

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Metastasierung des duktales Pankreasadenokarzinoms –
Der Einfluss von metabolischen Veränderungen
auf Krebsstammzeleigenschaften von
duktales Pankreaskarzinomzellen im
Kontext der hepatischen Mikroumgebung**

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

vorgelegt von

Simon Henry Stegner

aus Kiel

Kiel 2022

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens
Institut für Experimentelle Tumorforschung
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Adam
Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.01.2023

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC).....	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 Pathogenese & Pathologie	3
1.1.3 Klinik & Diagnostik.....	7
1.1.4 Therapie & Prognose.....	8
1.2 Invasion & Metastasierung.....	10
1.2.1 Pathogenetische Grundlagen	10
1.2.2 Invasion & Metastasierung im PDAC.....	13
1.2.3 Die Leber als Ziel hämatogener Metastasierung des PDAC	14
1.3 Glukosestoffwechsel	18
1.3.1 Veränderter Metabolismus in Krebszellen und im PDAC.....	21
1.4 Das Konzept von Krebsstammzellen	23
1.4.1 Der Nachweis von Krebsstammzellen generell und im PDAC.....	26
1.4.2 Krebsstammzellmarker Nanog und Nestin.....	28
1.5 Ziele der Arbeit.....	31
2 Material und Methoden.....	34
2.1 Materialien	34
2.1.1 Geräte.....	34
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	36

2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	36
2.1.4	Rezepturen	38
2.1.5	Antikörper	39
2.1.6	Small interfering RNA (siRNA)	40
2.1.7	Primer für die qRT-PCR.....	41
2.1.8	Zelllinien	42
2.1.9	Medien	43
2.1.10	Kits	44
2.1.11	Software	44
2.2	Methoden.....	45
2.2.1	Zellkultur.....	45
2.2.2	siRNA-Transfektion der PDEZ	51
2.2.3	Colony formation assay (CFA)	52
2.2.4	Proteingewinnung aus Ganzzelllysaten.....	53
2.2.5	Westernblot.....	55
2.2.6	RNA-Gewinnung aus Proteinlysaten	59
2.2.7	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	59
2.2.8	Immunfluoreszenzfärbungen	62
2.2.9	Statistische Auswertung	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Der Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf prämaligene und maligne PDEZ.....	64
3.2	Der Einfluss der SDHB auf Wachstumsverhalten und Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ in Gegenwart einer physiologischen Lebermikroumgebung	64
3.2.1	Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der SDHB-Expression	65
3.2.2	Die transiente Suppression der SDHB unter HSC-Kokultur steigert das Wachstumsverhalten der PDEZ.....	65

3.2.3	Die Suppression der SDHB-Expression beeinflusst die Krebsstammzeleigenschaften der Pankreasepithelzelllinien in unterschiedlicher Weise	67
3.2.4	Bei Suppression der SDHB-Expression weisen die Panc1-Zellen eine vermehrte Expression der G6PD auf	70
3.3	Der Einfluss der G6PD auf Wachstumsverhalten und Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ in Gegenwart einer entzündlichen Lebermikroumgebung	72
3.3.1	Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der G6PD-Expression	72
3.3.2	Die Suppression der G6PD-Expression zeigt keine hemmenden Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der PDEZ	73
3.3.3	Die Krebsstammzeleigenschaften der PDEZ in einer entzündlichen Lebermikroumgebung werden nicht durch die Suppression der G6PD-Expression gemindert	74
3.3.4	Unter Suppression der G6PD-Expression zeigen Panc1-Zellen eine vermehrte SDHB-Expression	77
3.4	Der Einfluss von Nanog auf PDEZ in einer physiologischen oder entzündlichen Lebermikroumgebung	79
3.4.1	Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der Nanog-Expression	79
3.4.2	Das Zellwachstum der PDEZ wird bei Suppression der Nanog-Expression gehemmt ..	80
3.4.3	Die Suppression der Nanog-Expression vermindert das Selbsterneuerungspotenzial maligner PDEZ	82
3.4.4	Maligne PDEZ exprimieren vermehrt SDHB bei Suppression von Nanog	85
3.5	Der Einfluss von Nestin auf PDEZ in einer physiologischen oder entzündlichen Lebermikroumgebung	88
3.5.1	Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der Nestin-Expression	88
3.5.2	Der Knockdown der Nestin-Expression wirkt sich negativ auf das Wachstumsverhalten der PDEZ unter den verschiedenen Stromabedingungen aus	89
3.5.3	Die Suppression der Nestin-Expression hat nur einen geringen Effekt auf das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ	91
3.5.4	In einer physiologischen Lebermikroumgebung exprimieren prä maligne PDEZ weniger SDHB bei Suppression der Nestin-Expression	94

