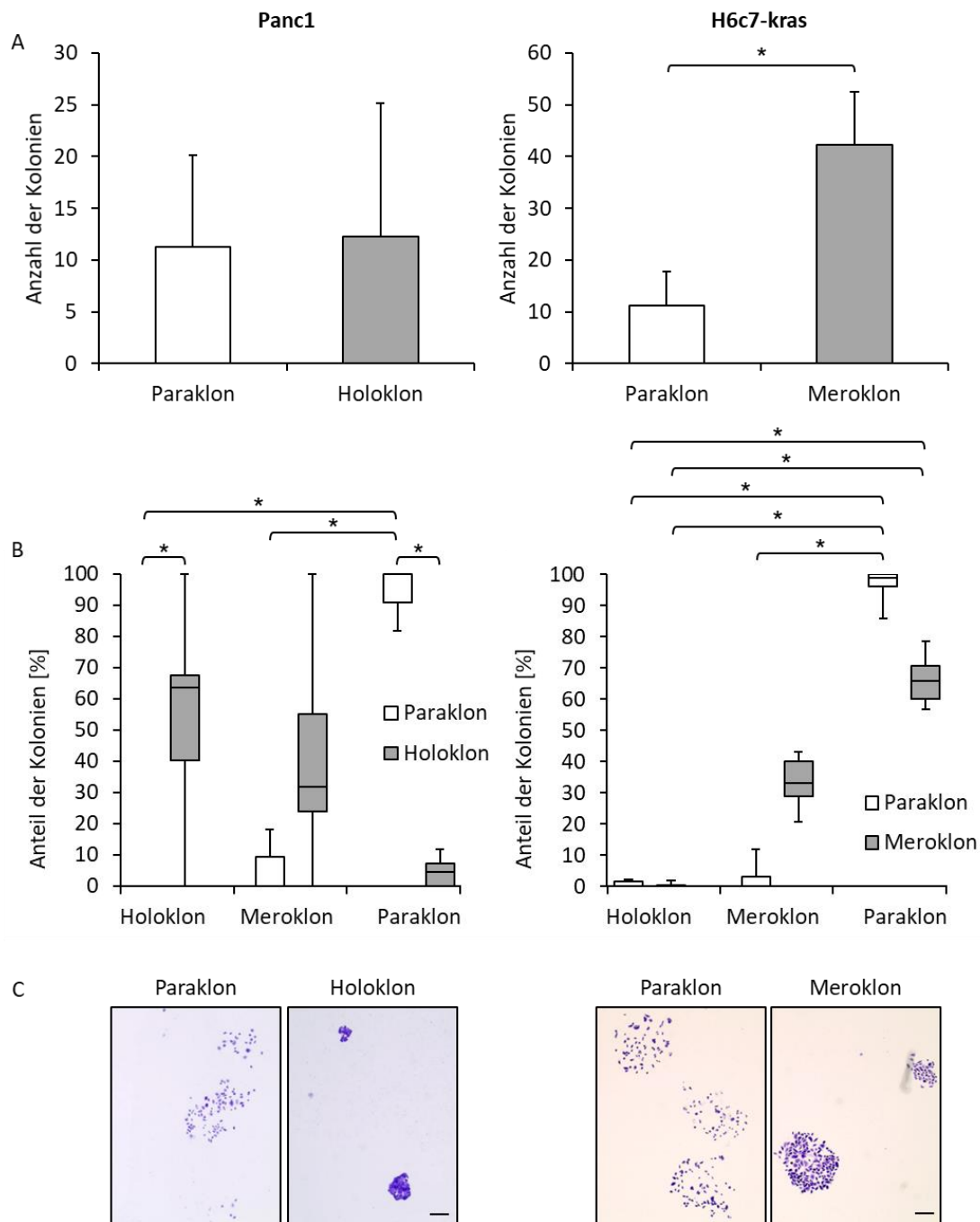


Abbildung 13: Klone, die aus Einzelzellen expandiert wurden, bringen überwiegend Kolonien ihrer ursprünglichen Form hervor. Für die Bestimmung des Koloniebildungsverhaltens wurden CFAs mit Zellen aus Kolonien, die aus einer einzelnen Zelle stammten, durchgeführt. Nach 11-tägiger Wachstumsphase wurden die Kolonien Kristallviolett-gefärbt und (A) ihre Anzahl mit über 50 Zellen sowie (B) der Anteil der Kolonien einer Form bestimmt. Die Daten aus sechs (H6c7-kras) oder sieben (Panc1) unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte mit SD bzw. Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum abgebildet. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet. (C) Repräsentative Kolonien von Panc1-Para- und Holoklonen sowie H6c7-kras-Para- und Meroklonen. Maßstab 250 µm.

4.5.2 Charakterisierung der PDEZ-Klone aus Panc1- und H6c7-kras-Einzelzellen hinsichtlich ihrer CSC-Marker-Expression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die generierten Klone in ihrem Phänotyp stabil waren (Abbildung 13), wurde die Expression der CSC-Marker Nestin, Nanog und ABCG2 mittels qPCR untersucht (Abbildung 14).

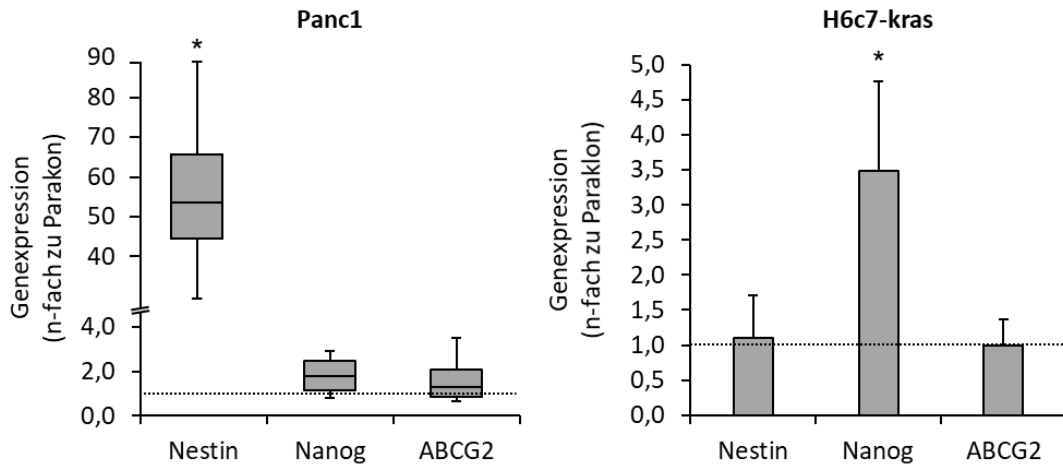


Abbildung 14: CSC-Marker Nestin weist in Panc1-Holoklonen und Nanog in H6c7-kras-Meroklonen eine erhöhte Genexpression verglichen mit entsprechenden Paraklonen auf. Die Genexpression der CSC-Marker Nestin, Nanog und ABCG2 wurde mittels reverser Transkription und qPCR analysiert. Die Ergebnisse wurden auf den Housekeeper GAPDH normalisiert, sind als n-fache Veränderung zur Monokultur gezeigt und stellen die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum (Panc1) bzw. Mittelwerte mit SD (H6c7-kras) aus vier unabhängigen Versuchen dar. Signifikante Unterschiede zur Genexpression des entsprechenden Paraklons sind durch * gekennzeichnet. Die Werte des Paraklons (= 1,0) sind durch eine Linie markiert.

Verglichen mit der Expression in Paraklonen war die Genexpression von Nestin, Nanog und ABCG2 in den Panc1-Holoklonen verstärkt. Während Nanog und ABCG2 etwas stärker (1,8- bzw. 1,3-fach) als in Paraklonen exprimiert wurden, lag die Nestin-Expression um das 53,7-fache signifikant erhöht vor. In H6c7-kras-Mero- und Paraklonen konnte kein Unterschied in der Expression von Nestin oder ABCG2 festgestellt werden. Nanog hingegen wurde in den Meroklonen im Vergleich zu den Paraklonen um das 3,5-fache erhöht exprimiert.

Insgesamt erschienen Nestin in den Panc1-Klonen und Nanog in den H6c7-kras-Klonen am stärksten differentiell reguliert.

Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede der CSC-Marker-Expression auch auf Proteinebene sichtbar sind, wurden die verschiedenen Klonformen auf Deckgläschen kultiviert und anschließend Nestin und Nanog (Panc1-Klone) bzw. Nanog (H6c7-kras-Klone) mittels Immunfluoreszenz-Färbung detektiert (Abbildung 15).

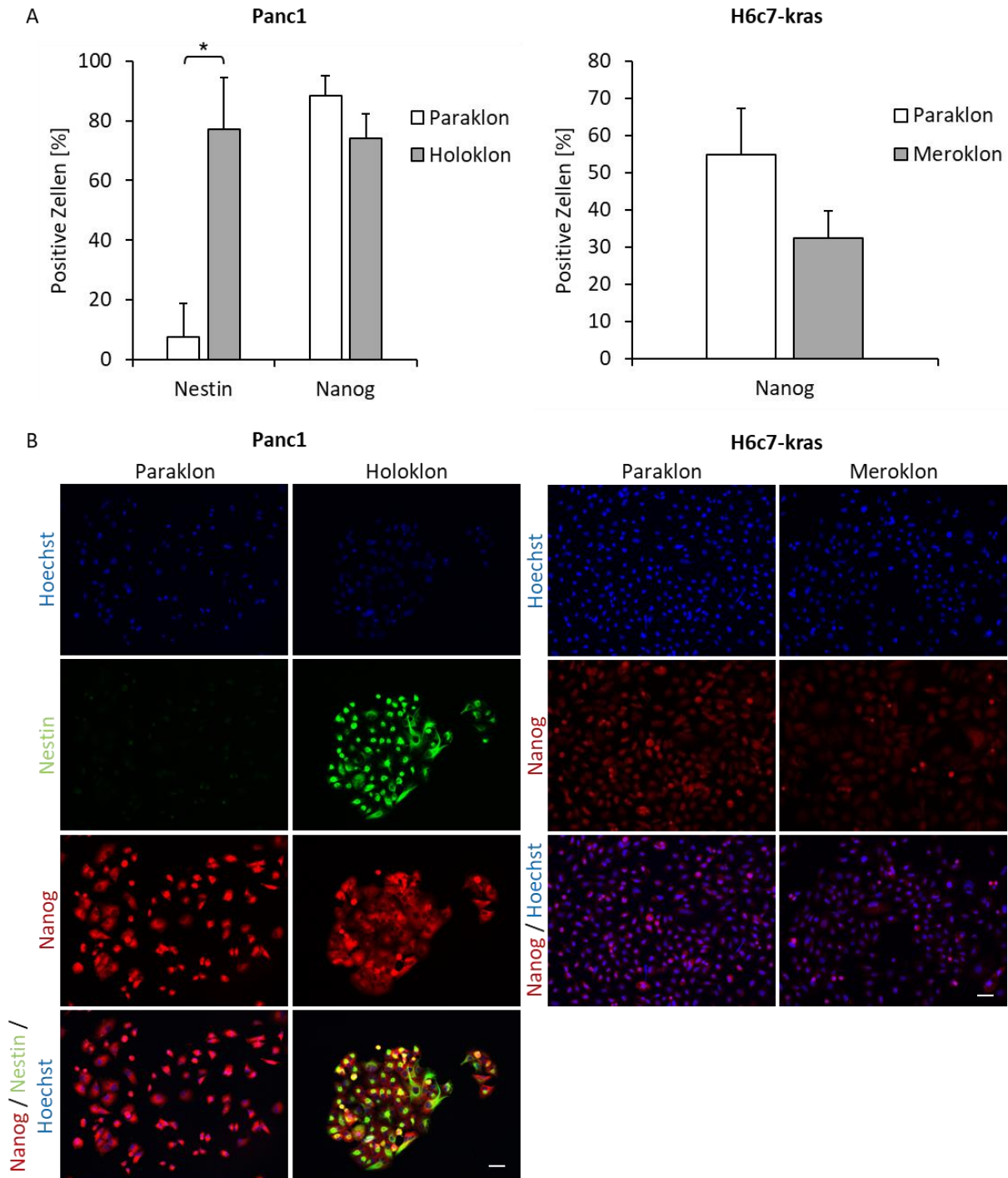


Abbildung 15: CSC-Marker Nestin weist in Panc1-Holoklonen eine erhöhte Expression verglichen mit entsprechenden Paraklonen auf. Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden die PDEZ-Klone auf Deckgläschen kultiviert und Nanog (rot), bei Panc1-Klonen zusätzlich Nestin (grün), angefärbt. Zellkerne sind durch

Abbildung 15 (Fortsetzung): Hoechst 33258 (blau) gefärbt. (A) Anteil der für die entsprechende Färbung positiven Zellen nach Auswertung von fünf Sichtfeldern. Dabei wurden alle Zellen erfasst, die eine horizontale Linie durch das entsprechende Sichtfeld schnitten. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet. (B) Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen der Panc1-Klone auf Nanog und Nestin, der H6c7-kras-Klone auf Nanog. Der Maßstab beträgt 25 µm.

Die Kofärbung von Nestin und Nanog in Panc1-Para- und Holoklonen machte deutlich, dass Nestin in Holoklonen deutlich verstärkt exprimiert wurde. In Panc1-Paraklonen zeigten nur einzelne Zellen ein schwaches Nestin-Signal, Nanog war hingegen in beiden Klonformen auszumachen. 88,5 % der Paraklone bzw. 74,4 % der Holoklone wiesen eine starke Färbung auf. Auch in H6c7-kras-Klonen war eine Nanog-Färbung detektierbar. In Paraklonen lagen mit 54,8 % mehr gefärbte Zellen vor als in den Meroklonen mit 32,3 %.

Während bei Panc1-Holoklonen die deutlich erhöhte Expression von Nestin sowohl auf Gene- als auch auf Proteinebene verglichen mit entsprechenden Paraklonen detektiert werden konnte, zeigten H6c7-kras-Meroklone zwar auf Genebene eine verstärkte Nanog-Expression, die in einer Immunfluoreszenz-Färbung jedoch nicht bestätigt werden konnte.

4.5.3 Charakterisierung der PDEZ-Klone aus Panc1- und H6c7-kras-Einzelnzellen hinsichtlich ihrer basalen Apoptoserate und des Ansprechens auf Apoptosestimuli

CSCs werden nicht nur aufgrund ihres Selbsterneuerungspotentials als wichtiger Faktor in der Tumorentstehung und -progression angesehen, sondern gelten auch als eine Ursache für die schlechte Therapierbarkeit des PDAC, da sie als weitgehend resistent gegenüber Apoptosestimuli beschrieben werden (Hermann et al., 2007; Valle et al., 2018; Zhou et al., 2017).

Um die PDEZ-Klone hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihrer Resistenz gegenüber Apoptosestimuli zu charakterisieren, wurde zunächst ihre basale Apoptoserate bestimmt (Abbildung 16 A), die mit der Caspase-Aktivität nach Stimulation durch verschiedene Agenzien verglichen wurde (Abbildung 16 B).

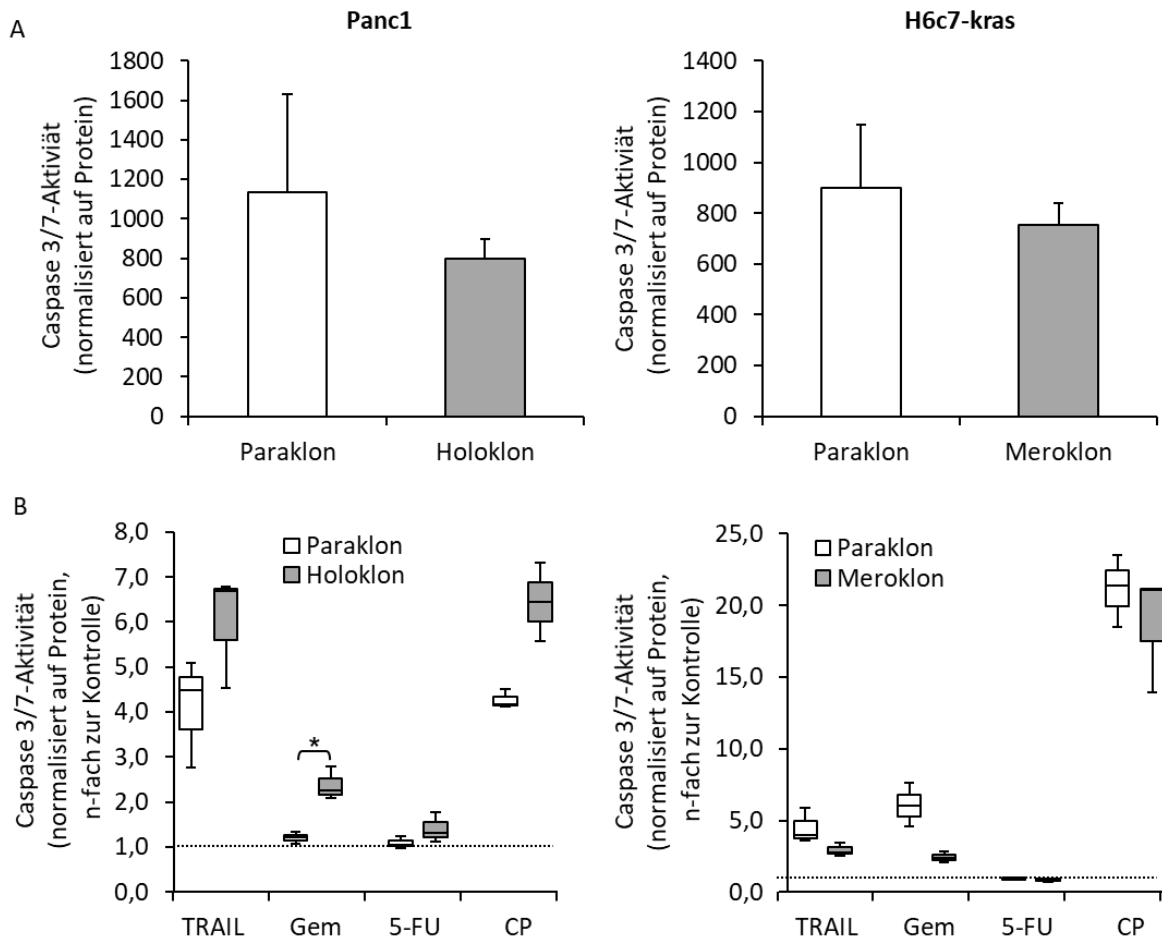


Abbildung 16: Sowohl die basale Caspase-Aktivität als auch das Ansprechen auf Apoptosestimuli unterscheiden sich bei Panc1-Para- und Holoklonen sowie H6c7-kras-Para- und Meroklonen. Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mit Hilfe des Caspase-Glo® 3/7-Assays bestimmt. Dafür wurde die Caspase-Aktivität auf den Proteingehalt der entsprechenden Probe normalisiert. (A) Caspase-Aktivität unbehandelter Zellen der Panc1- und H6c7-kras-Klone, dargestellt als Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Nach 24-stündiger Behandlung mit dem endogenen Apoptosestimulus TRAIL oder den Zytostatika Gemcitabin (Gem), 5-Fluorouracil (5-FU) und Cisplatin (CP) wurde die Caspase-Aktivität der Panc1- und H6c7-kras-Klone bestimmt und als n-fache Veränderung zu entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Abgebildet sind Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet. Die Werte der unbehandelten Kontrollen (= 1,0) sind durch eine Linie gekennzeichnet.

Die basale Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 lag sowohl in den Panc1-Holoklonen als auch in den H6c7-kras-Meroklonen etwas niedriger als in den entsprechenden Paraklonen. Dabei wiesen die Panc1-Klone generell eine etwas höhere Caspase-Aktivität auf als die H6c7-kras-Klone (Abbildung 16 A).

Die Caspase-Aktivität der Panc1-Holoklone war nach Behandlung mit dem endogenen Stimulus TRAIL sowie mit den Zytostatika Gemcitabin, 5-Fluorouracil und Cisplatin im

Vergleich zum Paraklon verstärkt. Die Zellen reagierten dabei auf TRAIL (4,5- bzw. 6,7-fach) und Cisplatin (4,2- bzw. 6,5-fach) mit einer stärkeren Erhöhung der Caspase-Aktivität als auf die Stimulation durch Gemcitabin (1,2- bzw. 2,3-fach) oder 5-Fluorouracil (1,1- bzw. 1,3-fach), jeweils verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen. Dabei ließen sich bei den Panc1-Holoklonen im Vergleich zu den Paraklonen nach den Behandlungen leicht erhöhte Caspase-Aktivitäten erkennen.

Auch bei den H6c7-kras-Klonen konnte keine Änderung der Caspase-Aktivität nach 5-Fluorouracil-Stimulation detektiert werden. TRAIL (4,0- bzw. 2,8-fach), Gemcitabin (6,0- bzw. 2,4-fach) und vor allem Cisplatin (21,4- bzw. 21,0-fach) führten hingegen zu einer höheren Caspase-Aktivität in Bezug auf unbehandelte Kontrollzellen, die in den Meroklonen gegenüber den Paraklonen jeweils vermindert war.

Panc1-Holoklone wiesen also nach Behandlung mit Apoptosestimuli eine stärkere Apoptoseaktivität auf als die Paraklone und erwiesen sich somit als weniger resistent gegenüber unterschiedlichen Apoptosestimulantien. H6c7-Meroklone hingegen ließen im Vergleich zu Paraklonen eine verminderte Caspase-Aktivität und somit eine höhere Resistenz gegenüber den überprüften Reagenzien erkennen.

4.5.4 Gegenseitiger Einfluss einer indirekten Kokultur von PDEZ-Klonen unterschiedlicher Charakteristika

Entgegen der Erwartungen wiesen die Panc1-Holoklone keine stärkere Resistenz gegenüber verschiedenen Apoptosestimuli auf als die Paraklone (Abbildung 16 B). In einem Tumor liegen Holoklone allerdings nicht als isolierte Zellen oder Population wie in diesem *in vitro*-Versuch vor, sondern sind Teil eines Verbandes aus Zellen unterschiedlicher Herkunft und Eigenschaften. So konnte bereits gezeigt werden, dass CSC-Eigenschaften in Mammakarzinom- und auch PDAC-Zellen nicht stabil sind, sondern durch den Einfluss einer Mikroumgebung einer Plastizität unterliegen können (Chaffer et al., 2011; Dalla Pozza et al., 2015; Mani et al., 2008).

Es stellte sich daher die Frage, ob die aus Einzelzellen generierten Holoklone den Einfluss anderer Zellen benötigen, um in dieser Nische ihre Eigenschaften zu erhalten. Zur Überprüfung des gegenseitigen Einflusses von Klonen unterschiedlicher Formen, wurden indirekte Kokultur-Analysen durchgeführt und die Klone auf Entwicklung der Zellzahl, Koloniebildungsvermögen und CSC-Marker-Expression untersucht.

4.5.4.1 Zellzahl von PDEZ-Klonen nach indirekter Kokultur mit anderen Klonformen

Nach 6-tägiger Mono- bzw. indirekter Kokultur wurde zunächst der gegenseitige Einfluss von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen auf die Vital-Zellzahl betrachtet.

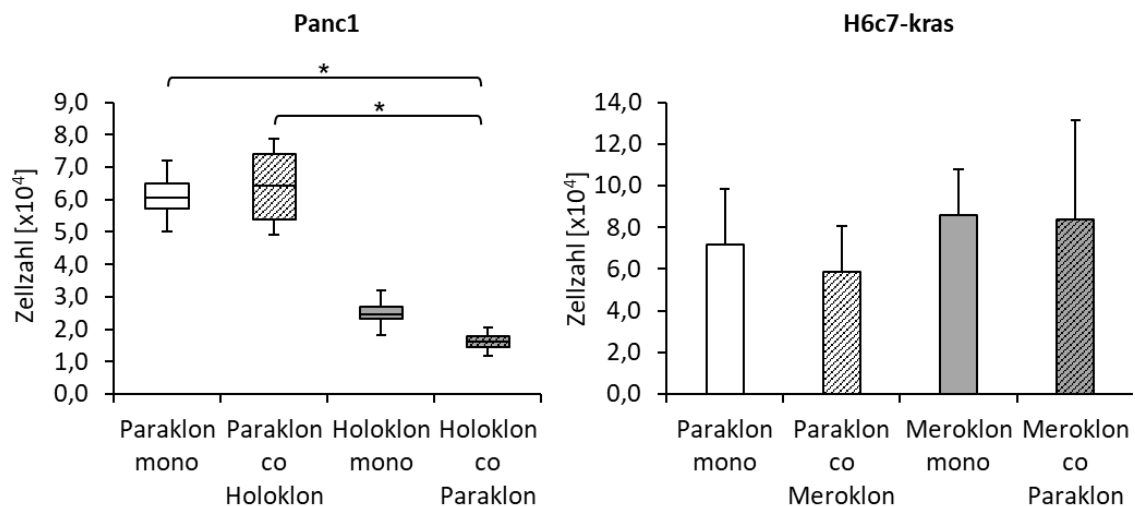


Abbildung 17: Unterschiedliche Klonformen haben keinen gegenseitigen Einfluss auf die Zellzahlen. Die Zellzahlen wurden nach 6-tägiger Monokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen sowie indirekter Kokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Gezeigt sind Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum für Panc1-Klone bzw. Mittelwerte mit SD für H6c7-kras-Klone aus je vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet.