4	Diskussion.....	97
4.1	Eine effiziente Glykolyse fördert das Wachstum von PDEZ in unterschiedlichen Lebermikroumgebungen.....	98
4.2	Die Krebsstammzellmarker Nanog und Nestin können das Wachstum der PDEZ und die Expression metabolischer Enzyme in den PDEZ beeinflussen	105
4.3	Die Wechselwirkung von SDHB und Nanog – Ist die SDHB ein Tumorsuppressor?.....	110
4.4	Limitationen	114
4.5	Ausblick	116
5	Zusammenfassung.....	118
6	Literatur.....	120
7	Anhang	130
	Eidesstattliche Erklärung.....	133
	Veröffentlichungen	134
	Danksagung	135

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) als Vorläufer des duktales Pankreasadenokarzinoms	4
Abbildung 1-2 Schematischer Überblick über den Glukosestoffwechsel	21
Abbildung 1-3 Das Konzept der Krebsstammzellen	26
Abbildung 1-4 Studiendesign	33
Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des Well-Transwell-Systems.....	49
Abbildung 2-2 Darstellung eines CFA Klonen unterschiedlicher Morphologie.....	53
Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der <i>sandwich</i> -Methode beim <i>semi-dry blotting</i>	57
Abbildung 3-1 Westernblot-basierte Expressionsanalyse der SDHB zur Knockdown-Kontrolle	65
Abbildung 3-2 Lebendzellzahlen der HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression	66
Abbildung 3-3 Expressionsanalyse von Krebsstammzellmarkern in HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression	68
Abbildung 3-4 Selbsterneuerungspotenzial und Koloniebildungsfähigkeit von HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression	69
Abbildung 3-5 Expressionsanalyse der G6PD in HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression	71
Abbildung 3-6 Westernblot-basierte Expressionsanalyse der G6PD zur Knockdown-Kontrolle	72
Abbildung 3-7 Lebendzellzahlen der HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression	73
Abbildung 3-8 Expressionsanalyse von Krebsstammzellmarkern in HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression	75
Abbildung 3-9 Selbsterneuerungspotenzial und Koloniebildungsfähigkeit von HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression	77
Abbildung 3-10 Expressionsanalyse der SDHB in HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression	78
Abbildung 3-11 RT-qPCR-basierte Expressionsanalyse von Nanog zur Knockdown-Kontrolle	80