Die Panc1-Paraklone waren nach 6-tägiger Mono- bzw. Kokultur durch eine höhere Zellzahl gekennzeichnet als die Holoklone, die durch die Kokultur mit den Paraklonen eine noch geringere Zellzahl aufwiesen. Bei den Klonen der Zelllinie H6c7-kras konnten kaum Unterschiede in der Zellzahl ausgemacht werden. So waren durch den gegenseitigen Einfluss der Kokultur sowohl Paraklone als auch Meroklone in ihrer Zahl leicht vermindert gegenüber der jeweiligen Monokultur (Abbildung 17).

Die gemeinsame Kultur von Paraklonen und Holo- bzw. Meroklonen hatte demnach zwar keinen signifikanten Einfluss, ließ die Zellzahl jedoch leicht sinken.

4.5.4.2 Koloniebildungsvermögen von PDEZ-Klonen nach indirekter Kokultur mit anderen Klonformen

Als nächstes wurde der gegenseitige Einfluss der Klone auf die Fähigkeit zur Koloniebildung betrachtet. Dazu wurden CFAs im Anschluss an die 6-tägige Mono- bzw. Kokultur angelegt und die Koloniebildung nach zehn bis zwölf Tagen analysiert (Abbildung 18).

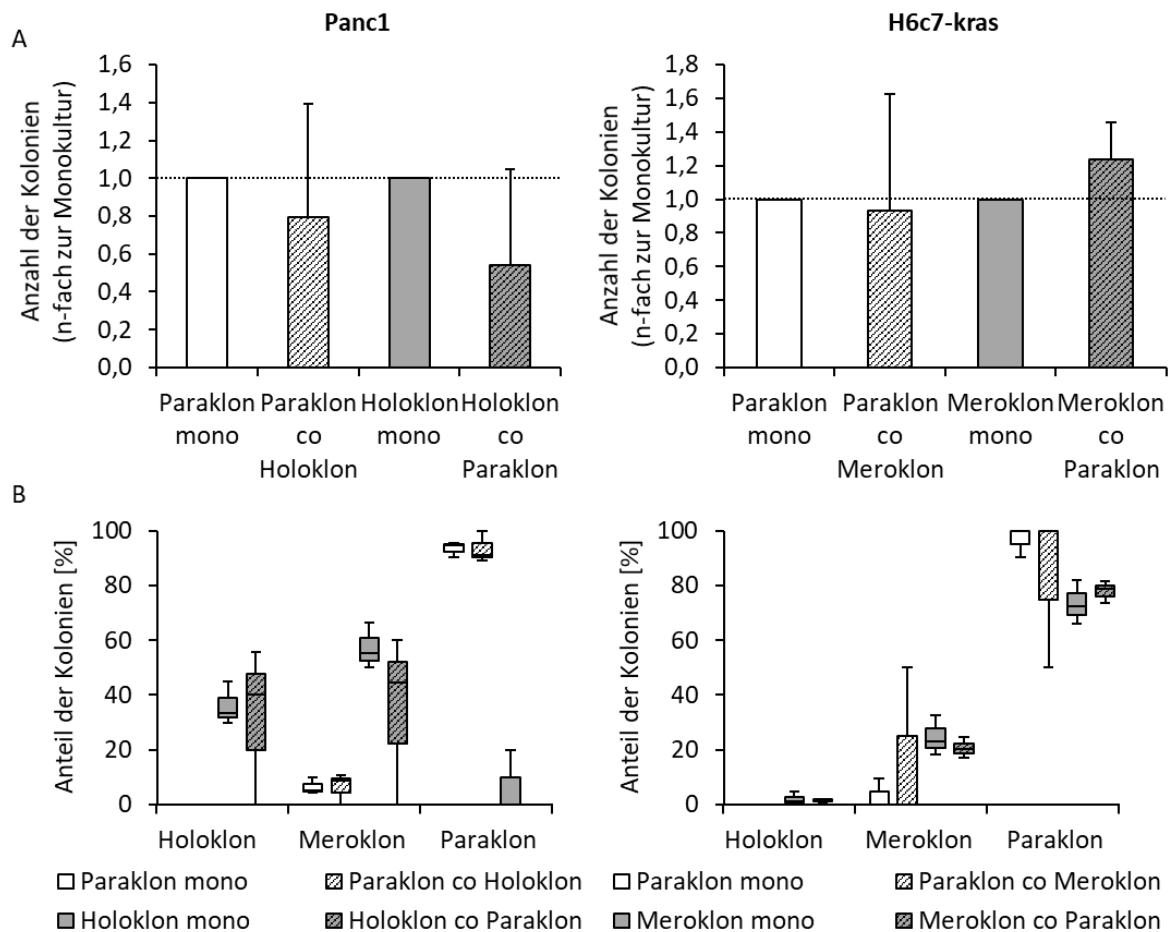


Abbildung 18: Unterschiedliche Klonformen haben geringen gegenseitigen Einfluss auf die Koloniebildung.

Nach 6-tägiger Monokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen sowie indirekter Kokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen wurden für zehn bis zwölf Tage CFAs angelegt. Kristallviolett-gefärbte Kolonien mit über 50 Zellen wurden (A) gezählt und die Anzahl der Kolonien als n-fache Veränderung nach Kokultur zur jeweiligen Monokultur abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Die Werte der Monokultur (= 1,0) sind durch eine Linie markiert. Darüber hinaus wurden (B) die Formen der Kolonien charakterisiert. Gezeigt sind Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus je drei unabhängigen Versuchen. Auf die Darstellung von Signifikanzen zwischen den Klontypen wurde aus Gründen der Übersicht verzichtet, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen mono- und kokultivierten Zellen der gleichen Klonform bestanden.

Durch gegenseitige Kokultur von Panc1-Klonen konnte jeweils eine leichte Verminderung der Kolonienzahl bezogen auf die der monokultivierten Zellen festgestellt werden, die sich mit einem leicht verminderten Anteil an Paraklonen erklären ließ. Kein Unterschied zur entsprechenden Monokultur wurde hingegen bei H6c7-kras-Klonen gesehen, weder bei der Anzahl der Kolonien noch bei ihrer Zusammensetzung (Abbildung 18).

Panc1-Holoklone bzw. H6c7-kras-Meroklone und korrespondierende Paraklone beeinflussen sich somit gegenseitig nur wenig in Bezug auf ihr Koloniebildungsvermögen.

4.5.4.3 Expression der CSC-Marker in PDEZ-Klonen nach indirekter Kokultur mit anderen Klonformen

Neben dem gegenseitigen Einfluss von Paraklonen und Holo- bzw. Meroklonen auf das Koloniebildungsvermögen wurde untersucht, inwieweit eine gegenseitige Kokultur die Expression von CSC-Markern verändert.

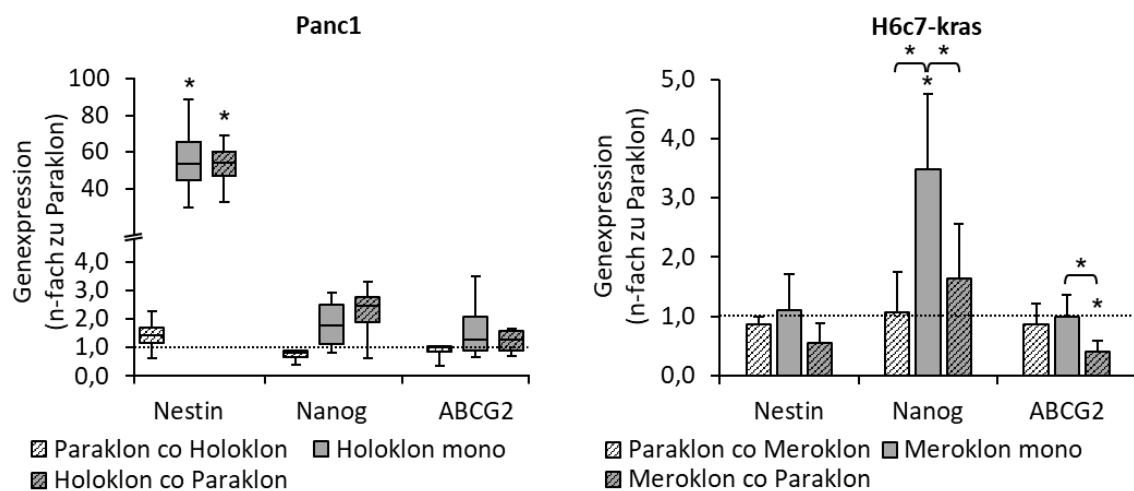


Abbildung 19: Unterschiedliche Klonformen haben keinen gegenseitigen Einfluss auf die Genexpression von CSC-Markern in Panc1-Klonen. Die CSC-Marker-Expression in H6c7-kras-Meroklonen ist in Gegenwart von Paraklonen verringert. Nach 6-tägiger Monokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen sowie indirekter Kokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen wurde die RNA isoliert. Mittels reverser Transkription und qPCR-Analyse wurde die Expression von Nestin, Nanog und ABCG2 ermittelt, auf GAPDH normalisiert und als n-fache Veränderung bezogen auf die Paraklon-Monokultur dargestellt. Gezeigt sind Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum (Panc1) bzw. Mittelwerte mit SD (H6c7-kras) aus je vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet, wobei einzelne * eine Signifikanz zur Paraklon-Monokultur anzeigen. Die Werte der Paraklon-Monokultur (= 1,0) sind durch eine Linie markiert.

Bei den Panc1-Klonen ließ sich kein Einfluss der Kokultur auf die Expression von Nestin, Nanog oder ABCG2 erkennen. Hingegen konnte bei H6c7-kras-Meroklonen nach Kokultur mit den Paraklonen eine Abnahme der Genexpression von Nestin und im Besonderen von Nanog und ABCG2 detektiert werden (Abbildung 19). Dieser Einfluss beruhte nicht auf Gegenseitigkeit, die Genexpression der Paraklone unterlag durch die Kokultur mit Meroklonen keiner Veränderung.

Neben der Genexpression wurde auch die Detektion der Proteinlevel anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen von Nestin und Nanog (Panc1) bzw. Nanog allein (H6c7-kras) in den Klonen nach Mono- und Kokultur verglichen.

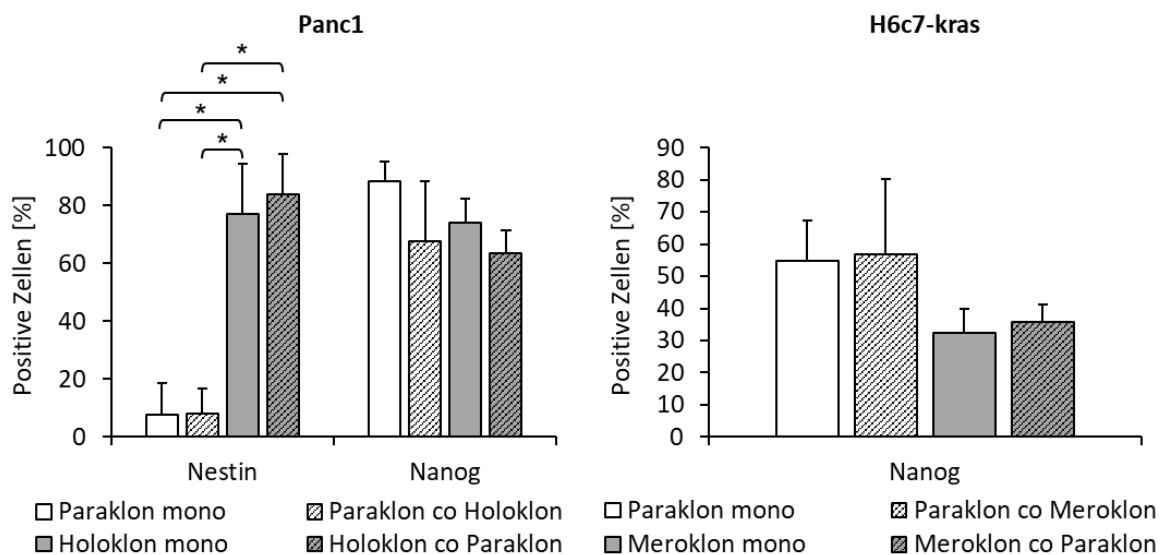


Abbildung 20: Unterschiedliche Klonformen haben kaum gegenseitigen Einfluss auf die CSC-Marker-Expression. Nach 6-tägiger Monokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen sowie indirekter Kokultur von Panc1-Para- und Holoklonen bzw. H6c7-kras-Para- und Meroklonen auf Deckgläschen wurden Immunfluoreszenz-Färbungen für Nestin und Nanog (Panc1-Klone) oder Nanog (H6c7-kras-Klone) durchgeführt. Für die jeweilige Färbung positive und negative Zellen wurden in fünf Sichtfeldern bestimmt, wobei alle Zellen berücksichtigt wurden, die eine horizontale Linie durch das Sichtfeld berührten. Abgebildet sind Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet.

Wie auch die Genexpression war der Anteil Nestin-positiver Zellen in der Immunfluoreszenz-Färbung in Panc1-Holoklonen höher als in den Paraklonen, während sich der Anteil Nanog-positiver Zellen insgesamt kaum unterschied. Immunfluoreszenz-Färbungen von Nanog in

H6c7-kras-Klonen ergaben eine größere Anzahl Nanog-positiver Paraklon-Zellen als Meroklon-Zellen unabhängig der Kulturbedingungen (Abbildung 20).

Insgesamt ließen sich, wie schon zuvor beschrieben, zwar Unterschiede zwischen den Klonformen erkennen, der Einfluss der gegenseitigen Kokultur war jedoch gering.

4.6 Tumorigenität von Panc1-Holo- und Paraklonen *in vivo*

Um zu untersuchen, ob das erhöhte Koloniebildungsvermögen von Panc1-Holoklonen, die aus einer mit HSC-angereicherten Hepatozyten-Kokultur hervorgegangen sind (Abbildung 10), mit einer erhöhten Tumorigenität in der Leber *in vivo* einhergeht, wurden 10^4 Zellen des Panc1-Holoklons und des Panc1-Paraklons in SCID-beige Mäuse intrasplenal inokuliert. Aufgrund des höheren Koloniebildungsvermögens von Panc1-Klonen im Vergleich zu H6c7-kras-Klonen *in vitro* wurde der Versuch mit diesen malignen Zellen durchgeführt.

4.6.1 Tumorwachstum von Panc1-Holo- und Paraklonen *in vivo*

Das Wohlergehen der Tiere und das Tumorwachstum wurde regelmäßig nicht nur durch Palpation überprüft, sondern auch mittels Ultraschall untersucht (Abbildung 21 A).

Die sonographische Untersuchung der Tiere konnte bis 145 Tage nach Inokulation der Zellen bei sieben von zehn Tieren, denen 10^4 Holoklon-Zellen appliziert wurden, Tumore im Bereich des Pankreas und bei drei dieser Tiere auch Leberläsionen nachweisen. In Tieren, denen Paraklon-Zellen inokuliert wurden, konnte bis zu diesem Zeitpunkt lediglich bei einer Maus eine Pankreasläsion sowie bei einem zweiten Tier ein Lungentumor detektiert werden (Abbildung 21 B).

Nach Entnahme der Gewebe wurden diese fixiert, in Paraffin eingebettet und als serielle Schnitte aufbereitet. Zur Detektion von Läsionen, die nur aus wenigen Zellen bestanden, wurde in einzelnen Gewebeschnitte humanes Pan-Cytokeratin angefärbt, das humane Epithelzellen und somit die inokulierten Panc1-Zellen markierte. Diese Färbung brachte die Detektion zusätzlicher Läsionen sowohl in Geweben von Tieren nach Inokulation mit Holoklon- als auch mit Paraklon-Zellen hervor (Abbildung 21 C).

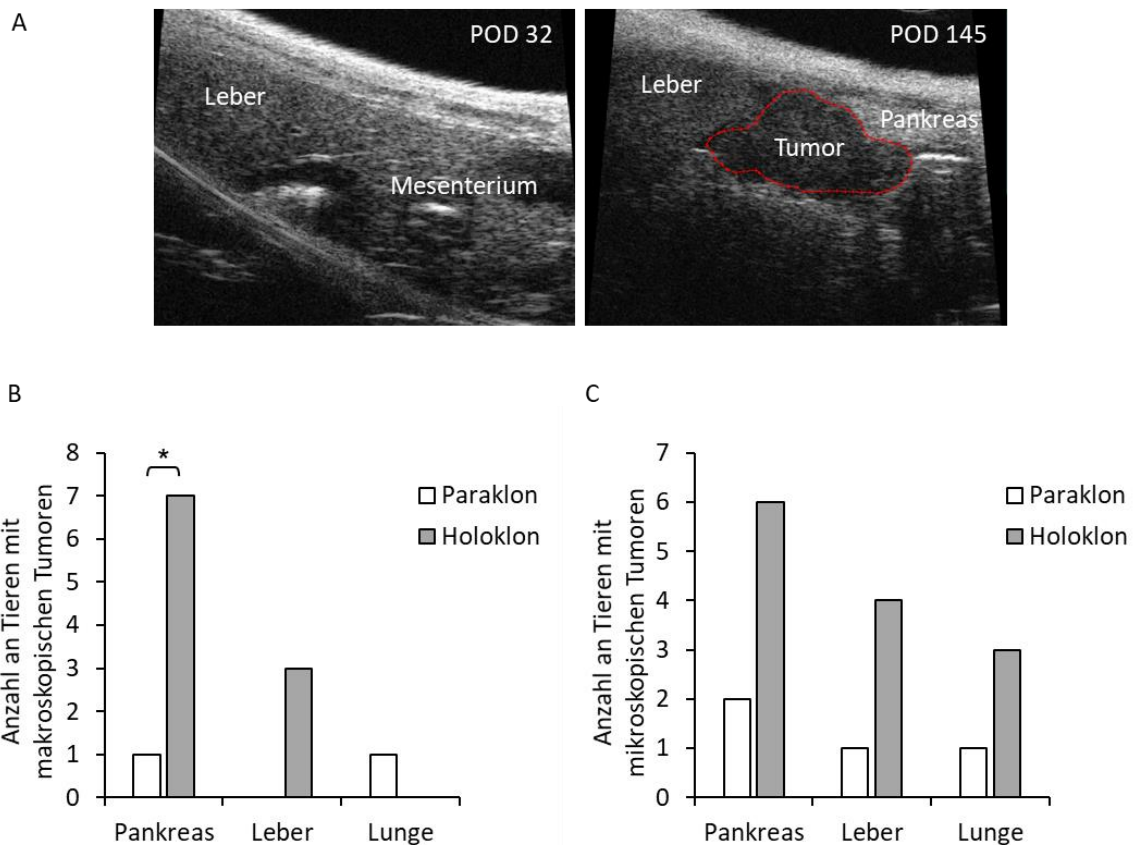


Abbildung 21: Panc1-Holoklone zeigen vermehrtes Tumorstwachstum *in vivo* verglichen mit Panc1-Paraklonen. Nach intrasplenaler Inokulation von 10^4 Panc1-Holoklon- bzw. Paraklon-Zellen in je zehn weibliche SCID-beige Mäuse wurden das Wohlergehen der Tiere sowie das Tumorstwachstum regelmäßig kontrolliert. (A) Abgebildet sind beispielhaft abdominale Ultraschall-Aufnahmen des gleichen Tieres an Tag 32 und Tag 145 (POD 32 und POD 145) nach Holoklon-Inokulation. Der Bereich des Tumors ist durch eine rote Linie abgegrenzt. (B) Die Anzahl der Mäuse mit makroskopischen Tumoren wurde per Ultraschall bestimmt. Signifikante Unterschiede sind durch * gekennzeichnet. (C) Die Anzahl der Tiere mit mikroskopisch sichtbaren Tumoren wurde mittels Färbung von humanem Pan-Cytokeratin in Paraffin-Gewebeschnitten von 2 bis 3 μm Dicke festgestellt.

Insgesamt ging von den Panc1-Holoklon-Zellen eine höhere Tumorigenität als von den Panc1-Paraklon-Zellen aus, was sich an der höheren Anzahl und Größe sowohl von makroskopischen als auch von mikroskopischen Tumorstläsionen in Pankreas und Leber sowie zusätzlich von mikroskopischen Läsionen im Lungengewebe ermessen ließ.

4.6.2 Nestin-Expression in Panc1-Holoklon- und Paraklon-Tumoren *in vivo*

Im nächsten Schritt sollten die Tumore aus Pankreas und Leber auf ihre Nestin-Expression untersucht werden. Dafür wurde die Struktur der Gewebe zunächst anhand einer HE-Färbung

beurteilt (Daten nicht gezeigt). Um auch Panc1-Zellen ohne Nestin-Signal detektieren zu können, wurde die Immunfluoreszenz-Färbung als Kofärbung mit einer Färbung von humanem Pan-Cytokeratin durchgeführt (Abbildung 22).

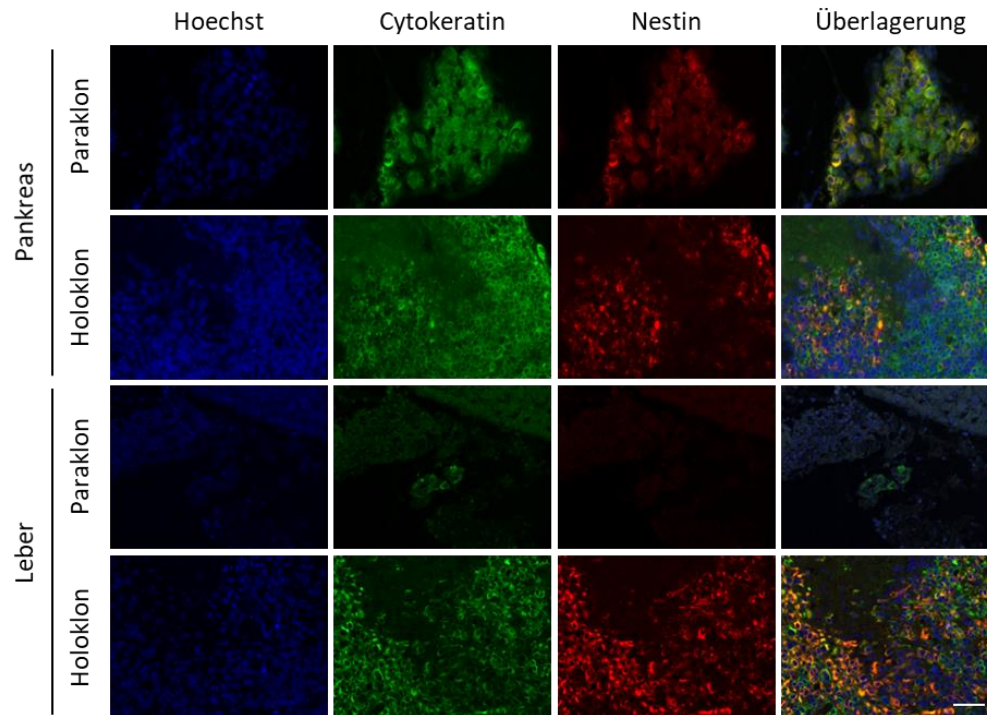


Abbildung 22: Tumore in Pankreas und Leber, die durch Panc1-Holoklon- und Paraklon-Zellen ausgelöst wurden, weisen Nestin-Expression auf. Serielle Schnitte von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Pankreata und Lebern wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbung parallel auf humanes Pan-Cytokeratin (grün) zur Detektion der humanen Tumorzellen im murinen Gewebe und Nestin (rot) gefärbt. Die Färbung mit Hoechst 33258 markiert die Zellkerne (blau). Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen der Tumorareale. Der Maßstab entspricht 50 μm .

Wie auch *in vitro* beobachtet, konnte in Tumoren, die durch Panc1-Holoklon-Zellen gebildet wurden, eine starke Nestin-Expression festgestellt werden, die in der Leber eine leicht verstärkte Intensität im Vergleich zum Paraklon-Tumor aufwies. Auch bei einem Paraklon-Tumor im Pankreas wurde ein Nestin-Signal detektiert, welches jedoch in der kleinen Leberläsion nicht auszumachen war.

4.6.3 EMT-Marker-Expression in Panc1-Holoklon- und Paraklon-Tumoren *in vivo*

Im weiteren Verlauf wurden die detektierten Tumorerläsionen mittels immunhistochemischer Färbungen auch auf ihre EMT-Charakteristika untersucht.

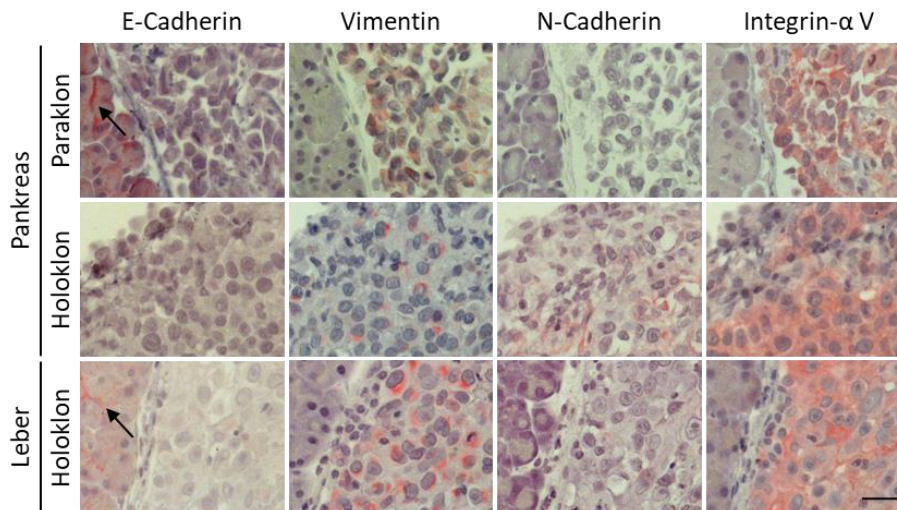


Abbildung 23: Tumore in Pankreas und Leber, die durch Panc1-Holoklon- oder Paraklon-Zellen gebildet wurden, weisen auf EMT hin. Serielle Schnitte von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Pankreata und Lebern wurden immunhistochemisch auf den epithelialen Marker E-Cadherin sowie die mesenchymalen Marker Vimentin, N-Cadherin und Integrin- α V gefärbt. Die Pfeile markieren E-Cadherin-exprimierende nicht-neoplastische Gewebezellen. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen. Der Maßstab entspricht 25 μ m.

Sowohl die Abwesenheit des E-Cadherin-Signals in den Tumorarealen als auch die Expression von Vimentin, N-Cadherin und Integrin- α V wiesen auf einen mesenchymalen Charakter der untersuchten Tumorerläsionen hin (Abbildung 23). Unterschiede zwischen der Läsion, die durch Paraklon-Zellen ausgelöst wurde, und Tumoren, die durch Holoklon-Zellen verursacht wurden, konnten dabei nicht beobachtet werden.

Die Tumore von Panc1-Holoklonen und auch der einzelnen Panc1-Paraklon-Läsion wiesen demzufolge nicht nur eine erhöhte Expression des CSC-Markers Nestin auf, sondern auch einen mesenchymalen Phänotyp mit Abwesenheit der Expression des Epithelmarkers E-Cadherin.

4.7 Charakterisierung der EMT-Eigenschaften von Panc1- und H6c7-kras-Klonen *in vitro*

Nachdem Nestin-positive Holoklon-Tumore *in vivo* einen mesenchymalen Charakter aufwiesen, wurden die EMT-Eigenschaften der unterschiedlichen Panc1- und H6c7-kras-Klone, die aus Einzelzellen generiert wurden (Abbildung 12), untersucht.

4.7.1 Expression von EMT-Markern in Panc1- und H6c7-kras-Klonen

Neben dem epithelialen Marker E-Cadherin wurden auch die mesenchymalen Marker L1CAM, Vimentin und Zeb1 sowie das EMT-induzierende Zytokin TNF- α auf ihre differentielle Genexpression in Paraklonen und Mero- bzw. Holoklonen in H6c7-kras- und Panc1-Zellen mittels qPCR untersucht.

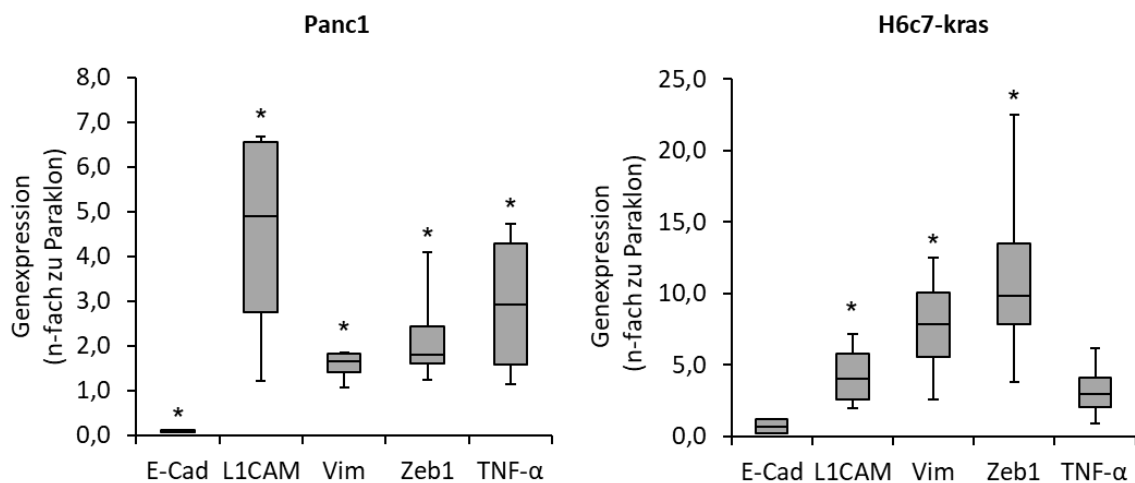


Abbildung 24: Holoklone von Panc1-Zellen und Meroklone von H6c7-kras-Zellen weisen eine vermehrt mesenchymale Genexpression auf. Die Genexpression der EMT-Marker E-Cadherin (E-Cad), L1CAM, Vimentin (Vim) und Zeb1 sowie des EMT-induzierenden Zytokins TNF- α wurde mittels reverser Transkription und qPCR untersucht. Die Ergebnisse wurden dabei auf GAPDH normalisiert und sind als n-fache Veränderung zum entsprechenden Paraklon gezeigt. Sie stellen die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus vier unabhängigen Versuchen dar. Signifikante Unterschiede zur Genexpression des entsprechenden Paraklons sind durch * gekennzeichnet.

Die Expression von E-Cadherin war sowohl in Panc1-Holoklonen als auch in H6c7-kras-Meroklonen im Vergleich zu den entsprechenden Paraklonen vermindert. Gleichzeitig konnten

jeweils signifikant erhöhte Expressionslevel von L1CAM, Vimentin und Zeb1 detektiert werden. Auch TNF- α war durch eine gesteigerte Expression in Holo- bzw. Meroklonen gekennzeichnet (Abbildung 24).

Die Genexpression deutet in Panc1-Holoklonen und H6c7-kras-Meroklonen demnach auf einen verstärkt mesenchymalen Phänotyp hin verglichen mit den entsprechenden Paraklonen.

In den generierten Panc1-Klonen wurde dieser Befund zusätzlich auf Ebene der Proteinexpression überprüft (Abbildung 25).

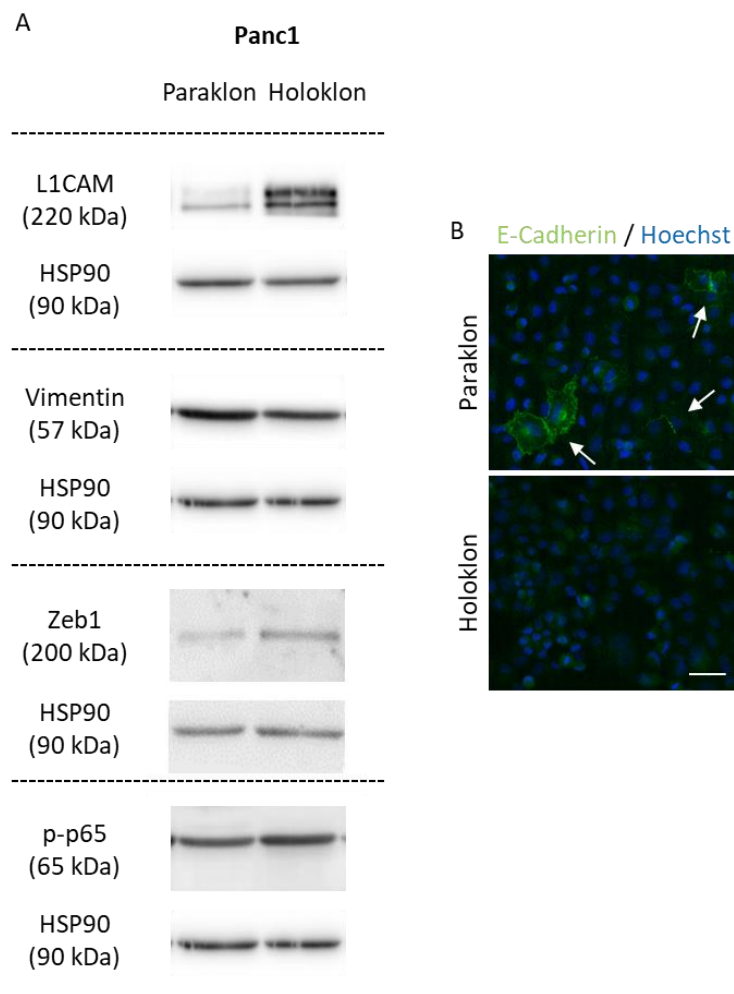


Abbildung 25: Holoklone von Panc1-Zellen weisen eine erhöhte Expression von mesenchymalen Proteinen auf. (A) Für die Western Blot-Untersuchung wurden 10 μ g eines Gesamtzelllysates der Panc1-Para- bzw. Holoklone verwendet und die mesenchymalen Markerproteine L1CAM, Vimentin und Zeb1 sowie phosphoryliertes p65 (p-p65) detektiert. Als Housekeeper diente HSP90. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot aus vier unabhängigen Versuchen. (B) Repräsentative Aufnahme einer Immunfluoreszenz-Färbung von E-Cadherin (grün) in Panc1-Para- und Holoklonen, die auf Deckgläschen kultiviert wurden. Die Pfeile zeigen E-Cadherin-positive Zellen an. Zellkerne sind durch Hoechst 33528 angefärbt (blau). Der Maßstab entspricht 50 μ m.

Wie auf Ebene der Genexpression deutete auch die Western Blot-Untersuchung mit erhöhten Proteinleveln von L1CAM sowie Zeb1 auf verstärkt mesenchymale Eigenschaften des Holoklons im Vergleich zum Paraklon hin. Die Vimentin-Expression war in beiden Klonen als vergleichbar anzusehen. Da Panc1-Zellen an sich schon einen mesenchymalen Phänotyp einhergehend mit einer schwachen E-Cadherin-Expression aufwiesen, wurde für die Analyse dieses Proteins eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt (Abbildung 25 B). Während einzelne Zellen des Paraklons E-Cadherin exprimierten, waren in der Holoklon-Zellpopulation keine gefärbten Zellen zu detektieren.

Über die EMT-Marker hinaus wurde eine verstärkte Expression von phosphoryliertem p65, der aktivierten Untereinheit von NF- κ B, im Gesamtzelllysate des Holoklons detektiert, was als Indiz dafür gesehen werden kann, dass die in der qPCR detektierte erhöhte Genexpression von TNF- α autokrin zur Aktivierung von NF- κ B führt.

Insgesamt konnten die *in vivo*-Befunde der mesenchymalen Eigenschaften von Tumoren in Pankreas und Leber *in vitro* untermauert werden. Im Vergleich zu Paraklonen zeigten sowohl Panc1-Holoklone als auch H6c7-kras-Meroklone einen verstärkt mesenchymalen Phänotyp.

4.7.2 Invasionsvermögen von Panc1-Para- und Holoklonen

Um zu überprüfen, inwiefern die Fähigkeit zur Invasion durch eine Kollagenschicht mit dem Erwerb mesenchymaler Eigenschaften in Panc1-Holoklonen einhergeht, wurde das Invasionsverhalten von Panc1-Holoklon- und Paraklon-Zellen mit Hilfe des xCELLigence-Systems getestet (Abbildung 26).

Die Invasionsrate durch eine Kollagenschicht war von Zellen der Panc1-Holoklone im xCELLigence-Assay um 53,2 % niedriger als die der Paraklone.

Somit geht der verstärkt mesenchymale Phänotyp der Panc1-Holoklone nicht mit einer erhöhten Invasionsfähigkeit einher.

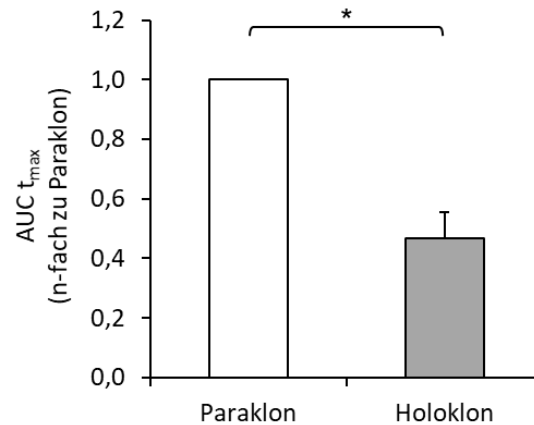


Abbildung 26: Panc1-Paraklone sind durch eine höhere Invasionsrate gekennzeichnet als Holoklone. Die Invasionsrate von Panc1-Para- und Holoklon-Zellen durch eine Kollagenschicht wurde für 24 h mit Hilfe des xCELLigence RTCA-Systems untersucht. Zur Quantifizierung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) bis zum Zeitpunkt der höchsten Holoklon-Invasionsrate (t_{max} entspricht 6 h) bestimmt und als n-fache Veränderung zum Paraklon abgebildet. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede durch * gekennzeichnet.

4.8 Blockade von TNF- α mittels Etanercept

Neben der verstärkten Expression von Markern, die mit einem mesenchymalen Phänotyp von PDEZ in Verbindung gebracht werden, konnte auch eine erhöhte Expression von TNF- α sowie eine damit im Einklang stehende höhere Expression von aktiviertem p65 in Panc1-Holoklonen nachgewiesen werden (Abbildung 24 und Abbildung 25). Um zu überprüfen, ob TNF- α kausal für den mesenchymalen Phänotyp sowie die ausgeprägten CSC-Eigenschaften der Panc1-Holoklone verantwortlich ist, wurde die TNF- α -Aktivität durch eine 72-stündige Behandlung mit Etanercept blockiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, parallel kultivierte Panc1-Holoklon-Zellen.

4.8.1 Einfluss der Blockade von TNF- α auf die Zellzahl von Panc1-Holoklonen

Zunächst wurde der Einfluss der TNF- α -Blockade auf die Zellzahl der Panc1-Holoklone untersucht. Dazu wurde die Vital-Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer nach 72-stündiger Inkubation von Etanercept bestimmt (Abbildung 27).

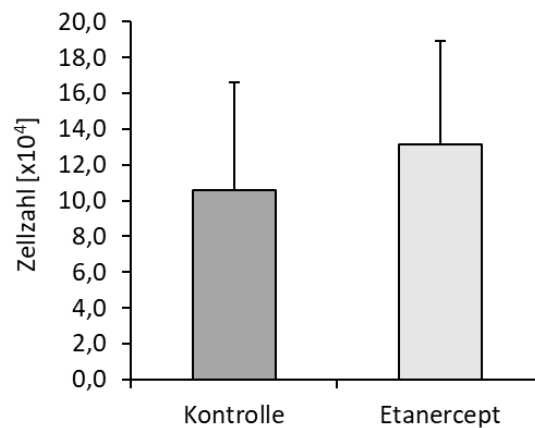


Abbildung 27: Blockade von TNF- α bewirkt keine Veränderung der Zellzahl von Panc1-Holoklonen. Die Zellzahl der Panc1-Holoklone wurde nach 72-stündiger Blockade von TNF- α durch 10 μ g/ml Etanercept mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Als Kontrolle dienten parallel kultivierte, unbehandelte Panc1-Holoklon-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung von Panc1-Holoklon-Zellen mit Etanercept für 72 h hatte keinen Einfluss auf ihre Zellzahl.

4.8.2 Einfluss der Blockade von TNF- α auf EMT- und Invasionseigenschaften von Panc1-Holoklonen

Nachdem keine Beeinflussung der Zellzahl durch die Blockade von TNF- α beobachtet werden konnte und somit von einer vergleichbaren Zelldichte unter den unterschiedlichen Versuchsbedingungen ausgegangen werden konnte, wurde die Expression von EMT-Markern auf Genexpressionsebene überprüft (Abbildung 28).

Nach der Behandlung mit Etanercept konnte kein Einfluss auf die Expression von E-Cadherin nachgewiesen werden, die Genexpression der mesenchymalen Marker L1CAM, Vimentin und Zeb1 war jedoch zwischen 11,3 und 17,1 % reduziert.

Somit wurde der mesenchymale Phänotyp von Panc1-Holoklonen durch die Blockierung der TNF- α -Aktivität teilweise aufgehoben.

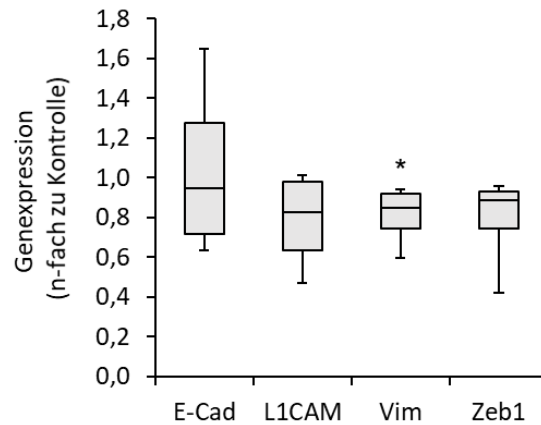


Abbildung 28: Blockade von TNF- α bewirkt eine verringerte Expression mesenchymaler Marker in Panc1-Holoklonen. Die Blockade von TNF- α in Panc1-Holoklonen erfolgte für 72 h unter Zugabe von 10 μ g/ml Etanercept. Als Kontrolle dienten parallel kultivierte, unbehandelte Panc1-Holoklon-Zellen. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die Genexpression mittels qPCR bestimmt, auf den Housekeeper GAPDH normalisiert und als n-fache Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle präsentiert. Dabei diente E-Cadherin (E-Cad) als Epithelmarker, während L1CAM, Vimentin (Vim) und Zeb1 mesenchymale Marker darstellten. Gezeigt sind die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zum unbehandelten Holoklon sind durch * gekennzeichnet.

Im Zusammenhang mit den veränderten EMT-Eigenschaften wurde zusätzlich das Invasionsvermögen durch eine Kollagenschicht im xCELLigence-System bestimmt.

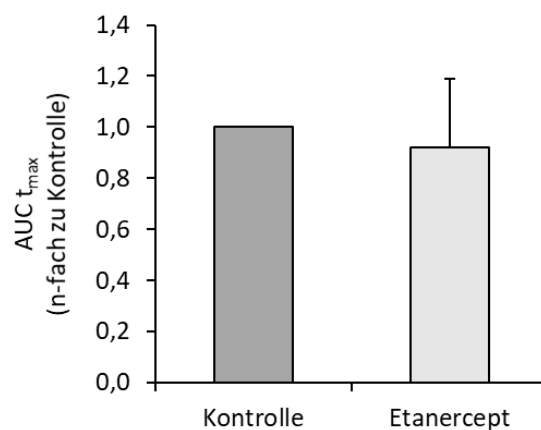


Abbildung 29: Blockade von TNF- α bewirkt eine leichte Verringerung der Invasionsrate von Panc1-Holoklonen. Die Blockade von TNF- α in Panc1-Holoklonen erfolgte für 72 h unter Zugabe von 10 μ g/ml Etanercept. Als Kontrolle dienten parallel kultivierte, unbehandelte Panc1-Holoklon-Zellen. Die Invasionsrate durch eine Kollagenschicht wurde anschließend für 24 h mit Hilfe des xCELLigence RTCA-Systems untersucht. Zur Quantifizierung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) bis zum Zeitpunkt der höchsten Holoklon-Invasionsrate (t_{max} entspricht 6 h) bestimmt und als n-fache Veränderung zum unbehandelten Holoklon abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Blockade der TNF- α -Aktivität bewirkte eine leichte Verminderung des Invasionsvermögens der Panc1-Holoklone im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um etwa 8 %, die jedoch nicht signifikant war (Abbildung 29).

Somit scheint TNF- α einen Faktor darzustellen, der teilweise für den mesenchymalen Charakter der Panc1-Holoklone verantwortlich ist, da die Blockade von TNF- α keinen vollständigen Rückgang dieses Phänotyps bewirkte.

4.8.3 Einfluss der Blockade von TNF- α auf CSC-Eigenschaften von Panc1-Holoklonen

Um einen Zusammenhang zwischen EMT-Eigenschaften und CSC-Charakteristika, vermittelt durch TNF- α , von Holoklonen der Panc1-Zellen herzustellen, wurde die Genexpression von Nestin und Nanog sowie das Koloniebildungsvermögen von Holoklonen nach Etanercept-Behandlung untersucht (Abbildung 30).

Es konnte sowohl eine Reduktion der Genexpression von Nestin als auch von Nanog nach TNF- α -Blockade gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 30 A). Zwar ging die verminderte CSC-Marker-Expression nicht mit einer Veränderung der Gesamtzahl der Kolonien in einem CFA einher, jedoch war der Anteil an Holoklonen zugunsten von Paraklonen, das heißt Zellen mit einem differenzierten/epithelialen Phänotyp, vermindert (Abbildung 30 B+C).

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass durch TNF- α in Panc1-Holoklon-Zellen CSC-Eigenschaften aufrechterhalten werden.

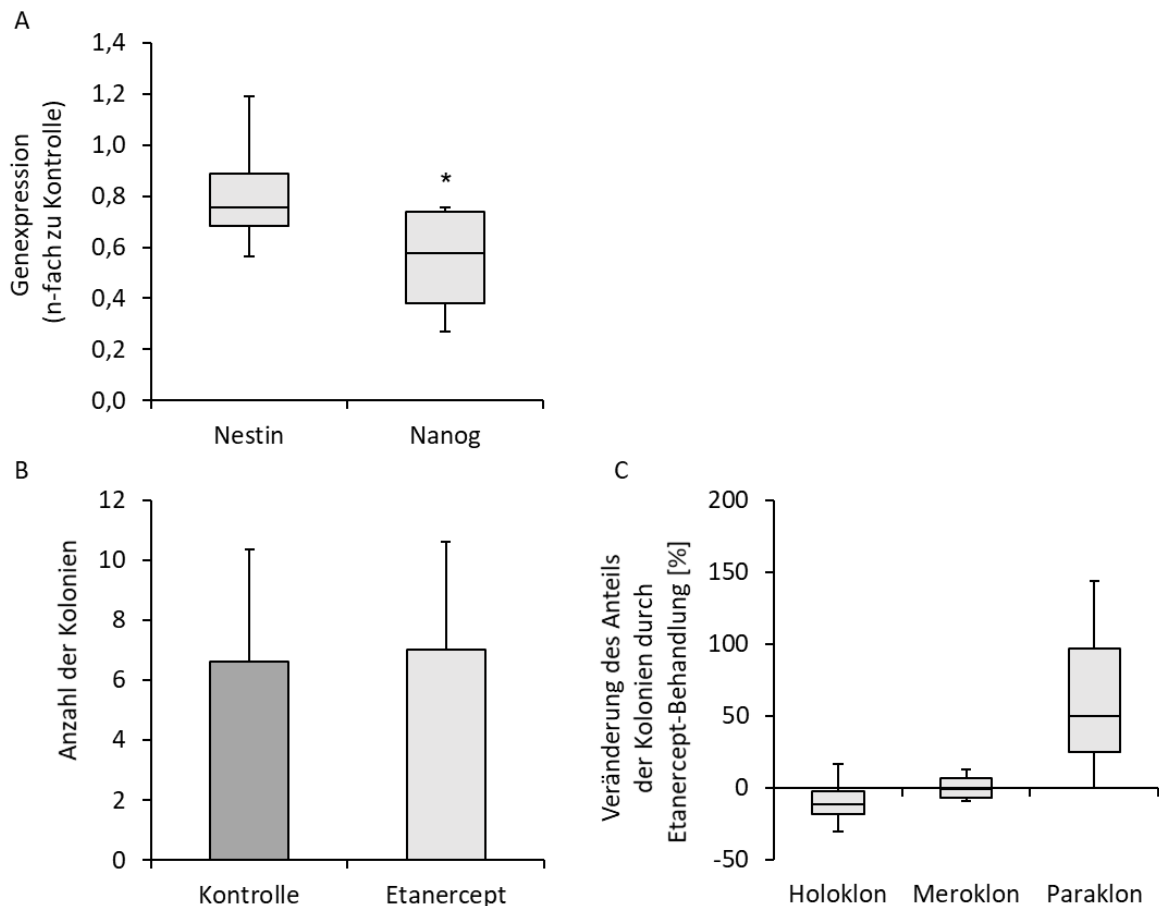


Abbildung 30: Blockade von TNF- α bewirkt eine verminderte Expression von Nestin und Nanog, vermindert jedoch nicht die Gesamtanzahl der gebildeten Kolonien, erhöht aber die Anzahl der Kolonien mit differenzierten Zellen. (A) Die Blockade von TNF- α in Panc1-Holoklonen erfolgte für 72 h unter Zugabe von 10 μ g/ml Etanercept. Als Kontrolle dienten parallel kultivierte, unbehandelte Panc1-Holoklon-Zellen. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die Genexpression von Nestin und Nanog mittels qPCR bestimmt, auf den Housekeeper GAPDH normalisiert und als n-fache Veränderung gegenüber der unbehandelten Kontrolle präsentiert. Gezeigt sind die Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum aus vier unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zum unbehandelten Holoklon sind durch * gekennzeichnet. (B, C) Zur Bestimmung des Koloniebildungsvermögens wurden Panc1-Holoklon-Zellen als CFA ausgesät. Die TNF- α -Blockade durch 10 μ g/ml Etanercept erfolgte an Tag 2 und 7 nach Aussaat. An Tag 10 bis 12 wurden die Zellen Kristallviolett-gefärbt und auf (B) Anzahl an Kolonien mit mehr als 50 Zellen und (C) ihre Kolonieform untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD der Kolonienzahl aus vier unabhängigen Experimenten sowie die prozentuale Veränderung des Anteils der jeweiligen Kolonieform nach TNF- α -Blockade verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen als Mediane mit 25 %- und 75 %-Quartilen sowie Minimum und Maximum.