Abbildung 3-12 Lebendzellzahlen der HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression.....	81
Abbildung 3-13 Koloniebildungsfähigkeit von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression.....	83
Abbildung 3-14 Selbsterneuerungspotenzial und Koloniebildungsfähigkeit von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression	84
Abbildung 3-15 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter Panc1-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression	86
Abbildung 3-16 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter Panc1-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression	87
Abbildung 3-17 RT-qPCR-basierte Expressionsanalyse von Nestin zur Knockdown-Kontrolle	88
Abbildung 3-18 Lebendzellzahlen der HSC- oder HMF- kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression.....	90
Abbildung 3-19 Koloniebildungsfähigkeit von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression.....	92
Abbildung 3-20 Koloniebildungsfähigkeit und Selbsterneuerungspotenzial von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression	93
Abbildung 3-21 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter Panc1-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression.....	95
Abbildung 3-22 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression.....	96
Abbildung 7-1 Originale Westernblots zur Erstellung der Abbildungen in Abschnitt 3.2 und 3.3.....	130
Abbildung 7-2 Originale Westernblots zur Erstellung der Abbildungen in Abschnitt 3.4.....	131
Abbildung 7-3 Originale Westernblots zur Erstellung der Abbildungen in Abschnitt 3.5.....	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Verwendete Geräte mit Angabe des Herstellers.....	34
Tabelle 2-2 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers.....	36
Tabelle 2-3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers	36
Tabelle 2-4 Verwendete Lösungen mit Angabe der Rezeptur	38
Tabelle 2-5 Verwendete Primärantikörper beim Westernblot	39
Tabelle 2-6 Verwendete Sekundärantikörper beim Westernblot.....	39
Tabelle 2-7 Verwendete Primärantikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen.....	40
Tabelle 2-8 Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen	40
Tabelle 2-9 Verwendete siRNA mit Angabe des Herstellers	40
Tabelle 2-10 Verwendete qRT-PCR Primer des Herstellers Eurofins	41
Tabelle 2-11 Verwendete qRT-PCR Primer des Herstellers RealTimePrimers.....	41
Tabelle 2-12 Verwendete Pankreasgangepithelzelllinien	42
Tabelle 2-13 Verwendete hepatische Stromazelllinien.....	42
Tabelle 2-14 Verwendete Kulturmedien mit Angabe der Zusammensetzung.....	43
Tabelle 2-15 Verwendete Kokulturmedien mit Angabe der Zusammensetzung.....	44
Tabelle 2-16 Verwendete Kits mit Angabe des Herstellers.....	44
Tabelle 2-17 Verwendete Software mit Angabe des Herstellers	44

Abkürzungsverzeichnis

ABCG2	<i>ATP-binding cassette super-family G member 2</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ADP+P	Adenosinphosphat + Phosphat
ALKBH5	α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylase AlkB homolog 5
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BLOTTO	<i>Bovine lacto transfer technique optimizer</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	<i>Cell adhesion molecules</i>
CCRCC	<i>Clear cell renal cell carcinoma</i> (Klarzelliges Nierenzellkarzinom)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a</i>
CDKN2A/p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a isoform p16</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleid acid</i>
CFA	<i>Colony formation assay</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
c-Myc	<i>Cellular-Myc</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CRC	<i>Colorectal carcinoma</i> (Kolarektales Karzinom)
CRISPR/Cas	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated proteins</i>
CSC	<i>Cancer stem cells</i> (Krebsstammzellen)
C _T	<i>Threshold cycle</i>
CT	Computertomographie

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleid acid</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMT	<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>
ESA	<i>Epithelial-Specific Antigen</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	Reduziertes Flavinadenindinukleotid
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GZL	Ganzzelllysate
G6PD	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> (Hepatozelluläres Karzinom)
HIF1	<i>Hypoxic-induced-factor-1</i>
HIF1- α	<i>Hypoxic-induced-factor-1-alpha</i>
HSC	<i>Hepatic stellate cells</i> (Hepatische Sternzellen)
HMF	<i>Hepatic myofibroblasts</i> (Hepatische Myofibroblasten)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IL	Interleukin
INK4	<i>Inhibitors of CDK4</i>
IPMN	Intraduktalpapillär-muzinöse Neoplasien
KD	Knockdown
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
Ki67	Kiel-67
kRas	H6c7eR-Kr
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>

mA	Milliampere
MCN	Muzinös-zystische Neoplasien
MDR1	<i>Multidrug resistance gene 1</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>Mammalian target of Rapamycin</i>
N	Newton
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH-H	Reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Nestin	<i>Neuroepithelial stem cell protein</i>
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD/SCID	<i>Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient</i>
NRF2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung cancer</i> (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
O-GlcNac	<i>O-linked-N-acetylglucosamine</i>

PanIN	Pankreatisch-intraepitheliale Neoplasien
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i> (Duktales Pankreasadenokarzinom)
PDEZ	Pankreatische duktale Epithelzellen
PFA	Paraformaldehyd
PPW	Pentosephosphatweg
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i> (Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	<i>Ribonucleid acid</i>
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	Reaktive oxidative Spezies
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
SDF-1	<i>Stromal-derived factor-1</i>
SDH	Succinatdehydrogenase
SDHB	Succinatdehydrogenase Subeinheit B
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SMAD4	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SOX-2/SRY-2	<i>Sex determining region Y box-2</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TALDO	Transaldolase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i>