4.9 Bedeutung von Nestin für die Aufrechterhaltung von Panc1-Holoklon-Eigenschaften

Nicht nur *in vitro* schien Nestin eine Bedeutung für das Koloniebildungsvermögen und somit die CSC-Eigenschaften von Panc1-Zellen zu besitzen, auch *in vivo* zeigten die durch Holoklon-Zellen gebildeten Tumore und sogar ein Pankreastumor, der von Panc1-Paraklon-Zellen ausging, eine deutliche Expression von Nestin (Abbildung 22).

Um die Funktion von Nestin näher zu betrachten, wurde dessen Expression in Panc1-Holoklonen, in denen zuvor die höchsten Nestin-Level nachgewiesen werden konnten (Abbildung 14 und Abbildung 15), durch siRNA transient herunterreguliert und anschließend Zellzahl, Koloniebildungsvermögen und Invasionsfähigkeit untersucht und mit kontroll-transfizierten Zellen verglichen.

4.9.1 Validierung des Nestin-Knockdowns in Panc1-Holoklon-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Nestin-siRNA-Behandlung in Panc1-Holoklonen eine verminderte Nestin-Expression nach sich zog, wurde zunächst die Genexpression überprüft und mit der von Kontroll-siRNA-behandelten Panc1-Holoklonen verglichen (Abbildung 31).

Diese Analyse der Genexpression konnte die Herunterregulierung von Nestin nach 72-stündiger Behandlung durch spezifische siRNA validieren. Die Verminderung der Expression lag bei 82,2 % verglichen mit Kontroll-siRNA-behandelten Holoklon-Zellen. Darüber hinaus ergab sich eine leichte Steigerung (1,2-fach) der Nanog-Expression durch den Nestin-Knockdown (Abbildung 31).

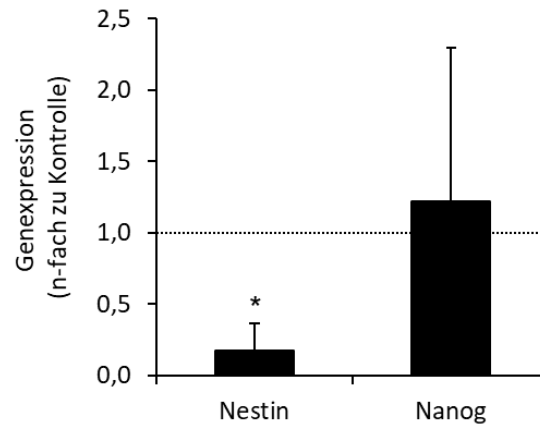


Abbildung 31: siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin bewirkt Anstieg der Nanog-Genexpression. Die Nestin- und Nanog-Genexpression der Panc1-Holoklone wurde nach 72-stündiger Inkubation mit Nestin- bzw. Kontroll-siRNA mit Hilfe einer qPCR bestimmt. Als Kontrolle dienten parallel kultivierte, Kontroll-siRNA-behandelte Panc1-Holoklon-Zellen. Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die Genexpression mittels qPCR bestimmt, auf den Housekeeper GAPDH normalisiert und als n-fache Veränderung zu den kontrolltransfizierten Zellen dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede zu kontrollbehandelten Zellen sind durch * gekennzeichnet. Die Werte der kontrollbehandelten Panc1-Holoklone (= 1,0) sind durch eine Linie markiert.

4.9.2 Einfluss von Nestin auf das Koloniebildungsvermögen von Panc1-Holoklonen

Da in Panc1-Holoklonen ein höheres Nestin-Level als in den Paraklonen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 14 und Abbildung 15), wurde der Einfluss der Herunterregulierung von Nestin auf die Fähigkeit zur Koloniebildung untersucht. Nach der 72-stündigen siRNA-Behandlung wurden deshalb CFAs angelegt und die Kolonien nach weiteren zwölf bis 14 Tagen betrachtet.

Eine verminderte Nestin-Expression ging mit einem verminderten Koloniebildungsvermögen einher (Abbildung 32 A). Zusätzlich zu der verringerten Anzahl an Kolonien konnte ein um 31,9 % geringerer Anteil an Holoklonen festgestellt werden, der mit einem erhöhten Anteil von sowohl Mero- (27,9 %) als auch Paraklonen (220,6 %) einherging (Abbildung 32 B).

Eine Verminderung der Nestin-Expression führte demnach zu der Ausbildung einer geringeren Anzahl von Kolonien, die vornehmlich durch einen differenzierten Phänotyp (Paraklon) charakterisiert waren.

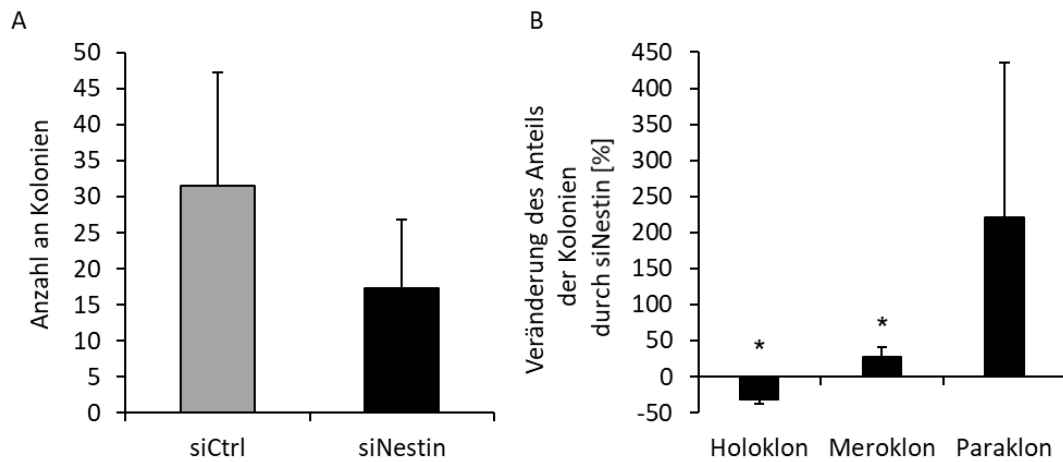


Abbildung 32: siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin vermindert das Koloniebildungsvermögen von Panc1-Holoklonen bezüglich Gesamtanzahl und Anzahl der Holoklone. Nach 72-stündiger Inkubation mit Nestin-siRNA (siNestin) bzw. Kontroll-siRNA (siCtrl) wurden Panc1-Holoklon-Zellen als CFA für zwölf bis 14 Tage kultiviert. Die Zellen wurden anschließend Kristallviolett-gefärbt und auf (A) Anzahl an Kolonien mit mehr als 50 Zellen und (B) ihre Kolonieform untersucht. Dabei ist die prozentuale Veränderung der Anteile der jeweiligen Kolonieform verglichen mit kontrolltransfizierten Zellen abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede zu kontrolltransfizierten Holoklon-Zellen sind durch * gekennzeichnet.

4.9.3 Einfluss von Nestin auf die Zellzahl von Panc1-Holoklonen

Ob die geringere Anzahl an Kolonien mit einer verminderten Gesamtzellzahl der siRNA-behandelten Panc1-Holoklone einherging, wurde im nächsten Schritt untersucht. Dafür wurde die Zahl der vitalen Panc1-Holoklon-Zellen, die entweder für 72 h mit siRNA gegen Nestin oder mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (Abbildung 33).

Die Herunterregulierung von Nestin bewirkte eine signifikante Verminderung der Holoklon-Zellzahl verglichen mit kontrollbehandelten Panc1-Holoklonen um 44,6 %.

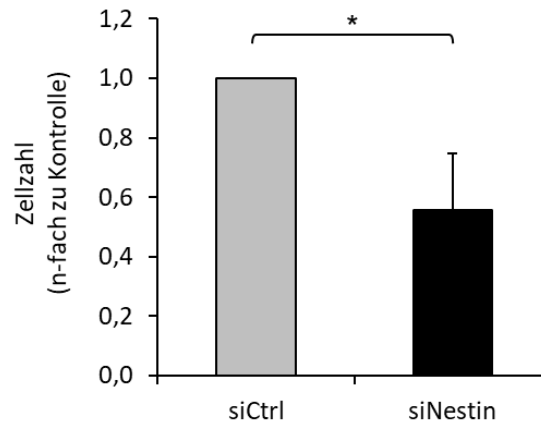


Abbildung 33: siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin vermindert die Zellzahl von Panc1-Holoklonen. Die Zellzahl der Panc1-Holoklone wurde nach 72-stündiger Inkubation mit Nestin-siRNA (siNestin) bzw. Kontroll-siRNA (siCtrl) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Daten sind als n-fache Veränderung zu den kontrolltransfizierten Holoklon-Zellen dargestellt. Die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten sind abgebildet. Signifikante Unterschiede sind durch * markiert.

4.9.4 Einfluss von Nestin auf EMT und Invasionsvermögen von Panc1-Holoklonen

Da die Blockade von $\text{TNF-}\alpha$ nicht nur eine teilweise Minderung des mesenchymalen Phänotyps, sondern ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von Nestin hatte (Abbildung 30), wurde als nächstes untersucht, ob auch eine Modulation der Nestin-Expression einen Einfluss auf EMT-Marker und, damit einhergehend, das Invasionsvermögen von Panc1-Holoklonen hat.

E-Cadherin, aber auch die mesenchymalen Marker LICAM und Vimentin waren durch die verminderte Expression von Nestin in ihrem Expressionslevel verstärkt (11,5-, 4,9- bzw. 1,9-fach), während sich bei Zeb1 keine Änderungen ergaben (Abbildung 34 A). Die Fähigkeit, in eine Kollagenschicht zu invadieren, war in Panc1-Holoklonen, die zuvor mit Nestin-siRNA behandelt wurden, signifikant stärker ausgeprägt als in kontrollbehandelten Holoklonen (Abbildung 34 B).

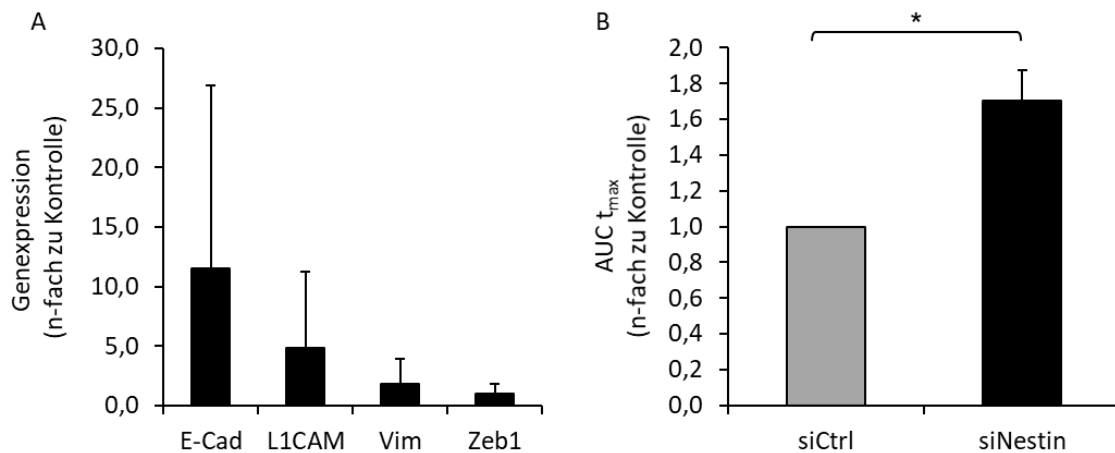


Abbildung 34: siRNA-vermittelter Knockdown von Nestin moduliert die Expression von EMT-Markern und erhöht die Invasionsrate von Panc1-Holoklonen. Die Inkubation mit Nestin-siRNA (siNestin) bzw. Kontroll-siRNA (siCtrl) in Panc1-Holoklon-Zellen erfolgte für 72 h. (A) Nach Isolation der RNA und reverser Transkription wurde die Genexpression von E-Cadherin (E-Cad), L1CAM, Vimentin (Vim) und Zeb1 mittels qPCR bestimmt und auf den Housekeeper GAPDH normalisiert. Dargestellt ist die n-fache Veränderung der Nestin-siRNA- zu Kontroll-siRNA-behandelten Panc1-Holoklonen mit Mittelwerten und SD aus drei unabhängigen Versuchen. (B) Die Invasionsrate durch eine Kollagenschicht wurde nach 72-stündiger Inkubation der siRNA anschließend für 24 h mit Hilfe des xCELLigence RTCA-Systems untersucht. Zur Quantifizierung wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) bis zum Zeitpunkt der höchsten Invasionsrate der kontrollbehandelten Holoklon-Zellen (t_{\max} entspricht 6 h) bestimmt und als n-fache Veränderung zu dieser der kontrolltransfizierten Zellen abgebildet. Die Mittelwerte mit SD aus drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt und signifikante Unterschiede durch * gekennzeichnet.

Diese Daten deuten darauf hin, dass Nestin nicht nur Einfluss auf das Koloniebildungsvermögen hat, sondern auch auf die EMT-Eigenschaften und die Fähigkeit zur Invasion der Panc1-Holoklone.

5 Diskussion

Nicht nur Zellen des Primärtumors, auch disseminierte PDEZ in Sekundärorganen wie der Leber werden durch die Mikroumgebung in ihren Eigenschaften beeinflusst. Während diese Prozesse im Primärtumor zunehmend besser verstanden werden, ist der Einfluss des Lebermilieus auf die Entstehung von Metastasen weitgehend unklar. In einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe wurde die Leberumgebung bereits als wichtige Determinante für die Induktion und auch das Aufheben von Dormanz in PDEZ im Metastasierungsprozess bestimmt (Lenk et al., 2017). Dabei trugen Veränderungen der Leberumgebung hinsichtlich ihres inflammatorischen Zustands zu Änderungen des dormanten Status der PDEZ und zum Auswachsen von Metastasen bei (Lenk et al., 2017). Ähnlich wie dormante PDEZ gelten CSCs wegen ihrer geringen Proliferationsrate als therapieresistente Zellen, von denen angenommen wird, dass sie in der Lage sind, zur Metastasierung beizutragen (Gao et al., 2017; Ghajar, 2015). Die Fähigkeiten der Selbsterneuerung und der Differenzierung als Kennzeichen von CSCs werden als essentiell für die Entstehung des Primärtumors angesehen, weit weniger ist jedoch über ihren Beitrag zur Metastasierung bekannt. In der vorliegenden Studie wurde deshalb untersucht, in welcher Weise unterschiedliche Leberzellen PDEZ insbesondere hinsichtlich ihrer EMT- und CSC-Eigenschaften beeinflussen.

5.1 Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf das Wachstumsverhalten und das Ansprechen auf Apoptosestimuli von PDEZ

In einem ersten Ansatz zur Untersuchung des Einflusses einer hepatischen Umgebung auf PDEZ wurde ein *in vitro*-Kokultursystem verwendet, in dem entweder die Zelllinie H6c7-*kras*, die als einzige PDAC-assoziierte Veränderung eine *kras*-Mutation trägt und somit prämaligene Zellen darstellt, oder die Zelllinie Panc1, die einen malignen Phänotyp repräsentiert, zusammen mit unterschiedlichen hepatischen Stromazellen kultiviert. Repräsentativ für eine physiologische Leberumgebung wurden entweder Hepatozyten alleine oder mit 5 % HSC angereicherte Hepatozyten verwendet, während Hepatozyten, die mit 5 % HMF versetzt wurden, ein inflammatorisches Mikromilieu darstellten.

Die Bestimmung der Zellzahlen (Abbildung 2) machte deutlich, dass Leberzellen maligne PDEZ, dargestellt durch Panc1-Zellen, nicht in ihrem Wachstumsverhalten beeinflussen. Prämaligene H6c7-*kras*-Zellen waren hingegen unter allen Kokultur-Bedingungen in ihrer

Anzahl erhöht, wobei die größten Zellzahlen unter physiologischen Bedingungen (Hepatozyten alleine oder Hepatozyten mit 5 % HSC) auszumachen waren. Hier wurde deutlich, dass es Unterschiede im Einfluss von hepatischen Zellen auf PDEZ unterschiedlicher Malignität gibt und somit auch intrinsische Faktoren der PDEZ ihr Verhalten beeinflussen. So scheinen Panc1-Zellen, die durch eine größere Anzahl an genetischen Alterationen gekennzeichnet sind, eine stärkere Autonomie in ihrem Wachstumsverhalten aufzuweisen als die H6c7-*kras*-Zellen. Zusätzlich zu einer Mutation im Protoonkogen *kras*, die in beiden verwendeten Zelllinien auftritt (Moore et al., 2001; Qian et al., 2005), zeichnen sich Panc1-Zellen durch PDAC-relevante Mutationen in den Tumorsuppressoren *p53* und *CDKN2A/p16* aus (Gradiz et al., 2016; Moore et al., 2001). Diese Veränderungen werden mit den *Hallmarks of Cancer* wie einem konstanten proliferativen *Signalling*, Resistenz gegenüber Zelltod und veränderten metabolischen Eigenschaften assoziiert (Hanahan & Weinberg, 2011). Zudem werden beide Mutationen einem späteren Stadium der Tumorentstehung zugeordnet als die *kras*-Mutation (Distler et al., 2014) und tragen so zum malignen Phänotyp dieser Zellen bei.

Dass es jedoch ebenso wichtig ist, den Einfluss der hepatischen Umgebung auf prämaligne Zellen zu betrachten, wurde in einer Studie von Rhim et al. verdeutlicht (Rhim et al., 2012). Die Arbeitsgruppe konnte in einem PDAC-Mausmodell nachweisen, dass PDEZ bereits während des PanIN-Stadiums in der Zirkulation und sogar in der Leber zu finden sind, auch wenn die Anzahl dieser zirkulierenden PDEZ im PanIN-Stadium verglichen mit der Anzahl der zum Zeitpunkt eines PDACs niedriger war und sich nur einzelne disseminierte PDEZ, aber keine Mikro- oder Makrometastasen in der Leber nachweisen ließen (Rhim et al., 2012). In einer weiteren Studie konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass Patienten mit zystischen Pankreasläsionen eine erhöhte Zahl an Pankreaszellen im Blut aufweisen, was darauf hindeutet, dass es auch im Menschen früh zur Disseminierung pankreatischer Zellen kommt (Rhim et al., 2014b). Darüber hinaus gibt es Studien zum PDAC, in denen in einem Mausmodell ausschließlich nach der Resektion des Primärtumors Metastasen in Leber und Milz entstehen, was ebenfalls auf eine frühe Disseminierung der PDEZ hindeutet und zusätzlich den operativen Eingriff und damit einhergehende inflammatorische Prozesse als Einfluss auf die Metastasenbildung darzustellen scheint (Egberts et al., 2007; Tepel et al., 2006). Wird also davon ausgegangen, dass es auch in der humanen PDAC-Entwicklung zu einer frühen Disseminierung von PDEZ kommt, ist es von Bedeutung, den Einfluss der Leberumgebung nicht nur auf maligne, sondern ebenfalls auf diese prämaligen Zellen zu untersuchen. Ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zum Auswachsen dieser PDEZ zu Metastasen führen, kann dazu beitragen, die Therapierbarkeit des PDAC zu verbessern.

Zwar ließ sich die erhöhte Zellzahl der H6c7-*kras*-Zellen in Anwesenheit von Leberzellen unabhängig ihres inflammatorischen Status in unseren Untersuchungen weder durch eine verstärkte Expression des Proliferationsmarkers Ki67 (Abbildung 3) noch durch eine verminderte basale Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 (Abbildung 4) erklären, beide Methoden stellen jedoch jeweils nur eine Möglichkeit der Bestimmung von Proliferationsverhalten bzw. Apoptoseaktivität dar, die an spezifischen Punkten der jeweiligen Mechanismen ansetzen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Wahl anderer oder zusätzlicher Nachweismethoden Hinweise darauf liefern würde, ob sich die Unterschiede im Wachstumsverhalten der PDEZ eher durch eine verstärkte Proliferations- oder verminderte Rate des Zelltods erklären ließe.

In mehreren Zelllinien des PDAC, inklusive der in dieser Studie verwendeten Zelllinie Panc1, konnten bereits Resistenzen gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose nachgewiesen werden, einem Mechanismus, dem in der endogenen Tumorüberwachung eine Rolle zukommt (Falschlehner et al., 2009; Mohr et al., 2015). In der hier durchgeführten Kokultivierung der Panc1-Zellen mit hepatischen Stromazellen wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 nach 24-stündiger TRAIL-Administration nicht durch die Leberumgebung beeinflusst (Abbildung 5). Die prämaligen H6c7-*kras*-Zellen wiesen jedoch in Anwesenheit der Leberzellen eine verminderte Caspase-Aktivität auf, was darauf hindeutet, dass diese Zellen in einer hepatischen Umgebung stärker vor TRAIL-vermittelter Apoptose geschützt sind als monokultivierte Zellen. Für den Prozess der Metastasierung bedeutet dies, dass die Leberumgebung die Ansiedlung von prämaligen PDEZ auch in Anwesenheit von TRAIL, das von Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, Dendritischen Zellen oder NK-Zellen exprimiert wird (Falschlehner et al., 2009; Griffith et al., 1999; Rowinsky, 2005), in der Leber begünstigt.

Für die Therapierbarkeit des PDAC ist vor allem das Ansprechen der PDEZ im Primär- und Metastasierungsorgan auf Zytostatika wie Gemcitabin oder 5-Fluorouracil von Bedeutung. Beide Substanzen kommen als Monotherapie oder als Bestandteil einer Kombinationstherapie in der Klinik zur Anwendung (Burriss et al., 1997; Conroy et al., 2011; Von Hoff et al., 2013). Wie zuvor bereits in anderen Studien beobachtet wurde (Kim et al., 2014; Schniewind et al., 2004), zeichneten sich Panc1-Zellen in dieser Untersuchung durch eine ausgeprägte Gemcitabin-Resistenz aus, die durch die Einflüsse unterschiedlicher Leberzellen sogar leicht gesteigert wurde (Abbildung 6). Ähnliches konnte nach der Gabe von 5-Fluorouracil sowohl bei den Panc1- als auch bei den H6c7-*kras*-Zellen beobachtet werden. Das Lebermikromilieu scheint disseminierte PDEZ demnach vor Gemcitabin- und 5-Fluorouracil-induzierter

Apoptose zu schützen, obwohl die Gesamtpopulation der Zellen insgesamt bereits eine starke Resistenz gegenüber diesen Zytostatika aufwies. Die Administration von Cisplatin führte hingegen insgesamt zu einer gesteigerten Apoptoserate der PDEZ, die unter Einfluss der Leberzellen leicht verringert wurde (Abbildung 6). In diesem Versuchsaufbau schienen Gemcitabin und Cisplatin stärker zur Apoptoseinduktion von prämaligen als von malignen Zellen zu führen, während beide Zelllinien resistent gegenüber der Administration von 5-Fluorouracil schienen. Eine hepatische Umgebung hatte unabhängig ihres inflammatorischen Status einen leicht protektiven Effekt vor allem auf maligne PDEZ. Insgesamt liegen diese Ergebnisse im Einklang mit den klinischen Befunden, dass das Tumorwachstum aufgrund von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika selbst unter Therapie oft fortschreitet und so zu der kurzen Überlebensdauer von PDAC-Patienten beiträgt (Groot et al., 2018; Hessmann et al., 2017; Neesse et al., 2013).

5.2 Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf EMT-Eigenschaften von PDEZ

Die Fähigkeit von Tumorzellen gegenüber Apoptosestimuli wie z. B. Zytostatika resistent zu sein, wird mit dem Prozess der EMT in Verbindung gebracht, der ebenfalls als Voraussetzung für die Metastasierung gesehen wird (Chaffer et al., 2016; Nieto et al., 2016; Thiery et al., 2009). Dabei kann nicht nur das Mikromilieu des Pankreas zur Fähigkeit der PDEZ zur EMT beitragen (Schäfer et al., 2012a; Zhou et al., 2017), sondern es gibt auch Hinweise darauf, dass die Lebermikroumgebung Tumorzellen in ihrem EMT-Phänotyp beeinflusst (Chaffer et al., 2016; Chao et al., 2010; Clark et al., 2016; Dioufa et al., 2017). In Mamma- und Prostatakarzinomzellen führte eine Kokultur mit Hepatozyten zu einer verstärkten E-Cadherin-Expression in den Tumorzellen, durch die eine Anheftung der Tumorzellen an Hepatozyten erleichtert wird und mit einer verstärkten Chemoresistenz dieser Zellen in Verbindung gebracht wird (Chao et al., 2010, 2012b; Yates et al., 2007). Diese Studien weisen also einen Überlebensvorteil der E-Cadherin-positiven Tumorzellen in der Lebermikroumgebung, dargestellt durch Hepatozyten, nach. Die Befunde stammen allerdings aus direkten Kokulturen von Leber- und Tumorzellen, in der die Tumorzellen zur Unterscheidung von den Hepatozyten eine Fluoreszenz-Markierung trugen. In indirekten Kokulturen, wie sie auch in der vorliegenden Studie mit PDEZ und hepatischen Stromazellen durchgeführt wurden, konnte die gleiche Gruppe den Einfluss von Hepatozyten auf Prostatakarzinomzellen weder bezüglich der Re-Expression von E-Cadherin noch der Chemoprotektion bestätigen (Chao et al., 2012b). In

der vorliegenden Untersuchung konnten nach indirekter Kokultur ebenfalls keine Unterschiede in der E-Cadherin-Expression von monokultivierten PDEZ zu PDEZ, die unterschiedlichen hepatischen Umgebungen ausgesetzt waren, festgestellt werden (Abbildung 7 und Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass die Effekte auf die EMT-Eigenschaften sowohl in Prostatakarzinomzellen als auch in PDEZ nicht oder nicht nur durch lösliche Faktoren, die von den hepatischen Stromazellen freigesetzt wurden, vermittelt werden, sondern ein direkter Kontakt von Tumor- und Stromazellen notwendig ist.

Ein Unterschied, der zwischen Panc1- und H6c7-kras-Zellen detektiert werden konnte, lag in den Größen der im Western Blot detektierten Formen des E-Cadherin mit etwa 80 kDa in Panc1- und 120 kDa in H6c7-kras-Zellen (Abbildung 7). Membran-gebundenes E-Cadherin der vollen Länge zeichnet sich durch ein Molekulargewicht von 120 kDa aus. Lösliche E-Cadherin-Fragmente mit einer Größe von etwa 80 kDa, die durch die Aktivität von Enzymen wie α -Sekretase, MMPs oder *A Disintegrin and Metalloproteases* proteolytisch vom Membran-gebundenen Protein abgespalten werden können, wurden bereits in mehreren Tumorentitäten wie dem Ovarial-, Mamma- oder Kolorektalkarzinom mit Tumorprogression und der Bildung von Metastasen in Zusammenhang gebracht (David & Rajasekaran, 2012; Hu et al., 2016; Symowicz et al., 2007; Trillsch et al., 2016). In einer Studie zur Untersuchung des epithelialen Ovarialkarzinoms ging eine hohe Expression eines löslichen E-Cadherin-Fragments mit einem verstärkten Auftreten von zyttoplasmatischem β -Catenin und dem Auftreten von peritonealen Metastasen einher. Dies erklären die Autoren damit, dass das E-Cadherin-Fragment die Bindestelle an β -Catenin verliert, es so zu einer Bildung von Tumorzellclustern und verstärkter Disseminierung kommen kann (Trillsch et al., 2016). Ähnlich konnten Symowicz et al. nach dem *Shedding* der E-Cadherin-Ektodomäne durch MMP-9 ein verlängertes Überleben und verstärktes Migrationspotential von Ovarialkarzinomzellen durch die Bildung von multizellulären Aggregaten nachweisen (Symowicz et al., 2007). Inwiefern lösliche E-Cadherin-Fragmente auch bei der Progression und Metastasierung des PDAC eine Rolle spielen, bedarf hingegen weiterer Untersuchungen.

Die Zirkulation und Disseminierung von Tumorzellen in Zellclustern anstelle von Einzelzellen scheint für die Bildung von Metastasen von Bedeutung zu sein, wobei die Effizienz der Metastasierung womöglich sogar gesteigert wird (Cheung et al., 2016; Maddipati & Stanger, 2015). *Multicolor lineage tracing*-Analysen in Mausmodellen für Mammakarzinom und PDAC brachten diese Erkenntnisse hervor. In beiden Studien ließ sich eine größere Anzahl an Metastasen auf Tumorzellcluster als auf Einzelzellen zurückführen (Cheung et al., 2016; Maddipati & Stanger, 2015). Allerdings wurde in beiden Modellen nur eine geringe Anzahl an

Farben, nämlich zwei in der Studie des Mammakarzinoms (Cheung et al., 2016) und vier in der des PDAC (Maddipati & Stanger, 2015), für die unterschiedliche Markierung der Tumorzellen verwendet. Die Autoren beider Studien gingen bei der Detektion von einfarbigen Metastasen von einem monoklonalen Ursprung aus, wobei auch diese Metastasen aus unterschiedlichen Klonen gleicher Markierung hervorgegangen sein könnten. Nichtsdestotrotz lässt sich mithilfe dieser Modelle die Heterogenität von PDEZ in Metastasen aufklären. Eine Möglichkeit, die Limitationen der Methodik zu umgehen, wäre die Verwendung der RGB-Markierung von Tumorzellen (Weber et al., 2012). Dabei werden Zellen mit drei unterschiedlichen lentiviralen Vektoren transduziert, die für rote, grüne und blaue Fluoreszenzproteine kodieren. Abhängig von Ort und Anzahl der Insertionen wird jede Zelle durch eine individuelle Farbkennzeichnung markiert und gibt diese an ihre Nachkommen weiter, sodass zumindest in der Theorie bis zu eine Million Klone unterschieden werden können (Weber et al., 2012). Durch die so markierten Zellen wäre ein Nachweis der Heterogenität von zirkulierenden oder disseminierten Tumorzellclustern vereinfacht. Dieses RGB-Zellmodell wurde auch für Analysen der Heterogenität der PDEZ in dieser Arbeit verwendet. In der Praxis zeigten sich jedoch auch hier deutliche Limitationen. Beispielsweise wiesen unterschiedlich große Zellen eines Zellclusters verschiedene Nuancen einer Farbe auf, sodass vermutet wurde, dass die Farbe abhängig von der Zellgröße in variabler Intensität ausgeprägt war. Alternativ wäre denkbar, dass der Ursprung einer solchen Population mit minimalen Farbunterschieden auf mehr als eine Zelle zurückzuführen war, die sich in ihrer Farbgebung nur gering unterschieden (Daten nicht gezeigt).

Während E-Cadherin als epithelialer Marker von zentraler Bedeutung für den Prozess der EMT ist, sind Proteine wie L1CAM und Vimentin für einen mesenchymalen Phänotyp von PDEZ charakteristisch. Die Expression von L1CAM wird dabei mit Zellwachstum, Migration und auch Chemoresistenz in Verbindung gebracht (Geismann et al., 2009; Schäfer et al., 2012b; Sebens Mürkoster et al., 2009). Durch den Einfluss von pankreatischen Myofibroblasten konnte in nicht-neoplastischen PDEZ eine verstärkte L1CAM-Expression beobachtet werden (Geismann et al., 2009) und ebenfalls konnten durch den Einfluss sowohl einer physiologischen Lebermikroumgebung, repräsentiert durch Hepatozyten alleine oder mit 5 % HSC versetzten Hepatozyten, als auch eines entzündlichen Lebermikromilieus, simuliert durch Hepatozyten, die mit 5 % HMF versetzt wurden, in Panc1-Zellen erhöhte L1CAM-Level im Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 7). In H6c7-kras-Zellen konnte dieser Befund nicht beobachtet werden, sondern eher leicht verminderte L1CAM-Level, was erneut aufzeigt, dass prämaligne und maligne PDEZ unterschiedlich auf die Leberumgebung reagieren. Trotz der

verstärkten L1CAM-Expression der mit hepatischen Stromazellen kokultivierten Panc1-Zellen konnte kein Einfluss der hepatischen Umgebung auf die Invasionsfähigkeit dieser PDEZ festgestellt werden, während die leicht verminderte L1CAM-Expression der H6c7-*kras*-Zellen nach Kokultur mit einer verminderten Invasionsfähigkeit einherging (Abbildung 9). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die hepatische Mikroumgebung funktionell einen größeren Einfluss auf die Invasionsfähigkeit der prämaligen als auf die der malignen PDEZ ausübt. Die differentielle Expression von L1CAM unter dem Einfluss der Leberzellen scheint dabei nicht der einzige Faktor zu sein, der die Invasivität der PDEZ beeinflusst.

Hinsichtlich der Expression von Vimentin, einem weiteren mesenchymalen Marker, konnten keine Unterschiede zwischen mono- und kokultivierten PDEZ detektiert werden. Nicht nur Übergangs- oder intermediäre Zustände, in denen sich zeitweise sowohl epitheliale als auch mesenchymale Eigenschaften nachweisen lassen, sondern auch der Beitrag unterschiedlicher Marker zur EMT werden immer wieder diskutiert und weisen auf eine große Heterogenität und Plastizität von Tumorzellen hin (Beerling et al., 2016; Chao et al., 2012a; Lambert et al., 2016; Nieto et al., 2016; Rhim et al., 2012). So konnte bereits in Brustkrebs ein verstärkter epithelialer Phänotyp in unterschiedlichem Metastasengewebe verglichen mit dem des Primärtumors festgestellt werden, während keine Veränderungen der Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin detektiert werden konnten (Chao et al., 2012b). Weiterhin können selbst Zellen innerhalb eines Tumors heterogene EMT-Charakteristika aufweisen, zum Beispiel mit mesenchymalen Eigenschaften an der Invasionsfront, während die Tumormasse epithelial geprägt ist (Brabletz et al., 2001). Jedoch scheint auch die Bedeutung der unterschiedlichen Marker in unterschiedlichen Tumorentitäten oder in unterschiedlichen Stadien der Tumorentwicklung verschieden zu sein. So sahen Zheng et al. nach genetischer Depletion von *Snail* oder *Twist*, zwei EMT-aktivierenden Transkriptionsfaktoren, im KPC-Mausmodell des PDAC, in dem Mäuse Pankreas-spezifische Mutationen in *kras* und *p53* tragen (LSL-*Kras*^{G12D/+}; LSL-*Trp53*^{R172H/+}; Pdx-1-Cre), keinen Effekt auf Tumorinitiation, Invasion oder Metastasierung und folgerten daraus, dass die EMT für die Ausbildung von Metastasen überflüssig sei (Zheng et al., 2015). Der konditionelle *Knockout* eines anderen EMT-Aktivators, nämlich *Zeb1*, im gleichen PDAC-Modell wies hingegen starke Effekte auf die Ausbildung von Vorläuferläsionen, Invasion sowie der Metastasierung auf (Krebs et al., 2017). Dies verdeutlicht, dass die Funktion dieser EMT-Marker nicht als redundant angesehen werden kann und durch die Betrachtung einzelner EMT-Marker nur begrenzt auf den Prozess der EMT geschlossen werden kann.

Bis zu diesem Punkt wurde stets die Gesamtpopulation der mono- oder kokultivierten PDEZ den Analysen unterzogen. Gerade unter dem Aspekt der Heterogenität und des klonalen Wachstums ist es hingegen denkbar, dass nicht die gesamte Zellpopulation gleichmäßig auf Einflüsse der hepatischen Mikroumgebung reagiert, sondern womöglich einzelne Subklone unterschiedlich beeinflusst werden. Unter diesen Bedingungen wäre ein differentieller Effekt der Leberzellen nicht notwendigerweise durch Analysemethoden der Gesamtpopulation, wie z. B. einem Western Blot oder einer qPCR, darstellbar. Aus diesem Grund wurden zusätzlich immunzytochemische und Immunfluoreszenz-Färbungen von PDEZ durchgeführt. In der Tat wiesen Doppelfärbungen von E-Cadherin und L1CAM in mono- und kokultivierten Panc1-Zellen dabei auf eine große Heterogenität der Zellpopulationen hinsichtlich der Expression dieser EMT-Marker hin, quantitative Unterschiede ließen sich hingegen auch durch die Betrachtung einzelner Zellen nicht feststellen (Abbildung 8). Diese Heterogenität bestätigt jedoch, dass es wichtig ist, die Effekte einer hepatischen Kokultur nicht nur auf die gesamte Zellpopulation, sondern auch auf einzelne Zellen zu betrachten, da schon wenige Zellen für das Auswachsen von Metastasen verantwortlich sein können.

5.3 Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf CSC-Eigenschaften von PDEZ

Ein weiterer Aspekt, der für den Erfolg der Metastasierung von Bedeutung ist, ist das Stammzellpotential von Tumorzellen. Es wird angenommen, dass Zellen, die in der Lage sind, Tumor- oder Metastasenwachstum zu initiieren, ähnlich wie adulte Stammzellen Eigenschaften zur Selbsterneuerung und Differenzierung aufweisen und nur einen geringen Anteil eines Tumors ausmachen (Aponte & Caicedo, 2017; Batlle & Clevers, 2017). Während eine kontinuierliche Proliferationsfähigkeit von adulten Stammzellen die Voraussetzung für die Gewebeintegrität und -funktion ist, ist im Tumorkontext die vollständige Eliminierung dieser Eigenschaft notwendig, um Rezidive und Metastasen zu verhindern (Franken et al., 2006).

Experimentell wurde in dieser Studie zunächst der Einfluss des hepatischen Mikromilieus auf die Fähigkeit der PDEZ zur Koloniebildung überprüft. Verglichen mit monokultivierten PDEZ war das Koloniebildungsvermögen nach hepatischer Kokultur sowohl in prämaligen H6c7-kras- als auch in malignen Panc1-Zellen erhöht. Der stärkste Effekt ging dabei von einer mit HSC-angereicherten Hepatozyten-Kokultur aus, was darauf hindeutet, dass eine physiologische Leberumgebung CSC-Eigenschaften erhalten und sogar fördern kann (Abbildung 10). Die Beobachtung, dass bei beiden Zelllinien unter inflammatorischen Bedingungen (co H+5HMF)

eine geringere Anzahl an Kolonien auftrat, ließe sich mit der Beobachtung von einem verstärkten Proliferationsvermögen von PDEZ unter inflammatorischen Bedingungen (co HMF) von Lenk et al. in Einklang bringen (Lenk et al., 2017), da sich durch eine verstärkte Proliferation der prozentuale Anteil der CSCs in der PDEZ-Population verringern würde. Allerdings konnte der Zusatz von Hepatozyten zu HMFs in der vorliegenden Untersuchung die verstärkte Proliferation unter inflammatorischen Konditionen nicht bestätigen (Abbildung 2 und Abbildung 3). Inwieweit dies auf die Kulturbedingungen mit den Hepatozyten zurückzuführen ist, sollte weitergehend untersucht werden.

Die höhere Anzahl an Panc1-Kolonien im Vergleich zu H6c7-kras-Kolonien deutet darauf hin, dass maligne Zellen erhöhte CSC-Eigenschaften aufweisen, was wiederum auf eine verstärkte Tumorigenität hinweist. Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass H6c7-kras-Zellen nur in seltenen Fällen Holoklone bilden und auch der Anteil an Meroklonen geringer ist als der maligner Zellen (Abbildung 10 B). Ferner steht dies im Einklang damit, dass H6c7-kras-Zellen eine eingeschränkte Tumorigenität aufweisen (Qian et al., 2005). Für das PDAC wurden verschiedene CSC-Marker beschrieben, unter anderem auch Nestin, Nanog und ABCG2 (Lu et al., 2013; Matsuda et al., 2011; Su et al., 2013). Unterschiedliche CSC-Marker scheinen auch in den hier verwendeten PDEZ von unterschiedlicher Bedeutung zu sein. Während die Nestin-Expression in beiden Zelllinien unter Einfluss der hepatischen Mikroumgebung verstärkt war, konnte bei den H6c7-kras-Zellen zusätzlich eine erhöhte Nanog-Expression festgestellt werden (Abbildung 11). Aus Immunfluoreszenz-Färbungen ging jedoch hervor, dass sich die Nestin-Expression in H6c7-kras-Zellen insgesamt auf einzelne wenige Zellen beschränkte (Daten nicht gezeigt), weshalb im Folgenden bei dieser Zelllinie die Nanog-Expression im Fokus stand. Die Panc1-Zellen erwiesen sich bezüglich der Nanog-Expression unabhängig des Einflusses der hepatischen Mikroumgebung. Insgesamt weisen PDEZ also nicht nur in Bezug auf EMT-, sondern auch auf CSC-Marker eine große Heterogenität auf. Dies wird zusätzlich dadurch verdeutlicht, dass in den Panc1-Zellen Nestin, in den H6c7-kras-Zellen hingegen Nanog stärker durch den Einfluss der Leberzellen differentiell exprimiert wurde.

5.4 Charakterisierung von PDEZ mit unterschiedlichen CSC-Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*

Da unter Einfluss von hepatischen Stromazellen vornehmlich ein Effekt auf CSC-Eigenschaften beobachtet, aber auch eine große Heterogenität innerhalb der PDEZ-

Populationen unter den bestimmten Kulturbedingungen verzeichnet wurde, wurden im nächsten Schritt Einzelzellexpansionen vorgenommen. Um die unterschiedlichen Kolonietypen detaillierter zu charakterisieren, wurden Holoklone, Meroklone und Paraklone aus Einzelzellen, die zuvor mit 5 % HSC-angereicherten Hepatozyten kokultiviert wurden, expandiert und analysiert. Während mit Panc1-Zellen die Herstellung von allen drei Klontypen gelang, konnten mit H6c7-*kras*-Zellen nur Paraklone und Meroklone erfolgreich expandiert werden. Dies untermauert die Tatsache, dass diese prämaligen Zellen geringere CSC-Eigenschaften aufweisen als die malignen Panc1-Zellen. Schon Qian et al. wiesen nach, dass die Administration von H6c7-*kras*-Zellen in SCID-Mäusen nur in knapp 50 % der Tiere Tumorwachstum auslöste (Qian et al., 2005), während die Entstehung von Tumoren aus Panc1-Zellen in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Methoden bei über 80 % lag (Deer et al., 2010). Expandierte Zellen aller Klonformen brachten in erneuten CFAs einen großen Anteil Kolonien ihrer ursprünglichen Form hervor, was auf einen stabilen Phänotyp hindeutet. Dennoch waren in jeder Population auch Kolonien anderer Formen detektierbar (Abbildung 13). Dies steht im Einklang mit der Eigenschaft von CSCs sich asymmetrisch zu teilen, also wiederum Zellen mit hohem CSC-Potential, aber auch weiter differenzierte Zellen hervorzubringen (Batlle & Clevers, 2017).

In der CSC-Marker-Analyse der Gesamtpopulationen der PDEZ waren vor allem die Expressionslevel von *Nanog* in H6c7-*kras*- und *Nestin* in Panc1-Zellen durch die hepatische Kokultur differentiell reguliert (Abbildung 11). In einer Studie von Skoda et al. wurde *Nestin* in 95 % der Zellen, die aus primären PDAC-Zelllinien gewonnen wurden, nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass *Nestin* in nahezu allen Tumorzellen gleichmäßig exprimiert wird (Skoda et al., 2016). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Studie eine differentielle Expression von *Nestin* in Panc1-Zellen festgestellt, die in Holoklonen verglichen mit Paraklonen stark erhöht war (Abbildung 14 und Abbildung 15). Weiterhin konnte weder in H6c7-*kras*-Paraklonen noch in den korrespondierenden Meroklonen *Nestin* nachgewiesen werden, was die Bedeutung dieses Intermediärfilaments als Marker für Zellen mit hohem Selbsterneuerungspotential, wie sie in Holoklonen gefunden werden, unterstützt. *Nanog* hingegen konnte im Gegensatz zu *Nestin* in den Panc1-Zellen sowohl in Para- als auch in Holoklonen nachgewiesen werden. In H6c7-*kras*-Meroklonen war die *Nanog*-Expression verglichen mit Paraklonen stark erhöht (Abbildung 14), wobei die Ergebnisse der qPCR-Analyse in Immunfluoreszenz-Färbungen nicht bestätigt werden konnten. Aus ihnen ging jedoch hervor, dass dieser Transkriptionsfaktor in den meisten PDEZ im Zytoplasma und nur selten im Nucleus vorlag, sodass davon ausgegangen werden kann, dass *Nanog* nur in wenigen Zellen

aktiv war. Die Lokalisation von Nanog im Zytosol wurde zuvor schon in anderen Tumorzelllinien wie z. B. HeLa-Zellen sowie in Tumorzellen des HCC und Zervixkarzinoms beschrieben (Gu et al., 2012; Sun et al., 2013). Inwieweit die Lokalisation für die molekularen Eigenschaften von Bedeutung ist, insbesondere für das CSC-Potential, ist jedoch wenig verstanden (Gu et al., 2012; Wen et al., 2010). Nicht nur im PDAC wurde Nanog bislang nur im Zusammenspiel mit Faktoren wie Oct4 oder Wnt-1 ein Beitrag zur Tumorigenität nachgewiesen (Fishedick et al., 2014; Lu et al., 2014, Lu et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass Nanog kein klassisches Onkogen darstellt, sondern eher die protumorigene Wirkung anderer Faktoren verstärkt (Fishedick et al., 2014; Jeter et al., 2015). Des Weiteren wurde Nanog, wiederum im Zusammenspiel mit Oct4, aufgrund seiner starken Expression in metaplastischen Gängen schon vor dem Nachweis von *kras*-Mutationen mit einem frühen Stadium der PDAC-Tumorigenese in Verbindung gebracht (Wen et al., 2010). Dies unterstützt die Hypothese, dass Nanog in einem prämaligen Stadium der PDEZ, wie durch die H6c7-*kras*-Zellen repräsentiert, von größerer Bedeutung ist als in den späteren Stadien der Karzinogenese und untermauert die Bedeutung von Plastizität in CSCs. Dass CSC-Eigenschaften nicht notwendigerweise stabil in einer Zelle ausgeprägt sind, sondern erworben werden und verloren gehen können, konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Chaffer et al., 2011; Mani et al., 2008) und kann sowohl durch Einflüsse aus der Mikroumgebung bedingt werden (Mani et al., 2008; Schwitalla et al., 2013) oder spontan auftreten (Chaffer et al., 2011).

Die Therapieresistenz ist eines der Merkmale von CSCs (Batlle & Clevers, 2017; Zhou et al., 2017) und schon während der ersten Nachweise wurden auch pankreatische CSCs als Gemcitabin-resistent charakterisiert (Hermann et al., 2007). Sowohl in Panc1-Holoklonen als auch H6c7-*kras*-Meroklonen wurde eine geringere basale Apoptoserate detektiert als in den entsprechenden Paraklonen (Abbildung 16 A), was im Einklang mit ausgeprägten Überlebensmechanismen dieser Zellen steht. Gegenüber Apoptosestimuli wie TRAIL oder den Zytostatika Gemcitabin, 5-Fluorouracil oder Cisplatin waren H6c7-*kras*-Meroklone wie erwartet stärker resistent als die Paraklone, die Panc1-Holoklone hingegen wiesen eine verminderte Resistenz verglichen mit Paraklonen auf (Abbildung 16 B). Da diese Untersuchungen mit den expandierten Zellen aus genau einer Einzelzelle durchgeführt wurden, wäre es sinnvoll, auch andere Panc1-Holoklon-Populationen auf ihre Resistenz gegenüber diesen Apoptosestimuli zu testen, um diese unerwarteten Befunde zu verifizieren. Für die schlechte Therapierbarkeit des PDAC wird sowohl seine Heterogenität innerhalb eines Tumors als auch zwischen Patienten verantwortlich gemacht (Dauer et al., 2017; Makohon-Moore et

al., 2017). Eine Zelllinie kann diese Heterogenität nur bedingt widerspiegeln, insbesondere, wenn sie in Langzeitkulturen *in vitro* einem Selektionsdruck an die Kulturbedingungen unterliegt (Wennerström et al., 2014). Deshalb sind Analysen zur Bestätigung dieser Beobachtungen mit anderen Zellsystemen geplant.

CSCs liegen im Gewebe oder Tumor jedoch nicht als isolierte Zellen vor, sondern unterliegen den Einflüssen der Umgebung, darunter auch PDEZs mit weniger ausgeprägten CSC-Eigenschaften. Diese Beeinflussung wurde durch eine indirekte Kokultivierung von Panc1-Para- und Holoklonen sowie H6c7-kras-Para- und Meroklonen nachgebildet und ihre Auswirkungen mit monokultivierten Zellen verglichen (Kapitel 4.5.4). Insgesamt ließen sich leicht verringerte Zell- und Koloniezahlen aller Bedingungen von Panc1- und H6c7-kras-Klonen nach Kokultur und eine verminderte CSC-Marker-Expression der kokultivierten H6c7-kras-Meroklone nach gegenseitiger Kokultur beobachten. Vor allem Klone maligner Zellen mit unterschiedlichem Selbsterneuerungspotential schienen sich demnach kaum gegenseitig zu beeinflussen, wohingegen Klone prämaligener Herkunft stärkeren Veränderungen unterlagen. Ob dieses unterschiedliche Verhalten mit den Unterschieden der Zelllinien oder den Unterschieden der Klonformen (Holoklone der Panc1- und Meroklone der H6c7-kras-Zelllinie) zu begründen ist, darauf würden eine Kokultur von expandierten Panc1-Meroklonen mit entsprechenden Paraklonen oder auch die Analysen weiterer PDAC-Zelllinien unterschiedlicher Malignität erste Hinweise liefern. Zusätzlich wären Untersuchungen bezüglich der Einflüsse der hepatischen Mikroumgebung auf diese Zellen, insbesondere unter dem Aspekt von Entzündungsprozessen und dem Auswachsen von Metastasen, interessant, da schon in der Gesamtpopulation der Panc1- und H6c7-kras-Zellen unterschiedliches Koloniebildungsvermögen mit veränderter CSC-Marker-Expression unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen festgestellt werden konnte (Kapitel 4.4).