TKT	Transketolase
TMU	Tumormikroumgebung
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TP53	<i>Tumor suppressor p53</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	<i>Volume per volume</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
ZEB 1/2	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1/2</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius
1-JÜR	1-Jahres-Überlebensrate

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC)

Das Pankreas ist ein 15-23cm langes, retroperitoneal im dorsalen Oberbauch an der Rückwand der Bursa omentalis gelegenes, S-förmiges Organ des Gastrointestinaltraktes und wird makroskopisch in Kopf, Körper und Schwanz unterteilt (Arastéh et al. 2013). Mikroskopisch-anatomisch und funktionell wird es in einen endokrinen und exokrinen Anteil unterteilt. Der exokrine Anteil des Pankreas nimmt den Hauptteil der Anatomie des Organs ein (Krams et al. 2013). Über 85% aller Pankreastumoren gehen vom Epithel der kleinen und großen Ausführungsgänge des exokrinen Anteils des Pankreas aus. Das maligne Pendant dieser duktales Pankreastumoren, das duktales Pankreaskarzinom, entsteht in 70-80% der Fälle im Pankreaskopf und präsentiert sich in über 95% der Fälle als duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013, Krams et al. 2013). Auch wenn das PDAC damit per Definition nur eine histopathologische Unterform des Pankreaskarzinoms darstellt, werden beiden Begriffe im Folgenden aufgrund dieser prozentualen Verteilung synonym verwendet.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkranken, leben mit einer für das eigene Überleben nur sehr ungünstigen Prognose. Obwohl das Pankreaskarzinom mit einem prozentualen Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen (mit Ausnahme des nicht-melanotischen Hautkrebses) von 3,4% beim Mann und 3,8% bei der Frau eine nachrangige Rolle einnimmt, rangiert es an vierter Stelle krebbedingter Todesursachen bei beiden Geschlechtern (Kaatsch et al. 2017, Siegel et al. 2018). Diese Diskrepanz lässt sich aus den nahezu identischen Inzidenz- und Mortalitätsraten für das Pankreaskarzinom erklären. So erkrankten beispielsweise in Deutschland 2014 ca. 17000 Menschen an einem Pankreaskarzinom, während im selben Jahr ca. 16600 Menschen daran verstarben (Kaatsch et al. 2017). Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von unter 10% weist das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen auf

(Kaatsch et al. 2017). Letztgenannte Daten verdeutlichen damit eindrücklich die ungünstige Prognose für das Überleben eines PDAC-Patienten. Das Pankreaskarzinom betrifft mit einem mittleren Erkrankungsalter von 72 Jahren beim Mann und 75 Jahren bei der Frau vor allem ältere Menschen (Kaatsch et al. 2017). Der demographischen Entwicklung folgend, führte dies zu einer konstanten Zunahme der absoluten Zahlen für Inzidenz und Mortalität des PDAC, während keine wesentliche Verbesserung für das Gesamtüberleben von PDAC-Patienten registriert werden konnte (Kaatsch et al. 2017, Siegel et al. 2018). Ausgehend von der Demographie sowie Sterblichkeits- und Inzidenzraten des PDAC prognostizieren Rahib et al., dass das PDAC 2030 sogar die zweithäufigste Krebstodesursache sein wird (Rahib et al. 2014).

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist weitestgehend unbekannt (Krams et al. 2013, Arastéh et al. 2013). Trotzdem lassen sich lebensstil- und populationsbezogene, sowie genetisch bedingte Risikofaktoren für eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit am Pankreaskarzinom erkennen. Wie bereits anhand des mittleren Erkrankungsalters erwähnt, stellt ein höheres Lebensalter einen relevanten Risikofaktor, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, dar. Als prädisponierende lebensstilbezogene Risikofaktoren werden Tabakkonsum, exzessiver Alkoholkonsum und Faktoren des metabolischen Syndroms gezählt (Becker et al. 2014, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013, Ilic und Ilic 2016, Kaatsch et al. 2017). Adipositas soll einen kausalen Bezug zu 11-13% aller PDAC-Erkrankungen haben und das Risiko für die Erkrankung an einem PDAC ab einem BMI von 40 kg/m² (Adipositas per magna) erheblich steigern (Becker et al. 2014, Ilic und Ilic 2016). Auch wenn der genaue pathogenetische Zusammenhang zwischen der Adipositas und dem PDAC bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, gibt es viele mögliche Erklärungsansätze für die prokarzinogene Wirkung der Adipositas wie beispielsweise proinflammatorische Signalkaskaden, die in der Pathogenese des PDAC eine bedeutende Rolle spielen können (s. Abschnitt 1.1.2). Dies bedingt auch die Diskussion über eine akkzelerative Wirkung hochkalorischer, fettreicher Ernährung auf die maligne Promotion pankreatischer Vorläuferläsionen hin zum PDAC und die präventive Empfehlung zu mehr Bewegung in der S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom (Andersen et al. 2017, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und