Neben einer erhöhten Nestin-Expression zeigten Panc1-Holoklone im Vergleich zu Paraklonen eine verstärkte Tumorigenität *in vivo*, wobei sich die in SCID-beige Mäusen gebildeten Tumore wiederum durch Nestin-Expression auszeichneten (Abbildung 22). Die Bedeutung von Nestin wird in Analysen verdeutlicht, in denen die Herunterregulierung von Nestin mit verminderter Migration und Invasion von Tumorzellen *in vitro* und mit verminderter Metastasenbildung *in vivo* einhergeht (Matsuda et al., 2011, 2014). Im Gegensatz zu Ergebnissen aus dem Prostatakarzinom, in dem alleine die Inokulation von Holoklon-Zellen eine Tumorbildung auslöst (Beaver et al., 2014; Li et al., 2008), führte in der vorliegenden Studie die Inokulation von Panc1-Paraklon-Zellen in zwei von zehn Tieren zu Tumorwachstum (Abbildung 21). Wie bereits oben erwähnt, deuten die CFA-Ergebnisse selbst bei Klonformen, die aus Einzelzellen

expandiert wurden, auf eine heterogene Zellpopulation hin. So bilden Zellen aus Holoklonen ebenfalls Mero- und Paraklone und umgekehrt, Zellen aus Paraklonen können vereinzelt auch Mero- oder Holoklone hervorbringen (Abbildung 13; Tan et al., 2011). Zum einen kann ein Pankreastumor, der nach der Inokulation von Paraklon-Zellen entstanden ist, aus einer Zelle hervorgegangen sein, die ein größeres Selbsterneuerungspotential besaß als andere Zellen dieser Population. Zum anderen ist es möglich, dass die Einflüsse aus der Mikroumgebung tumorogene Eigenschaften in den inokulierten Zellen gefördert haben, sodass einzelne Paraklon-Zellen Eigenschaften von Holoklonen erwarben, die dann zum Tumorwachstum führten. Dieser Einfluss der Mikroumgebung würde auch die detektierte Nestin-Expression in dem Pankreastumor erklären, der nach der Inokulation von Panc1-Paraklon-Zellen gebildet wurde. Interessanterweise konnte Nestin nur im Pankreastumor nachgewiesen werden, nicht jedoch in der zugehörigen Leberläsion. Dies macht deutlich, inwiefern das Mikromilieu die Eigenschaften von Tumorzellen und somit auch das Tumorwachstum beeinflussen kann. Dabei spielen nicht nur die CSC-Eigenschaften eine Rolle, sondern auch Prozesse der EMT sind von Bedeutung und können durch die Mikroumgebung moduliert werden (Andriani et al., 2016; Chaffer et al., 2013; Mani et al., 2008; Schwitalla et al., 2013). Tumore, die nach der Inokulation von Panc1-Holoklonen entstanden waren, wiesen nicht nur eine starke Nestin-Expression auf, sondern auch einen verstärkt mesenchymalen Phänotyp (Abbildung 23), der sich durch einen verminderten E-Cadherin-Gehalt bei gleichzeitig verstärkter Expression mesenchymaler Marker kennzeichnete. Diese mesenchymalen Eigenschaften der Panc1-Holoklon-Zellen konnten auch *in vitro* bestätigt werden (Abbildung 24 und Abbildung 25) und auch H6c7-kras-Meroklone besaßen *in vitro* einen verstärkt mesenchymalen Charakter verglichen mit entsprechenden Paraklonen (Abbildung 24). Dies untermauert, dass Paraklone als differenziertere Zellpopulation gelten als Mero- oder Holoklone. Entgegen der Erwartungen waren Panc1-Holoklone trotz ihrer mesenchymalen Eigenschaften durch eine geringere Invasionsrate durch eine Kollagenschicht gekennzeichnet als Panc1-Paraklone (Abbildung 26). In einem Modell des PDAC wurden von Hermann et al. unterschiedliche CSC-Populationen beschrieben, die einen unterschiedlichen Beitrag zur Tumorprogression leisten. Während CD133-positive CSCs tumorigenes Potential und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika aufweisen, trägt eine Subpopulation dieser Zellen, die in der Invasionsfront von Tumoren nachgewiesen werden kann und zusätzlich zu CD133 CXCR4 exprimiert, zur Metastasierung des PDAC bei (Hermann et al., 2007). So gehen auch Mukherjee et al. aufgrund von Befunden in einem Modell des Brustkrebs davon aus, dass es neben metastatischen CSCs, die sich u. a. durch ein hohes Migrationspotential auszeichnen, auch tumorogene CSCs gibt, die in der

inneren Masse von Tumoren vorkommen, dort stationär verbleiben und eine Art Master-Regulatoren darstellen (Hermann et al., 2007; Mukherjee et al., 2016). Diese von den Autoren als intrinsische CSCs bezeichneten Zellen nehmen zwar nicht aktiv an der Tumorprogression teil, sind jedoch in der Lage, durch die Sekretion von pro-migratorischen Faktoren CSC-Eigenschaften in Nicht-CSCs hervorzurufen, die wiederum durch eine hohe Migrationsfähigkeit charakterisiert sind. Diese migratorischen CSCs kennzeichnen sich neben der Expression von CXCR4 durch einen ausgeprägten mesenchymalen Phänotyp (Mukherjee et al., 2016). Möglicherweise nehmen die in der vorliegenden Studie generierten Panc1-Holoklon-Zellen eine Zwischenform zwischen intrinsischen und migratorischen CSCs ein, die sich zwar verglichen mit Paraklonen durch stärker mesenchymale Eigenschaften auszeichnen, jedoch weniger Invasionspotential aufweisen (Abbildung 26), selbst wenn *in vivo* eine hohe Tumorigenität und auch Metastasierungspotential nachgewiesen werden konnte. Es könnte vermutet werden, dass ein Großteil der Zellen mit Holoklon-Eigenschaften stationär im Tumorbereich verbleibt, wofür nur eine geringe Invasionsfähigkeit erforderlich ist. Einzelne migratorisch aktivere Zellen, möglicherweise auch der gleichen Population, würden demnach zur Metastasierung beitragen. Interessant wäre auch in den hier verwendeten Zellen den Beitrag von CXCR4 zu untersuchen. Vor allem die Tumorigenität der Panc1-Holoklon-Zellen *in vivo* deutet zusätzlich darauf hin, dass Faktoren aus der Mikroumgebung ebenfalls Einfluss auf das CSC-Potential dieser Zellen haben.

Ein Faktor, der in diesem Zellsystem differentiell reguliert vorlag, war mit TNF- α ein Zytokin, dem im PDAC bereits ein Einfluss auf Tumorwachstum und Invasivität nachgewiesen werden konnte (Egberts et al., 2008) und welches auch im Prozess der Lebermetastasierung eine Rolle spielt (Brodt, 2016). TNF- α wurde bereits in mehreren Tumorentitäten mit der EMT und auch mit CSC-Eigenschaften in Verbindung gebracht (Li et al., 2012; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2014). Der mesenchymale Phänotyp und die verstärkten CSC-Eigenschaften der Panc1-Holoklone waren teilweise durch die Blockade von TNF- α mittels Etanercept reversibel (Kapitel 4.8.), was sich durch die verminderte Expression mesenchymaler Marker sowie der CSC-Marker Nestin und Nanog äußerte. Zusätzlich bildeten Etanercept-behandelte Panc1-Holoklon-Zellen weniger Holoklone als unbehandelte Zellen zugunsten der Anzahl an Paraklonen (Abbildung 30). Dieser Zusammenhang zwischen der Blockierung von TNF- α und der Reduktion des Koloniebildungspotentials unterstützt Studien, die auf einen Zusammenhang von EMT und CSC hinweisen (Chaffer et al., 2013; Mani et al., 2008; Su et al., 2013). Allerdings scheinen auch andere Faktoren als TNF- α an diesen Prozessen beteiligt zu sein, da die Blockierung die CSC- und EMT-Marker-Expression sowie die Koloniebildungsfähigkeit

der Panc1-Holoklon-Zellen nicht komplett inhibierte (Abbildung 28, Abbildung 30). Ähnlich wie TNF- α gilt TGF- β 1 als EMT-induzierend und ist somit auch im Zusammenhang mit CSC-Eigenschaften von Bedeutung (Andriani et al., 2016; Mani et al., 2008; Shipitsin et al., 2007; Su et al., 2013), insbesondere, da Panc1-Zellen verstärkt TGF- β 1 sezernieren (Geismann et al., 2009; Rahn et al., 2018). Da jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression von TGF- β 1 zwischen Holo- und Paraklonen festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde dessen Relevanz für dieses System bislang nicht weiter untersucht.

Neben Nestin wurde Zeb1 als wichtiger Faktor identifiziert, der im PDAC mit metastatischem Wachstum assoziiert ist (Krebs et al., 2017). Durch die Abwesenheit von Zeb1 wird das CSC-Potential sowie die Plastizität von PDAC- und Brustkrebszellen vermindert (Chaffer et al., 2013; Krebs et al., 2017). Außerdem wurde Zeb1 bereits mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht, die in der Ausbildung von Lungenmetastasen bei Brustkrebszellen von Bedeutung sind (De Cock et al., 2016). So beschreiben De Cock et al. das Wachstum von Lungenmetastasen von zuvor disseminierten Brustkrebszellen nach der Induktion von inflammatorischen Prozessen durch die Behandlung mit Lipopolysacchariden. Das Auswachsen der Metastasen ging mit der Aktivierung von EMT-Prozessen in diesen DTCs einher, welche von den Transkriptionsfaktoren Zeb1 und Twist abhängig waren (De Cock et al., 2016). Entsprechend dieser Beobachtungen wurde auch in Panc1-Holoklonen eine verstärkte Zeb1-Expression verglichen mit Paraklonen nachgewiesen, die durch die Blockierung von TNF- α teilweise rückgängig gemacht werden konnte (Abbildung 24 und Abbildung 28). Im Einklang damit konnten Egberts et al. zeigen, dass TNF- α das Tumorstadium und die Invasionsfähigkeit von PDAC-Zellen fördert und die Blockierung von TNF- α die Tumormasse in Xenotransplantationsmodellen signifikant verringert. Weiterhin bewirkt die Blockierung von TNF- α nach Entfernung des Primärtumors, als Modell einer adjuvanten Therapie, eine Verminderung der Bildung von primären Rezidiven und Lebermetastasen (Egberts et al., 2008).

In mehreren Studien wurde der Beitrag von Nestin zur Tumorigenese und Metastasierung des PDAC untersucht. So erhöht die Überexpression von Nestin die Motilität von PDAC-Zellen und bringt einen mesenchymalen Phänotyp hervor, wohingegen die Herunterregulierung mit einem epithelialen Charakter, vermindertem Tumorstadium und Tumormasse korreliert (Hagio et al., 2013; Matsuda et al., 2014; Su et al., 2013). Die transiente Herunterregulierung von Nestin mittels siRNA (Kapitel 4.9) führte in Panc1-Holoklonen ebenfalls zu einer verminderten Zellzahl und einem verminderten Koloniebildungsvermögen, das zusätzlich durch einen verminderten Anteil an Holoklonen gekennzeichnet war (Abbildung 32). Überdies

konnte ein Einfluss auf die Expression von EMT-Markern dieser Zellen sowie das Invasionsvermögen nachgewiesen werden. Dies bestätigt zum einen die Bedeutung von Nestin als CSC-Marker der Panc1-Holoklon-Zellen und zum anderen eine Verbindung zwischen EMT- und CSC-Eigenschaften dieser Zellen.

5.5 Kritische Reflektion des Zellmodells

Wird die Gesamtheit der durchgeführten Kokulturversuche betrachtet, so ist festzustellen, dass durch den Einfluss des hepatischen Mikromilieus in vielen Untersuchungen nur geringe Effekte in den PDEZ ausgelöst wurden. Dies war zumeist unabhängig davon, ob Hepatozyten alleine, mit 5 % HSC- oder 5 % HMF-angereicherte Hepatozyten eingesetzt wurden. Lediglich die Analysen des CSC-Potentials der PDEZ wiesen auf Unterschiede zwischen einer physiologischen und inflammatorischen Leberumgebung hin (Kapitel 4.4).

In einem ähnlichen Kokultursystem der Arbeitsgruppe konnten deutliche Effekte von HSCs und HMFs alleine auf PDEZ wie Panc1- und H6c7-kras-Zellen u. a. auf Zellzahl und Dormanz beobachtet werden (Lenk et al., 2017). Der Unterschied dieser Kokultur-Bedingungen zur vorliegenden Studie bestand dabei zum einen im alleinigen Einfluss von entweder HSCs oder HMFs auf PDEZ ohne den Einfluss von Hepatozyten. Zum anderen kam die Kokultur ohne den Einsatz von Kollagen als ECM aus, welches für die Kultivierung der primären Hepatozyten essentiell war (Daten nicht gezeigt). In einem humanen Zellkultursystem zur Untersuchung des HCC beschreiben Coulouarn et al. eine bidirektionale Wirkung von transformierten, differenzierten Hepatozyten und LX2-Zellen, die humane aktivierte Sternzellen analog zu den hier verwendeten murinen HMFs darstellen (Coulouarn et al., 2012). Dabei förderte eine indirekte Kokultur dieser Zellen ein proinflammatorisches Milieu (Hochregulierung von u. a. IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL-2), eine Remodellierung der ECM (erhöhte Aktivität von MMP-9 und MMP-2) und Angiogenese (VEGF-A), wobei diese Bedingungen mit einer erhöhten Migration der hepatischen Tumorzellen einhergingen (Coulouarn et al., 2012). Diese Mechanismen sind demnach in der Lage, ein erhöhtes Tumorwachstum in Bezug auf das HCC, jedoch auch eine verstärkte Ansiedlung von DTCs anderer Tumorentitäten zu fördern. Insgesamt kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sich die Abweichungen der vorliegenden Studie zu den Ergebnissen der Studie von Lenk et al. auf unterschiedliche Zytokinspiegel und ECM-Bedingungen zurückführen lassen, die durch den Einsatz der Hepatozyten in Kombination mit

HSCs bzw. HMFs, die dadurch erforderlichen Kulturbedingungen, aber auch die gegenseitige Beeinflussung dieser hepatischen Stromazellen ausgelöst wurden.

Während die verwendeten HSCs und HMFs aus murinen, immortalisierten Zelllinien entstammten, wurden frisch isolierte, primäre murine Hepatozyten in den Versuchen eingesetzt. Wie bereits in Untersuchungen anderer Gruppen beschrieben wurde (Shulman & Nahmias, 2013; Wheeler et al., 2014; Zellmer et al., 2010), wurde auch in unseren Kulturen eine transiente Anpassung der Hepatozyten an die Kulturbedingungen beobachtet. Wheeler et al. führen diese Adaptation auf den Zelltod von durch die Isolation geschädigten Zellen, die Wiederherstellung der hepatozellulären Genexpression sowie die verstärkte Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen zurück (Wheeler et al., 2014). Als Zeichen für Zellverletzungen wies die Detektion von erhöhten Aktivitäten der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) in dieser Studie darauf hin, dass sich die Hepatozyten in der neuen Umgebung zunächst adaptieren mussten, bevor die Enzymaktivitäten nach dieser initialen Phase sanken (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich schienen jedoch die PDEZ die Hepatozyten in ihrer Aktivität von AST und ALT zu beeinflussen, da monokultivierte Hepatozyten niedrigere Werte der Enzymaktivitäten aufwiesen als mit PDEZ kokultivierte Hepatozyten (Daten nicht gezeigt). Zwischen HSCs und HMFs hingegen konnte keine differentielle Beeinflussung der Hepatozyten nachgewiesen werden, sodass Unterschiede in den Analysen unter diesen Kulturbedingungen tatsächlich auf die unterschiedliche Wirkung dieser Zellen auf PDEZ zurückgeführt werden konnten.

Ein Vorteil des hier verwendeten indirekten Kokultursystems unter Verwendung von Transwells liegt darin, dass die Zellpopulationen beider Kompartimente nach entsprechender Kulturdauer ohne zusätzliche Separationsverfahren getrennt voneinander und damit sauber analysiert und funktionell untersucht werden können. Ein Einfluss der jeweils anderen Zellpopulation kann in diesem System nur über lösliche Faktoren erfolgen.

Um die Herkunft dieser Faktoren auf eine Zellpopulation zurückführen zu können, wurde ein System aus humanen PDEZ und murinen Leberzellen gewählt. Da die Ergebnisse dieser Studie zum Verständnis des PDAC im Menschen beitragen sollen, ist es jedoch notwendig, diese Erkenntnisse in einem rein humanen System zu bestätigen. Die größten Limitationen stellen dabei die regelmäßige Verwendung von vitalen Hepatozyten, aber auch die von nicht-aktivierten Sternzellen dar. Färbungen an fixierten Gewebeproben, idealerweise sogar von Primär- und Metastasengewebe aus einem Patienten, stellen eine weitere Möglichkeit zur Validierung der *in vitro* festgestellten Befunde dar. Da in der Klinik jedoch PDAC-Patienten,

die bereits Metastasen aufweisen, meist nicht operativ behandelt werden, sind Gewebeproben von PDAC-Metastasen selten.

Gelangen PDEZ in die Leber, stehen sie in direktem Kontakt mit den Leberzellen und nicht nur mit den von diesen Zellen sezernierten löslichen Faktoren. Dieser Vorgang kann in einer direkten Kokultur simuliert werden, wobei die Verwendung von Zellen aus verschiedenen Spezies weiterführende Analysen vereinfacht. In dieser Studie wurden die gleichen Zellen (murine Leberzellen und humane PDEZ) wie in der indirekten Kokultur zusätzlich einer direkten Kokultur unterzogen und anschließend die Genexpression der humanen PDEZ mithilfe von human-spezifischen Primern vergleichend mit parallel monokultivierten PDEZ untersucht. Bezogen auf die CSC-Markerexpression konnten die Effekte der indirekten Kokultur bestätigt werden, jedoch in stärkerer Ausprägung (Abbildung 11 und Daten nicht gezeigt). Dieser Befund deutet an, dass die Effekte der Leberumgebung nicht nur über lösliche Faktoren, sondern auch über Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden und die in der indirekten Kokultur sichtbaren Effekte nur einen kleinen Teil des Einflusses des hepatischen Milieus auf disseminierte PDEZ widerspiegeln.

Anlehnend an die *Seed-and-Soil*-Theorie von Paget (Paget, 1889) wird heute davon ausgegangen, dass selbst der Primärtumor die Mikroumgebung im Sekundärorgan beeinflusst und so die Ansiedlung von DTCs fördert (Liu & Cao, 2016). Für Tumorzellen des Kolorektal- und Mammakarzioms konnte bereits in mehreren Studien ein Einfluss auf die Lebermikroumgebung oder auch das Mikromilieu der Lunge nachgewiesen werden (Dioufa et al., 2017; Eveno et al., 2015; Gao et al., 2012). Im PDAC scheint es ebenfalls einen Einfluss des Primärtumors auf die Metastasierung zu geben und zwar in Form von Exosomen. In einem Mausmodell von Costa-Silva et al. wurden Exosomen aus PDAC-Zellen von Kupffer-Zellen aufgenommen und bewirkten TGF- β -abhängig sowohl eine Aktivierung von hepatischen Sternzellen, die zu einer vermehrten Fibronectin-Produktion führt, als auch eine verstärkte Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen aus dem Knochenmark. Diese Prozesse waren abhängig von MIF-Spiegeln in den PDAC-abgeleiteten Exosomen, die, verglichen mit dem MIF-Gehalt in Exosomen von gesunden Kontrolltieren, bereits im PanIN-Stadium erhöht waren (Costa-Silva et al., 2015). Dies deutet darauf hin, dass in der Lebermikroumgebung schon in einer frühen Phase der Tumorentstehung Veränderungen hervorgerufen werden, die die Ansiedlung von DTCs begünstigen. In einer Studie, in der ein humanes *ex vivo*-System verwendet wurde, konnten Dioufa et al. zeigen, dass Exosomen einer Brustkrebs-Zelllinie zwar die Ansiedlung dieser Zellen in einer experimentell hergestellten dreidimensionalen hepatischen Umgebung erleichterten, die Proliferation dieser Zellen jedoch nach Ansiedlung

vermindert war, was sich auf eine verstärkte Dormanz der Tumorzellen zurückführen ließ (Dioufa et al., 2017). Die Gruppe konnte zusätzlich zeigen, dass auch Exosomen aus der hepatischen Nische einen Einfluss auf die DTCs hatten. Die hepatische Umgebung rief einen Anstieg der E-Cadherin-Expression in unterschiedlichen Mamma- und Prostatakarzinom-Zelllinien hervor und trug so ebenfalls zu einer erfolgreichen Ansiedlung der Tumorzellen bei, indem Invasions- und Proliferationseigenschaften dieser Zellen beeinflusst wurden (Dioufa et al., 2017). Diese Studie verdeutlicht die vielfältigen Interaktionen von Zellen und weiteren Faktoren, die im komplexen Prozess der Metastasierung eine Rolle spielen und auch die Limitation eines Kokultursystems, wie es in der vorliegenden Studie verwendet wurde.

5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Das PDAC besitzt mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % eine der schlechtesten Prognosen maligner Erkrankungen. Ein Grund dafür ist die frühe Entstehung von Metastasen in der Leber, die oft der Detektion des PDAC vorausgeht, sodass vielen Patienten nur die Möglichkeit einer palliativen Therapie bleibt.

In dieser Studie konnte in einem *in vitro*-Kokulturmodell gezeigt werden, dass die hepatische Umgebung PDEZ in ihren Wachstums-, EMT- und CSC-Eigenschaften beeinflusst. Selbst physiologische Bedingungen in der Leber bewirkten Veränderungen in der Ausprägung von CSC-Charakteristika und Differenzierung von prämaligen und malignen PDEZ, wobei maligne PDEZ durch eine höhere Autonomie von den Einflüssen des hepatischen Milieus gekennzeichnet waren. Die Charakterisierung von PDEZ unterschiedlicher Differenzierung ergab ein erhöhtes tumorigenes Potential von Holoklon-Zellen, die als eher undifferenziert gelten, welches mit einer hohen Expression des CSC-Markers Nestin und einem mesenchymalen Phänotyp assoziiert war. Die siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin führte zu der verstärkten Ausbildung eines differenzierteren Phänotyps (Paraklon) sowie zur Modulation der EMT-Marker-Expression. Die Blockierung von TNF- α durch Etanercept ging mit einem leicht verminderten mesenchymalen Phänotyp und zusätzlich mit einer verminderter Expression der CSC-Marker Nestin und Nanog einher. Auch wenn TNF- α nicht der einzige Faktor zu sein scheint, der die EMT-Eigenschaften dieser PDEZ beeinflusst, suggerieren diese Daten dennoch einen Zusammenhang zwischen CSC- und EMT-Eigenschaften von PDEZ.

Ein Faktor, der in diesem Modell der Metastasenbildung außer Acht gelassen wurde, ist der Einfluss des Immunsystems. In Bezug auf Makrophagen konnten Nielsen et al. bereits zeigen, dass Metastasen-assoziierte Makrophagen durch die Sekretion von Granulin die Aktivierung von HSCs zu HMFs fördern, die wiederum durch die Sekretion von Periostin fibrotische Bedingungen und damit die Bildung von Lebermetastasen in einem PDAC-Mausmodell begünstigen (Nielsen et al., 2016). Inwieweit dies die DTCs in ihrem CSC- und EMT-Potential beeinflusst, bleibt dabei offen. Nicht nur in unserer Arbeitsgruppe konnten jedoch bereits Effekte von beispielsweise CD4-positiven T-Zellen oder Tumor-assoziierten Makrophagen auf die EMT-Induktion von PDEZ nachgewiesen werden (Goebel et al., 2015; Helm et al., 2014), sodass auch Untersuchungen der Wirkung dieser Immunzellen auf die Bildung von Lebermetastasen interessant wären.

In der Studie von Lenk et al. war eine physiologische hepatische Mikroumgebung mit einem verstärkt dormanten Phänotyp von PDEZ assoziiert, wohingegen inflammatorische Bedingungen mit erhöhten Wachstumsraten und vermehrter Tumor- und Metastasenbildung einhergingen (Lenk et al., 2017). Auch wenn zelluläre Dormanz und *stemness* sich durch ähnliche Eigenschaften kennzeichnen (Ghajar, 2015), ist bislang nicht geklärt, inwieweit der dormante Phänotyp von disseminierten PDEZ mit dem CSC-Phänotyp assoziiert ist. Diese Frage stand nicht im Vordergrund dieser Studie und bedarf weiterer Untersuchungen, insbesondere, da Erkenntnisse aus einem Modell des B-Zell-Lymphoms auf Zusammenhänge hindeuten. In diesem Mausmodell des B-Zell-Lymphoms wurden Tumorzellen, die sich in einem Chemotherapie-induzierten Seneszenz-Stadium befanden, mit erhöhtem CSC-Potential assoziiert und wiesen nach Wiederaufnahme des Zellzyklus *in vivo* ein erhöhte Tumorigenität auf als Zellen, die zuvor keiner Seneszenz unterlegen waren (Milanovic et al., 2017).

Unter der Annahme, dass ähnliche Prozesse bei der Rezidiv- und Metastasenbildung im PDAC ablaufen, stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit dieser Studie und es kann folgende Hypothese zum Auswachsen von Lebermetastasen des PDAC postuliert werden: Gelangen prä-maligne oder maligne PDEZ in die Leber, in der physiologische Bedingungen herrschen, kennzeichnen sich diese PDEZ durch ein hohes CSC-Potential und eine hohe Resistenz gegenüber Standardchemotherapeutika sowie durch einen verstärkt dormanten Phänotyp und eine geringe Proliferationsrate. Kommt es zu entzündlichen Veränderungen in der Lebermikroumgebung, gehen diese mit einem verstärkten Wachstumspotential der PDEZ und schließlich der Metastasenbildung einher.

Insgesamt trägt die vorliegende Studie zu einem besseren Verständnis des Einflusses der hepatischen Mikroumgebung auf disseminierte PDEZ, insbesondere bezüglich ihrer CSC- und EMT-Eigenschaften bei. Selbst physiologische Bedingungen in der Leber bewirken Veränderungen in der Ausprägung von CSC-Charakteristika und Differenzierung von prämaligen und malignen PDEZ und beeinflussen damit die Ausbildung von Metastasen. Dies verdeutlicht wie wichtig eine frühe Diagnose des PDAC und disseminierter Zellen für eine bessere Therapierbarkeit und somit die Bekämpfung dieser Erkrankung ist.

Literaturverzeichnis

Adamska, A., Domenichini, A. & Falasca, M. (2017). Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1338–1380.

Ahn, K.S., Hwang, J.Y., Han, H.-S., Kim, S.T., Hwang, I. & Chun, Y.-O. (2018). The impact of acute inflammation on progression and metastasis in pancreatic cancer animal model. *Surgical Oncology* 27, 61–69.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. & Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3983–3988.

Allen, P.J., Kuk, D., Fernandez-Del Castillo, C., Basturk, O., Wolfgang, C.L., Cameron, J.L., Lillemoe, K.D., Ferrone, C.R., Morales-Oyarvide, V., He, J., et al. (2017). Multi-institutional validation study of the American Joint Commission on Cancer (8th edition) changes for T and N staging in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Annals of Surgery* 265, 185–191.

Andriani, F., Bertolini, G., Facchinetti, F., Baldoli, E., Moro, M., Casalini, P., Caserini, R., Milione, M., Leone, G., Pelosi, G., et al. (2016). Conversion to stem-cell state in response to microenvironmental cues is regulated by balance between epithelial and mesenchymal features in lung cancer cells. *Molecular Oncology* 10, 253–271.

Ansari, D., Friess, H., Bauden, M., Samnegård, J. & Andersson, R. (2018). Pancreatic cancer: disease dynamics, tumor biology and the role of the microenvironment. *Oncotarget* 9, 6644–6651.

Aponte, P.M. & Caicedo, A. (2017). Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells International* 2017, 5619472.

Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L.D., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V, Brosens, L.A.A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R.H., et al. (2015). A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *The American Journal of Surgical Pathology* 39, 1730–1741.

Battle, E. & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine* 23, 1124–1134.

Beaver, C.M., Ahmed, A. & Masters, J.R. (2014). Clonogenicity: holoclones and meroclones contain stem cells. *PLOS ONE* 9, e89834.

- Becker, A.E., Hernandez, Y.G., Frucht, H. & Lucas, A.L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World Journal of Gastroenterology* 20, 11182–11198.
- Beerling, E., Seinstra, D., de Wit, E., Kester, L., van der Velden, D., Maynard, C., Schäfer, R., van Diest, P., Voest, E., van Oudenaarden, A., et al. (2016). Plasticity between epithelial and mesenchymal states unlinks EMT from metastasis-enhancing stem cell capacity. *Cell Reports* 14, 2281–2288.
- Bilimoria, K.Y., Bentrem, D.J., Ko, C.Y., Ritchey, J., Stewart, A.K., Winchester, D.P. & Talamonti, M.S. (2007). Validation of the 6th edition AJCC pancreatic cancer staging system. *Cancer* 110, 738–744.
- Bonnet, D. & Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 3, 730–737.
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D.T., Petersen, G., Bracci, P.M., Ji, B.T., Negri, E., Li, D., Risch, H.A., Olson, S.H., et al. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of Oncology* 23, 1880–1888.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R. & Kirchner, T. (2001). Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10356–10361.
- Brodth, P. (2016). Role of the microenvironment in liver metastasis: from pre- to prometastatic niches. *Clinical Cancer Research* 22, 5971–5982.
- van den Broeck, A., Sergeant, G., Ectors, N., van Steenberghe, W., Aerts, R. & Topal, B. (2009). Patterns of recurrence after curative resection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *European Journal of Surgical Oncology* 35, 600–604.
- Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., et al. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 15, 2403–2413.

Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., et al. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 7950–7955.

Chaffer, C.L., Marjanovic, N.D., Lee, T., Bell, G., Kleer, C.G., Reinhardt, F., D'Alessio, A.C., Young, R.A. & Weinberg, R.A. (2013). Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 154, 61–74.

Chaffer, C.L., San Juan, B.P., Lim, E. & Weinberg, R.A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 35, 645–654.

Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer* 2, 563–572.

Chao, Y., Shepard, C. & Wells, A. (2010). Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer* 9, 179–196.

Chao, Y., Wu, Q., Acquafondata, M., Dhir, R. & Wells, A. (2012a). Partial mesenchymal to epithelial reverting transition in breast and prostate cancer metastases. *Cancer Microenvironment* 5, 19–28.

Chao, Y., Wu, Q., Shepard, C. & Wells, A. (2012b). Hepatocyte induced re-expression of E-cadherin in breast and prostate cancer cells increases chemoresistance. *Clinical and Experimental Metastasis* 29, 39–50.

Cheung, K.J., Padmanaban, V., Silvestri, V., Schipper, K., Cohen, J.D., Fairchild, A.N., Gorin, M.A., Verdone, J.E., Pienta, K.J., Bader, J.S., et al. (2016). Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E854–E863.

Chou, Y.-H., Khuon, S., Herrmann, H. & Goldman, R.D. (2003). Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Molecular Biology of the Cell* 14, 1468–1478.

Cid-Arregui, A. & Juarez, V. (2015). Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 21, 9297–9316.

Clark, A.M., Ma, B., Taylor, D.L., Griffith, L. & Wells, A. (2016). Liver metastases: microenvironments and ex-vivo models. *Experimental Biology and Medicine* 241, 1639–1652.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L. & Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Research* 66, 9339–9344.

De Cock, J.M., Shibue, T., Dongre, A., Keckesova, Z., Reinhardt, F. & Weinberg, R.A. (2016). Inflammation triggers Zeb1-dependent escape from tumor latency. *Cancer Research* 76, 6778–6784.

Collisson, E.A. & Maitra, A. (2017). Pancreatic cancer genomics 2.0: profiling metastases. *Cancer Cell* 31, 309–310.

Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., et al. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine* 364, 1817–1825.

Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., et al. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology* 17, 816–826.

Coulouarn, C., Corlu, A., Glaise, D., Guénon, I., Thorgeirsson, S.S. & Clément, B. (2012). Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 72, 2533–2542.

Dalla Pozza, E., Dando, I., Biondani, G., Brandi, J., Costanzo, C., Zoratti, E., Fassan, M., Boschi, F., Melisi, D., Cecconi, D., et al. (2015). Pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines display a plastic ability to bi-directionally convert into cancer stem cells. *International Journal of Oncology* 46, 1099–1108.

Dauer, P., Nomura, A., Saluja, A. & Banerjee, S. (2017). Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: neighborhood matters. *Pancreatology* 17, 7–12.

David, J.M. & Rajasekaran, A.K. (2012). Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Research* 72, 2917–2923.

Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A. & Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39, 425–435.

- Dioufa, N., Clark, A.M., Ma, B., Beckwitt, C.H. & Wells, A. (2017). Bi-directional exosome-driven intercommunication between the hepatic niche and cancer cells. *Molecular Cancer* 16, 172–185.
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C. & Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Research International* 2014, 474905.
- Egberts, J.-H., Schniewind, B., Sipos, B., Hinz, S., Kalthoff, H. & Tepel, J. (2007). Superiority of extended neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine in pancreatic cancer: a comparative analysis in a clinically adapted orthotopic xenotransplantation model in SCID beige mice. *Cancer Biology & Therapy* 6, 1238–1243.
- Egberts, J.-H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., et al. (2008). Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Research* 68, 1443–1450.
- Ellenrieder, V., König, A. & Seufferlein, T. (2016). Current standard and future perspectives in first- and second-line treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Digestion* 94, 44–49.
- Erkan, M., Michalski, C.W., Rieder, S., Reiser-Erkan, C., Abiatari, I., Kolb, A., Giese, N.A., Esposito, I., Friess, H. & Kleeff, J. (2008). The activated stroma index is a novel and independent prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 6, 1155–1161.
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G. & Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* 111, 817–822.
- Eveno, C., Hainaud, P., Rampanou, A., Bonnin, P., Bakhouch, S., Dupuy, E., Contreres, J.-O. & Pocard, M. (2015). Proof of prometastatic niche induction by hepatic stellate cells. *Journal of Surgical Research* 194, 496–504.
- Falschlehner, C., Schaefer, U. & Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127, 145–154.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 3, 453–458.
- Fischedick, G., Wu, G., Adachi, K., Araúzo-Bravo, M.J., Greber, B., Radstaak, M., Köhler, G., Tapia, N., Iacone, R., Anastassiadis, K., et al. (2014). Nanog induces hyperplasia without initiating tumors. *Stem Cell Research* 13, 300–315.

- Fokas, E., O'Neill, E., Gordon-Weeks, A., Mukherjee, S., McKenna, W.G. & Muschel, R.J. (2015). Pancreatic ductal adenocarcinoma: from genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta* 1855, 61–82.
- Franken, N.A.P., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1, 2315–2319.
- Frese, K.K., Neesse, A., Cook, N., Bapiro, T.E., Lolkema, M.P., Jodrell, D.I. & Tuveson, D.A. (2012). nab-Paclitaxel potentiates gemcitabine activity by reducing cytidine deaminase levels in a mouse model of pancreatic cancer. *Cancer Discovery* 2, 260–269.
- Friedman, S.L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews* 88, 125–172.
- Fulawka, L., Donizy, P. & Halon, A. (2014). Cancer stem cells - the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biological Research* 47, 66.
- Gao, D., Joshi, N., Choi, H., Ryu, S., Hahn, M., Catena, R., Sadik, H., Argani, P., Wagner, P., Vahdat, L.T., et al. (2012). Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. *Cancer Research* 72, 1384–1394.
- Gao, X., Zhang, M., Tang, Y. & Liang, X. (2017). Cancer cell dormancy: mechanisms and implications of cancer recurrence and metastasis. *OncoTargets and Therapy* 10, 5219–5228.
- Gapstur, S.M., Jacobs, E.J., Deka, A., McCullough, M.L., Patel, A. V. & Thun, M.J. (2011). Association of alcohol intake with pancreatic cancer mortality in never smokers. *Archives of Internal Medicine* 171, 444–451.
- Gawlik-Rzemieniewska, N. & Bednarek, I. (2016). The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 17, 1–10.
- Geerts, A. (2001). History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease* 21, 311–336.
- Geismann, C., Morscheck, M., Koch, D., Bergmann, F., Ungefroren, H., Arlt, A., Tsao, M.-S., Bachem, M.G., Altevogt, P., Sipos, B., et al. (2009). Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor β 1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Research* 69, 4517–4526.

- Ghajar, C.M. (2015). Metastasis prevention by targeting the dormant niche. *Nature Reviews Cancer* 15, 238–247.
- Giovannetti, E., van der Borden, C.L., Frampton, A.E., Ali, A., Firuzi, O. & Peters, G.J. (2017). Never let it go: stopping key mechanisms underlying metastasis to fight pancreatic cancer. *Seminars in Cancer Biology* 44, 43–59.
- Goebel, L., Grage-Griebenow, E., Gorys, A., Helm, O., Genrich, G., Lenk, L., Wesch, D., Ungefroren, H., Freitag-Wolf, S., Sipos, B., et al. (2015). CD4+ T cells potently induce epithelial-mesenchymal-transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells - novel implications of CD4+ T cells in pancreatic cancer development. *Onc Immunology* 4, e1000083.
- Gourgou-Bourgade, S., Bascoul-Mollevi, C., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Boige, V., et al. (2013). Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* 31, 23–29.
- Gradiz, R., Silva, H.C., Carvalho, L., Botelho, M.F. & Mota-Pinto, A. (2016). MIA PaCa-2 and PANC-1 – pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Scientific Reports* 6, 21648.
- Greaves, M. & Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313.
- Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G. & Goodall, G.J. (2008). MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 7, 3112–3117.
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R. & Fanger, N.A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1343–1354.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R. & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.
- Groot, V.P., Rezaee, N., Wu, W., Cameron, J.L., Fishman, E.K., Hruban, R.H., Weiss, M.J., Zheng, L., Wolfgang, C.L. & He, J. (2018). Patterns, timing, and predictors of recurrence following pancreatectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Annals of Surgery* 267, 936–945.

- Grünwald, B., Harant, V., Schaten, S., Frühschütz, M., Spallek, R., Höchst, B., Stutzer, K., Berchtold, S., Erkan, M., Prokopchuk, O., et al. (2016). Pancreatic premalignant lesions secrete tissue inhibitor of metalloproteinases-1, which activates hepatic stellate cells via CD63 signaling to create a premetastatic niche in the liver. *Gastroenterology* *151*, 1011–1024.
- Gu, T.-T., Liu, S.-Y. & Zheng, P.-S. (2012). Cytoplasmic NANOG-positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *American Journal of Pathology* *181*, 652–661.
- Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P. & Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* *11*, 291–302.
- Gukovsky, I., Li, N., Todoric, J., Gukovskaya, A. & Karin, M. (2013). Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* *144*, 1199–1209.
- Gupta, P.B., Chaffer, C.L. & Weinberg, R.A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nature Medicine* *15*, 1010–1012.
- Hagio, M., Matsuda, Y., Suzuki, T. & Ishiwata, T. (2013). Nestin regulates epithelial-mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Molecular and Clinical Oncology* *1*, 83–87.
- Han, L., Shi, S., Gong, T., Zhang, Z. & Sun, X. (2013). Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* *3*, 65–75.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harper, K.L., Sosa, M.S., Entenberg, D., Hosseini, H., Cheung, J.F., Nobre, R., Avivar-Valderas, A., Nagi, C., Girnius, N., Davis, R.J., et al. (2016). Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2+ mammary cancer. *Nature* *540*, 588–592.
- Headley, M.B., Bins, A., Nip, A., Roberts, E.W., Looney, M.R., Gerard, A. & Krummel, M.F. (2016). Visualization of the immediate immune responses to pioneer metastatic cells in the lung. *Nature* *531*, 513–517.

- van Heek, N.T., Meeker, A.K., Kern, S.E., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J.A., Hicks, J.L., Wilentz, R.E., Goggins, M.G., et al. (2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *American Journal of Pathology* 161, 1541–1547.
- Helm, O., Held-Feindt, J., Grage-Griebenow, E., Reiling, N., Ungefroren, H., Vogel, I., Krüger, U., Becker, T., Ebsen, M., Röcken, C., et al. (2014). Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *International Journal of Cancer* 135, 843–861.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J. & Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1, 313–323.
- Herreros-Villanueva, M., Bujanda, L., Billadeau, D.D. & Zhang, J.-S. (2014). Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 20, 2247–2254.
- Hess, K.R., Varadhachary, G.R., Taylor, S.H., Wei, W., Raber, M.N., Lenzi, R. & Abbruzzese, J.L. (2006). Metastatic patterns in adenocarcinoma. *Cancer* 106, 1624–1633.
- Hessmann, E., Johnsen, S.A., Siveke, J.T. & Ellenrieder, V. (2017). Epigenetic treatment of pancreatic cancer: is there a therapeutic perspective on the horizon? *Gut* 66, 168–179.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450.
- Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M., et al. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine* 369, 1691–1703.
- Hosseini, H., Obradović, M.M.S., Hoffmann, M., Harper, K.L., Sosa, M.S., Werner-Klein, M., Nanduri, L.K., Werno, C., Ehrl, C., Maneck, M., et al. (2016). Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature* 540, 552–558.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Klöppel, G., Longnecker, D.S., et al. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia - a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American Journal of Surgical Pathology* 25, 579–586.

- Hruban, R.H., Maitra, A. & Goggins, M. (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 1, 306–316.
- Hu, Q.-P., Kuang, J.-Y., Yang, Q.-K., Bian, X.-W. & Yu, S.-C. (2016). Beyond a tumor suppressor: soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. *International Journal of Cancer* 138, 2804–2812.
- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F. & Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer* 92, 2076–2083.
- Hwang, R.F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K.D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D.B. & Logsdon, C.D. (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Research* 68, 918–926.
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A.B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's Archives of Surgery* 393, 535–545.
- Jeter, C.R., Yang, T., Wang, J., Chao, H.-P. & Tang, D.G. (2015). NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions. *Stem Cells* 33, 2381–2390.
- Kalluri, R. & Weinberg, R. a (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119, 1420–1428.
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.-M., Yu, J., Borges, M., Hruban, R.H., Maitra, A., Kinzler, K., Vogelstein, B., et al. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730–733.
- Kang, N., Gores, G.J. & Shah, V.H. (2011). Hepatic stellate cells: partners in crime for liver metastases? *Hepatology* 54, 707–713.
- Kawamoto, M., Ishiwata, T., Cho, K., Uchida, E., Korc, M., Naito, Z. & Tajiri, T. (2009). Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Human Pathology* 40, 189–198.
- Kim, H.S., Yoo, S.Y., Kim, K.T., Park, J.T., Kim, H.J. & Kim, J.C. (2012). Expression of the stem cell markers CD133 and Nestin in pancreatic ductal adenocarcinoma and clinical relevance. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 5, 754–761.
- Kim, Y., Han, D., Min, H., Jin, J., Yi, E.C. & Kim, Y. (2014). Comparative proteomic profiling of pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Molecules and Cells* 37, 888–898.

- Kirkegård, J., Mortensen, F.V. & Cronin-Fenton, D. (2017). Chronic pancreatitis and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology* 112, 1366–1372.
- Kise, K., Kinugasa-Katayama, Y. & Takakura, N. (2016). Tumor microenvironment for cancer stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 99, 197–205.
- Kleeff, J., Beckhove, P., Esposito, I., Herzig, S., Huber, P.E., Löhr, J.M. & Friess, H. (2007). Pancreatic cancer microenvironment. *International Journal of Cancer* 121, 699–705.
- Klingmüller, U., Bauer, A., Bohl, S., Nickel, P.J., Breitkopf, K., Dooley, S., Zellmer, S., Kern, C., Merfort, I., Sparna, T., et al. (2006). Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways. *IEE Proceedings: Systems Biology* 153, 433–447.
- Krebs, A.M., Mitschke, J., Losada, M.L., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, D., Reichardt, W., Bronsert, P., et al. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology* 19, 518–529.
- Krebs in Deutschland für 2013/2014 (2017). 11. Auflage. Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hgg). Berlin.
- Krupkova, O., Loja, T., Zambo, I. & Veselska, R. (2010). Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma* 57, 291–298.
- Kure, S., Matsuda, Y., Hagio, M., Ueda, J., Naito, Z. & Ishiwata, T. (2012). Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas. *International Journal of Oncology* 41, 1314–1324.
- Labelle, M. & Hynes, R.O. (2012). The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discovery* 2, 1091–1099.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R. & Weinberg, R.A. (2016). Emerging biological principles of metastasis. *Cell* 168, 670–691.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2013). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 1.0. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Hgg).
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. & McKay, R.D.G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.

- Lenk, L. (2017). Metastasis of pancreatic cancer: influence of the hepatic microenvironment on the growth behavior of pancreatic ductal epithelial cells. *Dissertation. Christian-Albrechts-Universität Zu Kiel*.
- Lenk, L., Pein, M., Will, O., Gomez, B., Viol, F., Hauser, C., Egberts, J.-H., Gundlach, J.-P., Helm, O., Tiwari, S., et al. (2017). The hepatic microenvironment essentially determines tumor cell dormancy and metastatic outgrowth of pancreatic ductal adenocarcinoma. *OncImmunity* 7, e1368603.
- Lenz, J., Karasek, P., Jarkovsky, J., Muckova, K., Dite, P., Kala, Z., Veselska, R. & Hermanova, M. (2011). Clinicopathological correlations of Nestin expression in surgically resectable pancreatic cancer including an analysis of perineural invasion. *Journal of Gastrointestinal Liver Diseases* 20, 389–396.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F. & Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research* 67, 1030–1037.
- Li, C.W., Xia, W., Huo, L., Lim, S.O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.H., Yamaguchi, H., Yang, N.K., Ding, Q., et al. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Research* 72, 1290–1300.
- Li, H., Chen, X., Calhoun-Davis, T., Claypool, K. & Tang, D.G. (2008). PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Research* 68, 1820–1825.
- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M. & Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer* 15, 741–747.
- Liu, Y. & Cao, X. (2016). Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell* 30, 668–681.
- Lu, X., Mazur, S.J., Lin, T., Appella, E. & Xu, Y. (2014). The pluripotency factor Nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 33, 2655–2664.
- Lu, Y., Zhu, H., Shan, H., Lu, J., Chang, X., Li, X., Lu, J., Fan, X., Zhu, S., Wang, Y., et al. (2013). Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Letters* 340, 113–123.

- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkvliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F. & Groom, A.C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology* 153, 865–873.
- Maddipati, R. & Stanger, B.Z. (2015). Pancreatic cancer metastases harbor evidence of polyclonality. *Cancer Discovery* 5, 1087–1097.
- Makohon-Moore, A.P., Zhang, M., Reiter, J.G., Bozic, I., Allen, B., Kundu, D., Chatterjee, K., Wong, F., Jiao, Y., Kohutek, Z.A., et al. (2017). Limited heterogeneity of known driver gene mutations among the metastases of individual patients with pancreatic cancer. *Nature Genetics* 49, 358–366.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715.
- Matsuda, Y., Naito, Z., Kawahara, K., Nakazawa, N., Korc, M. & Ishiwata, T. (2011). Nestin is a novel target for suppressing pancreatic cancer cell migration, invasion and metastasis. *Cancer Biology & Therapy* 11, 512–523.
- Matsuda, Y., Yoshimura, H., Ueda, J., Naito, Z., Korc, M. & Ishiwata, T. (2014). Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R γ (null) (NOG) mice. *American Journal of Pathology* 184, 674–685.
- Matsuda, Y., Ishiwata, T., Yoshimura, H., Yamashita, S., Ushijima, T. & Arai, T. (2015). Systemic administration of small interfering RNA targeting human Nestin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. *Pancreas* 45, 93–100.
- Matsuda, Y., Ishiwata, T., Yoshimura, H., Yamahatsu, K., Minamoto, T. & Arai, T. (2017). Nestin phosphorylation at threonines 315 and 1299 correlates with proliferation and metastasis of human pancreatic cancer. *Cancer Science* 108, 354–361.
- McDonald, O.G., Li, X., Saunders, T., Tryggvadottir, R., Mentch, S.J., Warmoes, M.O., Word, A.E., Carrer, A., Salz, T.H., Natsume, S., et al. (2017). Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis. *Nature Genetics* 49, 367–376.
- Milanovic, M., Fan, D.N.Y., Belenki, D., Däbritz, J.H.M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J.R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I.A., et al. (2017). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* 553, 96–100.

- Mohr, A., Yu, R. & Zwacka, R.M. (2015). TRAIL-receptor preferences in pancreatic cancer cells revisited: both TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have a licence to kill. *BMC Cancer* 15, 494–504.
- Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 25, 1960–1966.
- Moore, P.S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F.X., Lemoine, N.R., Gress, T., Bassi, C., Kloppel, G., Kalthoff, H., et al. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines - analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Archiv* 439, 798–802.
- Mukherjee, S., Manna, A., Bhattacharjee, P., Mazumdar, M., Saha, S., Chakraborty, S., Guha, D., Adhikary, A., Jana, D., Gorain, M., et al. (2016). Non-migratory tumorigenic intrinsic cancer stem cells ensure breast cancer metastasis by generation of CXCR4+ migrating cancer stem cells. *Oncogene* 35, 4937–4948.
- Nassar, D. & Blanpain, C. (2016). Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11, 47–76.
- Nesse, A., Frese, K.K., Bapiro, T.E., Nakagawa, T., Sternlicht, M.D., Seeley, T.W., Pilarsky, C., Jodrell, D.I., Spong, S.M. & Tuveson, D.A. (2013). CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 12325–12330.
- Nesse, A., Krug, S., Gress, T.M., Tuveson, D.A. & Michl, P. (2014). Emerging concepts in pancreatic cancer medicine: targeting the tumor stroma. *OncoTargets and Therapy* 7, 33–43.
- Nesse, A., Algül, H., Tuveson, D.A. & Gress, T.M. (2015). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm. *Gut* 64, 1476–1484.
- Neradil, J. & Veselska, R. (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Science* 106, 803–811.
- Nielsen, S.R., Quaranta, V., Linford, A., Emeagi, P., Rainer, C., Santos, A., Ireland, L., Sakai, T., Sakai, K., Kim, Y.-S., et al. (2016). Macrophage-secreted granulins supports pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nature Cell Biology* 18, 549–560.

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A. & Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45.

Ohike, N., Sato, M., Hisayuki, T., Imataka, H., Sato, S., Wada, Y., Saito, K., Takahashi, M., Tajiri, T., Kunimura, T., et al. (2007). Immunohistochemical analysis of Nestin and c-kit and their significance in pancreatic tumors. *Pathology International* 57, 589–593.

Oldfield, L.E., Connor, A.A. & Gallinger, S. (2017). Molecular events in the natural history of pancreatic cancer. *Trends in Cancer* 3, 336–346.

Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457–1461.

Ott, C., Heinmöller, E., Gaumann, A., Schölmerich, J. & Klebl, F. (2007). Intraepitheliale Neoplasien (PanIN) und intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) des Pankreas als Vorläufer des Pankreaskarzinoms. *Medizinische Klinik* 102, 127–135.

Özdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.-C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S. V, et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25, 719–734.

Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 133, 571–573.

Park, S.-M., Gaur, A.B., Lengyel, E. & Peter, M.E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development* 22, 894–907.

Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J.G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., et al. (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25, 1696–1708.

Pelosi, E., Castelli, G. & Testa, U. (2017). Pancreatic cancer: molecular characterization, clonal evolution and cancer stem cells. *Biomedicines* 5, 65.

Petersen, G.M. (2016). Familial pancreatic cancer. *Seminars in Oncology* 43, 548–553.

- Philip, B., Roland, C.L., Daniluk, J., Liu, Y., Chatterjee, D., Gomez, S.B., Ji, B., Huang, H., Wang, H., Fleming, J.B., et al. (2013). A high-fat diet activates oncogenic Kras and COX2 to induce development of pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Gastroenterology* 145, 1449–1458.
- Polyak, K. & Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer* 9, 265–273.
- Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 50, 151–162.
- Proell, V., Mikula, M., Fuchs, E. & Mikulits, W. (2005). The plasticity of p19ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1744, 76–87.
- Proell, V., Carmona-Cuenca, I., Murillo, M.M., Huber, H., Fabregat, I. & Mikulits, W. (2007). TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comparative Hepatology* 6, 1.
- Qian, J., Niu, J., Li, M., Chiao, P.J. & Tsao, M.-S. (2005). In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Research* 65, 5045–5053.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M. & Matrisian, L.M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Research* 74, 2913–2921.
- Rahman, F., Cotterchio, M., Cleary, S.P. & Gallinger, S. (2015). Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PLOS ONE* 10, e0124489.
- Rahn, S., Zimmermann, V., Viol, F., Knaack, H., Stemmer, K., Peters, L., Lenk, L., Ungefroren, H., Saur, D., Schäfer, H., et al. (2018). Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Letters* 415, 129–150.
- Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Morselli-Labate, A.M., Maisonneuve, P. & Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 24, 349–358.
- Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Jennifer, M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Anil, K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148, 349–361.

- Rhim, A.D., Oberstein, P.E., Thomas, D.H., Mirek, E.T., Palermo, C.F., Sastra, S.A., Dekleva, E.N., Saunders, T., Becerra, C.P., Tattersall, I.W., et al. (2014a). Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25, 735–747.
- Rhim, A.D., Thege, F.I., Santana, S.M., Lannin, T.B., Saha, T.N., Tsai, S., Maggs, L.R., Kochman, M.L., Ginsberg, G.G., Lieb, J.G., et al. (2014b). Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology* 146, 647–651.
- Rowinsky, E.K. (2005). Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *Journal of Clinical Oncology* 23, 9394–9407.
- Sahlgren, C.M., Mikhailov, A., Vaittinen, S., Pallari, H.-M., Kalimo, H., Pant, H.C. & Eriksson, J.E. (2003). Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Molecular and Cellular Biology* 23, 5090–5106.
- Sahlgren, C.M., Pallari, H.-M., He, T., Chou, Y.-H., Goldman, R.D. & Eriksson, J.E. (2006). A Nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO Journal* 25, 4808–4819.
- Sato, N., Fukushima, N., Hruban, R.H. & Goggins, M. (2008). CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Modern Pathology* 21, 238–244.
- Schäfer, H., Geismann, C., Heneweer, C., Egberts, J.-H., Korniienko, O., Kiefel, H., Moldenhauer, G., Bachem, M.G., Kalthoff, H., Altevogt, P., et al. (2012a). Myofibroblast-induced tumorigenicity of pancreatic ductal epithelial cells is L1CAM dependent. *Carcinogenesis* 33, 84–93.
- Schäfer, H., Dieckmann, C., Korniienko, O., Moldenhauer, G., Kiefel, H., Salnikov, A., Krüger, A., Altevogt, P. & Sebens, S. (2012b). Combined treatment of L1CAM antibodies and cytostatic drugs improve the therapeutic response of pancreatic and ovarian carcinoma. *Cancer Letters* 319, 66–82.
- Schniewind, B., Christgen, M., Kurdow, R., Haye, S., Kremer, B., Kalthoff, H. & Ungefroren, H. (2004). Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *International Journal of Cancer* 109, 182–188.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., et al. (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Research* 57, 3126–3130.

- Schwitalla, S., Fingerle, A.A., Cammareri, P., Nebelsiek, T., Göktuna, S.I., Ziegler, P.K., Canli, O., Heijmans, J., Huels, D.J., Moreaux, G., et al. (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152, 25–38.
- Sebens Muerköster, S., Kötteritzsch, J., Geismann, C., Gast, D., Kruse, M.-L., Altevogt, P., Fölsch, U.R. & Schäfer, H. (2009). α 5-integrin is crucial for L1CAM-mediated chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma. *International Journal of Oncology* 34, 243–253.
- Shipitsin, M., Campbell, L.L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhim, R., Hu, M., et al. (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 11, 259–273.
- Shulman, M. & Nahmias, Y. (2013). Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. *Methods in Molecular Biology* 945, 287–302.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66, 7–30.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, 7–30.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. & Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.
- Skoda, J., Hermanova, M., Loja, T., Nemeč, P., Neradil, J., Karasek, P. & Veselska, R.Nie, D. (2016). Co-expression of cancer stem cell markers corresponds to a pro-tumorigenic expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *PLOS ONE* 11, e0159255.
- Sperti, C., Pasquali, C., Piccoli, A. & Pedrazzoli, S. (1997). Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World Journal of Surgery* 21, 195–200.
- Steele, C.W., Gill, N.A.K., Jamieson, N.B. & Carter, C.R. (2016). Targeting inflammation in pancreatic cancer: clinical translation. *World Journal of Gastrointestinal Oncology* 8, 380–388.
- Su, H.-T., Weng, C.-C., Hsiao, P.-J., Chen, L.-H., Kuo, T.-L., Chen, Y.-W., Kuo, K.-K. & Cheng, K.-H. (2013). Stem cell marker Nestin is critical for TGF- β 1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Research* 11, 768–779.

Sun, C., Sun, L., Jiang, K., Gao, D.-M., Kang, X.-N., Wang, C., Zhang, S., Huang, S., Qin, X., Li, Y., et al. (2013). NANOG promotes liver cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition through NODAL/SMAD3 signaling pathway. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 1099–1108.

Symowicz, J., Adley, B.P., Gleason, K.J., Johnson, J.J., Ghosh, S., Fishman, D.A., Hudson, L.G. & Stack, M.S. (2007). Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Research* 67, 2030–2039.

Talmadge, J.E. & Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research* 70, 5649–5469.

Tan, L., Sui, X., Deng, H. & Ding, M. (2011). Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. *PLOS ONE* 6, e23383.

Tang, B., Li, Y., Qi, G., Yuan, S., Wang, Z., Yu, S., Li, B. & He, S. (2015). Clinicopathological significance of CDKN2A promoter hypermethylation frequency with pancreatic cancer. *Scientific Reports* 5, 13563.

Tepel, J., Kruse, M.-L., Kapischke, M., Haye, S., Sipos, B., Kremer, B. & Kalthoff, H. (2006). Adjuvant treatment of pancreatic carcinoma in a clinically adapted mouse resection model. *Pancreatology* 6, 240–247.

Thiery, J.P. & Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 131–142.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J. & Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.

Trikudanathan, G., Philip, A., Dasanu, C.A. & Baker, W.L. (2011). Association between Helicobacter pylori infection and pancreatic cancer. A cumulative meta-analysis. *Journal of the Pancreas* 12, 26–31.

Trillsch, F., Kuerti, S., Eulenburg, C., Burandt, E., Woelber, L., Prieske, K., Eylmann, K., Oliveira-Ferrer, L., Milde-Langosch, K. & Mahner, S. (2016). E-Cadherin fragments as potential mediators for peritoneal metastasis in advanced epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 114, 207–212.

- Tsai, J.H., Donaher, J.L., Murphy, D.A., Chau, S. & Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725–736.
- Valastyan, S. & Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292.
- Valle, S., Martin-Hijano, L., Alcalá, S., Alonso-Nocelo, M. & Sainz Jr., B. (2018). The ever-evolving concept of the cancer stem cell in pancreatic cancer. *Cancers* 10, 33.
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C.A., Friess, H. & Büchler, M.W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* 91, 586–594.
- Wang, H., Wang, H.S., Zhou, B.H., Li, C.L., Zhang, F., Wang, X.F., Zhang, G., Bu, X.Z., Cai, S.H. & Du, J. (2013). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF- α requires AKT/GSK-3 β -mediated stabilization of Snail in colorectal cancer. *PLOS ONE* 8, e56664.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Benten, D. & Fehse, B. (2012). RGB marking with lentiviral vectors for multicolor clonal cell tracking. *Nature Protocols* 7, 839–849.
- Weiskirchen, R. & Tacke, F. (2014). Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* 3, 344–363.
- Wen, J., Park, J.Y., Park, K.H., Chung, H.W., Bang, S., Park, S.W. & Song, S.Y. (2010). Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis. *Pancreas* 39, 622–626.
- Wennerström, A.B., Bowitz-Lothe, I.M., Sandhu, V., Kure, E.H., Myklebost, O. & Munthe, E. (2014). Generation and characterisation of novel pancreatic adenocarcinoma xenograft models and corresponding primary cell lines. *PLOS ONE* 9, e103873.
- Wheeler, S.E., Clark, A.M., Taylor, D.P., Young, C.L., Pillai, V.C., Stolz, D.B., Venkataramanan, R., Lauffenburger, D., Griffith, L. & Wells, A. (2014). Spontaneous dormancy of metastatic breast cancer cells in an all human liver microphysiologic system. *British Journal of Cancer* 111, 2342–2350.
- Xie, D. & Xie, K. (2015). Pancreatic cancer stromal biology and therapy. *Genes and Diseases* 2, 133–143.

- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., et al. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 1114–1117.
- Yadav, D. & Lowenfels, A.B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144, 1252–1261.
- Yang, J. & Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell* 14, 818–829.
- Yang, X.H., Wu, Q.L., Yu, X.B., Xu, C.X., Ma, B.F., Zhang, X.M., Li, S.N., Lahn, B.T. & Xiang, A.P. (2008). Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *Journal of Clinical Pathology* 61, 467–473.
- Yates, C.C., Shepard, C.R., Stolz, D.B. & Wells, A. (2007). Co-culturing human prostate carcinoma cells with hepatocytes leads to increased expression of E-cadherin. *British Journal of Cancer* 96, 1246–1252.
- Yin, X., Zhang, B.-H., Zheng, S.-S., Gao, D.-M., Qiu, S.-J., Wu, W.-Z. & Ren, Z.-G. (2015). Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling. *Journal of Hematology & Oncology* 8, 23.
- Zellmer, S., Schmidt-Heck, W., Godoy, P., Weng, H., Meyer, C., Lehmann, T., Sparna, T., Schormann, W., Hammad, S., Kreutz, C., et al. (2010). Transcription factors ETF, E2F, and SP-1 are involved in cytokine-independent proliferation of murine hepatocytes. *Hepatology* 52, 2127–2136.
- Zhang, L., Jiao, M., Wu, K., Li, L., Zhu, G., Wang, X., He, D. & Wu, D. (2014). TNF- α induced epithelial mesenchymal transition increases stemness properties in renal cell carcinoma cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7, 4951–4958.
- Zhao, J., Li, J., Schlößer, H.A., Popp, F., Popp, M.C., Alakus, H., Jauch, K., Bruns, C.J. & Zhao, Y. (2017). Targeting cancer stem cells and their niche: current therapeutic implications and challenges in pancreatic cancer. *Stem Cells International* 2017, 6012810.
- Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V.S. & Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525–530.

Zhou, P., Li, B., Liu, F., Zhang, M., Wang, Q., Liu, Y., Yao, Y. & Li, D. (2017). The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer. *Molecular Cancer* 16, 52.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Überblick über die Durchführung der Mono- bzw. Kokultur von PDEZ mit hepatischen Stromazellen.....	39
Abbildung 2:	Hepatische Stromazellen beeinflussen das Wachstum von Panc1-Zellen nicht, bewirken jedoch einen Anstieg der H6c7-kras-Zellzahl.	55
Abbildung 3:	Hepatische Stromazellen haben keinen Einfluss auf den Anteil Ki67-positiver PDEZ.	56
Abbildung 4:	Hepatische Stromazellen haben keinen Einfluss auf die basale Apoptoserate der PDEZ.	57
Abbildung 5:	Hepatische Stromazellen beeinflussen das Ansprechen von Panc1-Zellen auf den endogenen Apoptosestimulus TRAIL nicht, während H6c7-kras-Zellen eine geringere Apoptoserate aufweisen.....	58
Abbildung 6:	Hepatische Stromazellen beeinflussen das Ansprechen von PDEZ nach Zytostatika-Behandlung kaum.	59
Abbildung 7:	Hepatische Stromazellen haben keinen Einfluss auf die Expression der EMT-Marker E-Cadherin, L1CAM und Vimentin.	61
Abbildung 8:	PDEZ weisen eine heterogene Verteilung von E-Cadherin und L1CAM auf, die durch hepatische Stromazellen kaum beeinflusst wird.	63
Abbildung 9:	Hepatische Stromazellen verringern das Invasionsvermögen von H6c7-kras-, jedoch nicht von Panc1-Zellen.	65
Abbildung 10:	Eine physiologische Mikroumgebung bewirkt einen Anstieg der Kolonienzahl von PDEZ im CFA.	66
Abbildung 11:	Hepatische Stromazellen bewirken einen Anstieg der Genexpression der CSC-Marker Nestin und Nanog in PDEZ.	68
Abbildung 12:	Schematischer Überblick über die Erzeugung von Holo-, Mero- und Paraklonen aus Einzelzellen zur weiteren Charakterisierung der Klonformen.	70
Abbildung 13:	Klone, die aus Einzelzellen expandiert wurden, bringen überwiegend Kolonien ihrer ursprünglichen Form hervor.	71
Abbildung 14:	CSC-Marker Nestin weist in Panc1-Holoklonen und Nanog in H6c7-kras-Meroklonen eine erhöhte Genexpression verglichen mit entsprechenden Paraklonen auf.	72

Abbildung 15: CSC-Marker Nestin weist in Panc1-Holoklonen eine erhöhte Expression verglichen mit entsprechenden Paraklonen auf.....	73
Abbildung 16: Sowohl die basale Caspase-Aktivität als auch das Ansprechen auf Apoptosestimuli unterscheiden sich bei Panc1-Para- und Holoklonen sowie H6c7-kras-Para- und Meroklonen.....	75
Abbildung 17: Unterschiedliche Klonformen haben keinen gegenseitigen Einfluss auf die Zellzahlen.....	77
Abbildung 18: Unterschiedliche Klonformen haben geringen gegenseitigen Einfluss auf die Koloniebildung.....	78
Abbildung 19: Unterschiedliche Klonformen haben keinen gegenseitigen Einfluss auf die Genexpression von CSC-Markern in Panc1-Klonen. Die CSC-Marker-Expression in H6c7-kras-Meroklonen ist in Gegenwart von Paraklonen verringert.....	79
Abbildung 20: Unterschiedliche Klonformen haben kaum gegenseitigen Einfluss auf die CSC-Marker-Expression.....	80
Abbildung 21: Panc1-Holoklone zeigen vermehrtes Tumorwachstum in vivo verglichen mit Panc1-Paraklonen.....	82
Abbildung 22: Tumore in Pankreas und Leber, die durch Panc1-Holoklon- und Paraklon-Zellen ausgelöst wurden, weisen Nestin-Expression auf.....	83
Abbildung 23: Tumore in Pankreas und Leber, die durch Panc1-Holoklon- oder Paraklon-Zellen gebildet wurden, weisen auf EMT hin.....	84
Abbildung 24: Holoklone von Panc1-Zellen und Meroklone von H6c7-kras-Zellen weisen eine vermehrt mesenchymale Genexpression auf.....	85
Abbildung 25: Holoklone von Panc1-Zellen weisen eine erhöhte Expression von mesenchymalen Proteinen auf.....	86
Abbildung 26: Panc1-Paraklone sind durch eine höhere Invasionsrate gekennzeichnet als Holoklone.....	88
Abbildung 27: Blockade von TNF- α bewirkt keine Veränderung der Zellzahl von Panc1-Holoklonen.....	89
Abbildung 28: Blockade von TNF- α bewirkt eine verringerte Expression mesenchymaler Marker in Panc1-Holoklonen.....	90
Abbildung 29: Blockade von TNF- α bewirkt eine leichte Verringerung der Invasionsrate von Panc1-Holoklonen.....	90

Abbildung 30: Blockade von TNF- α bewirkt eine verminderte Expression von Nestin und Nanog, vermindert jedoch nicht die Gesamtanzahl der gebildeten Kolonien, erhöht aber die Anzahl der Kolonien mit differenzierten Zellen.	92
Abbildung 31: siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin bewirkt Anstieg der Nanog-Genexpression.	94
Abbildung 32: siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin vermindert das Koloniebildungsvermögen von Panc1-Holoklonen bezüglich Gesamtanzahl und Anzahl der Holoklone.	95
Abbildung 33: siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Nestin vermindert die Zellzahl von Panc1-Holoklonen.	96
Abbildung 34: siRNA-vermittelter Knockdown von Nestin moduliert die Expression von EMT-Markern und erhöht die Invasionsrate von Panc1-Holoklonen.	97

Publikationsverzeichnis

1. Originalarbeiten

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

Engelke, J., **Knaack, H.**, Linden, M., Feldmann, M., Gundling, N., Gundelach, Y., Egli, C., Greiner, M., Beckers, J., Sousa, N., et al. (2015). Identification of embryonic/fetal mortality in cows by semiquantitative detection of pregnancy-associated glycoproteins. *Livestock Science* 178, 363–370.

Mense, K., Meyerholz, M., Gil Araujo, M., Lietzau, M., **Knaack, H.**, Wrenzycki, C., Hoedemaker, M. & Piechotta, M. (2015). The somatotrophic axis during the physiological estrus cycle in dairy heifers - Effect on hepatic expression of GHR and SOCS2. *Journal of Dairy Science* 98, 2409–2418

Meyerholz, M., Mense, K., **Knaack, H.**, Sandra, O. & Schmicke, M. (2016). Pregnancy-induced ISG-15 and MX-1 gene expression is detected in the liver of Holstein-Friesian heifers during late peri-implantation period. *Reproduction in Domestic Animals* 51, 175–177

Meyerholz, M., Mense, K., Lietzau, M., Kassens, A., Linden, M., **Knaack, H.**, Wirthgen, E., Hoeflich, A., Raliou, M., Richard, C., Sandra, O., Schuberth, H.-J., Hoedemaker, M. & Schmicke, M. (2015). Serum IGFBP4 concentration decreased in dairy heifers towards day 18 of pregnancy. *Journal of Veterinary Science* 16, 413–421.

Rahn, S., Zimmermann, V., Viol, F., **Knaack, H.**, Stemmer, K., Peters, L., Lenk, L., Ungefroren, H., Saur, D., Schäfer, H., Helm, O. & Sebens, S. (2018). Diabetes as risk factor for pancreatic cancer: Hyperglycemia promotes epithelial-mesenchymal-transition and stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells. *Cancer Letters* 415, 129–150.

2. Kongressbeiträge

Knaack, H., Lenk, L., Viol, F., Fabian, A., Buttlar, J., Mikulits, W., Schäfer, H. & Sebens, S. Metastasierung des duktales Pankreaskarzinoms - Die hepatische Mikroumgebung beeinflusst das Wachstumsverhalten und Krebsstammzeleigenschaften disseminierter Pankreasgangepithelzellen über die Modulation des Metabolismus. 36. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., München/Freising, Deutschland. 2016.

Knaack, H., Mense, K. & Piechotta, M. Growth hormone addition to medium in HepG2 cell culture: influence on IGF-I and IGF-II production. 7th International Congress of the GRS and IGF Society, Singapur, Singapur. 2014.

Knaack, H., Viol, F., Lenk, L., Hengstler, J., Mikulits, W., Will, O., Glüer, C.-C., Egberts, J.-H., Hauser, C., Gundlach, J.-P. & Sebens, S. Die hepatische Mikroumgebung beeinflusst das Krebsstammzellpotenzial disseminierter Pankreasgangepithelzellen sowie ihr Wachstumsverhalten *in vivo*. 37. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., Greifswald, Deutschland. 2017.

Lenk, L., Pein, M., **Knaack, H.**, Viol, F., Mikulits, W., Weiskirchen, R., Hengstler, J., Wenzel, P., Schneider, G., Saur, D. & Sebens, S. Metastasierung des duktales Pankreasadenokarzinoms - Alterationen der Lebermikroumgebung beeinflussen das Verhalten und den Phänotyp disseminierter Pankreasgangepithelzellen. 35. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., Rostock, Deutschland. 2015.

Lenk, L., Viol, F., **Knaack, H.**, Pein, M., Fabian, A., Mikulits, W., Weiskirchen, R., Fehse, B., Riecken, K., Wenzel, P., Schneider, G., Saur, D. & Sebens, S. Sleep is the enemy: cellular dormancy and cancer stem cell properties are influenced by hepatic alterations in disseminated pancreatic ductal epithelial cells. Pancreatic Cancer Symposium 2015, Marseille, Frankreich. 2015.

Mense, K., Meyerholz, M., **Knaack, H.**, Hoedemaker, M. & Piechotta, M. Hepatic SOCS2 expression is influenced by physiological cycle stages in dairy heifers. 16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo, Chicago, Vereinigte Staaten von Amerika. 2014.

Mense, K., Meyerholz, M., **Knaack, H.**, Lietzau, M., Engelke, J., Hoedemaker, M. & Piechotta, M. The hepatic expression of GHR and SOCS2 mRNA is increased before ovulation during the follicular phase in cattle. 7th International Congress of the GRS and IGF Society, Singapur, Singapur. 2014.

Mense, K., Meyerholz, M., **Knaack, H.**, Steufmehl, M., Ulbrich, S., Hoedemaker, M. & Piechotta, M. Hepatic SOCS2 expression is increased during estrus in dairy heifers: possible impact on liver IGF-I production. 47. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Gießen, Deutschland. 2014.

Rahn, S., Piller, M., Helm, O., Zimmermann, V., Lenk, L., **Knaack, H.**, Sipos, B., Röcken, C., Schäfer, H., Wesch, D. & Sebens, S. Inflammation associated metabolic rewiring in initiation of pancreatic cancer - Impact of macrophage-mediated metabolic alterations on phenotype and tumor-promoting properties in benign and premalignant pancreatic ductal epithelial cells. 36. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., München/Freising, Deutschland. 2016.

Rahn, S., Zimmermann, V., Viol, F., **Knaack, H.**, Stemmer, K., Peters, L., Lenk, L., Ungefroren, H., Saur, D., Schäfer, H., Helm, O. & Sebens, S. Diabetes mellitus als Risikofaktor für die Entstehung des duktales Pankreaskarzinoms - Chronische Hyperglykämie fördert die Epithelial-Mesenchymale Transition und Krebsstammzeleigenschaften prämaligener Gangepithelzellen. 38. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclubs e.V., Ulm, Deutschland. 2018.

Stegner, S., Buttlar, J., Viol, F., Lenk, L., **Knaack, H.**, Rahn, S., Fabian, A., Mikulits, W., Schäfer, H., Helm, O. & Sebens, S. Liver metastases of pancreatic cancer: The interplay of metabolic enzymes and cancer stem cell properties in the context of the hepatic microenvironment. 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Mannheim, Deutschland. 2017.

Viol, F., Lenk, L., **Knaack, H.**, Pein, M., Fabian, A., Mikulits, W., Weiskirchen, R., Fehse, B., Riecken, K., Wenzel, P., Schneider, G., Saur, D. & Sebens, S. Cellular dormancy and cancer stem cell properties are influenced by hepatic alterations in disseminated pancreatic ductal epithelial cells. DKFZ-ZMBH Alliance Forum - Tumor Microenvironment, Metabolism and Metastasis, Heidelberg, Deutschland. 2015.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Susanne Sebens für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung, die fortwährende Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Für die Übernahme des zweiten Gutachtens möchte ich Thomas Roeder danken.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung und die tolle gemeinsame Zeit, in der neben der konzentrierten Arbeit auch der Spaß nie zu kurz kam. Insbesondere möchte ich mich bei Dagmar Leisner für die herausragende technische Unterstützung bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Lennart Lenk, Ole Helm und Sascha Rahn für alle wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche, Hilfen, Tipps und Motivation.

Weiterhin danke ich allen Kooperationspartnern, die zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben: Jan Hengstler und Georgia Günther für die zuverlässige Bereitstellung der Hepatozyten, Olga Will und Sanjay Tiwari sowie den Chirurgen Jan-Hendrik Egberts, Jan-Paul Gundlach und Charlotte Hauser für die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche, Christoph Röcken und Sandra Krüger für Hilfe bei der Gewebefixierung und den Färbungen, Udo Schumacher für die Detektion der EMT-Marker, Reinhild Geisen, SynenTec und ORGA Labor Management GmbH für die Bereitstellung und Tipps zum Einsatz des NyOne.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Geduld, moralische Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit.

Danke.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Metastasierung des Pankreaskarzinoms: Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf Stammzeleigenschaften und Differenzierung von Pankreasgangepithelzellen“ nach Inhalt und Form eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln bzw. mit der wissenschaftlichen Beratung meiner Betreuer in der Arbeitsgruppe Inflammatorische Karzinogenese, Institut für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, angefertigt habe. Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder wurden zur Veröffentlichung eingereicht. Die Arbeit wurde bisher nicht im In- oder Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Weiterhin bestätige ich, dass ich zuvor noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Kiel, den 22.05.2018

Hendrike Knaack