Deutschen Krebshilfe e.V. 2013). Ein lang bestehender Diabetes mellitus, ebenfalls ein Aspekt in der Definition des metabolischen Syndroms, gilt auch als Risikofaktor für die Entstehung des PDAC mit einem relativen Risiko von 2,89 (Andersen et al. 2017, Becker et al. 2014). Eine genetisch bedingte bzw. teilbedingte Ätiologie lässt sich bei ca. 10% aller PDAC-Patienten nachweisen. Hierbei lassen sich hereditäre Syndrome, die sich nicht klinisch führend in der Ausbildung eines Pankreaskarzinoms darstellen, jedoch mit einem erhöhten Risiko für dieses vergesellschaftet sind, von dem familiär bedingtem Pankreaskarzinom unterscheiden. Als Beispiele für solche hereditären Syndrome mit definierten Genloci seien hier das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (Lynch-Syndrom) mit einem 4,5-6-fach erhöhtem relativen Risiko und das Peutz-Jeghers-Syndrom mit einem 132-fach erhöhtem relativen Risiko und einem Lebenszeitrisiko von 36-42% zur Ausbildung eines PDAC genannt (Becker et al. 2014).

1.1.2 Pathogenese & Pathologie

Das PDAC geht nach derzeitigem Wissensstand aus nicht-invasiven, innerhalb der Epithelien der Ausführungsgänge des exokrinen Pankreas gelegenen Vorläuferläsionen hervor. Diese Vorläuferläsionen zeichnen sich alle durch eine ortsatypische zelluläre oder histologische Architektur aus und werden je nach ihrer Morphologie in drei verschiedene Typen unterteilt. Es werden dabei intraduktalpapillär-muzinöse Neoplasien (IPMN), muzinös-zystische Neoplasien (MCN) und pankreatisch-intraepitheliale Neoplasien (PanIN) unterschieden (Pelosi et al. 2017). Die bei Erstdiagnose meist 1-3 cm großen, unifokal in Pankreasschwanz und -korpus gelegenen MCN haben keinen Kontakt zu den Ausführungsgängen des exokrinen Pankreas und spielen für die Karzinogenese des PDAC epidemiologisch betrachtet eine nur untergeordnete Rolle. IPMN kommunizieren im Gegensatz zu den MCN mit den großen Ausführungsgängen des exokrinen Pankreas, sind bei Erstdiagnose meist über 1 cm groß und werden als Vorläuferläsion in 10% aller PDAC-Erkrankungen angesehen. Es wird angenommen, dass ca. 90% aller PDACs aus PanIN hervorgehen. PanIN sind mikroskopische, nicht-invasive, intraepitheliale Neoplasien der kleineren Ausführungsgänge des exokrinen Pankreas, die gehäuft multifokal im Pankreaskopf auftreten. Sie stellen innerhalb der Vorläuferläsionen des PDAC die am besten charakterisierte Gruppe dar und werden anhand der Ausprägung ihrer Morphologie Risikograden einer möglichen malignen Entartung

zugeordnet (s. Abbildung 1-1). Je höher das PanIN-Stadium, desto höher ist das Risiko eines Durchbruchs der pankreatisch-duktalem Epithelzellen (PDEZ) durch die Basalmembran und desto wahrscheinlicher ist damit der Übergang der PanIN von einem nicht-invasiven *Carcinoma in situ* in ein invasives Adenokarzinom (Hruban et al. 2007, Pelosi et al. 2017).

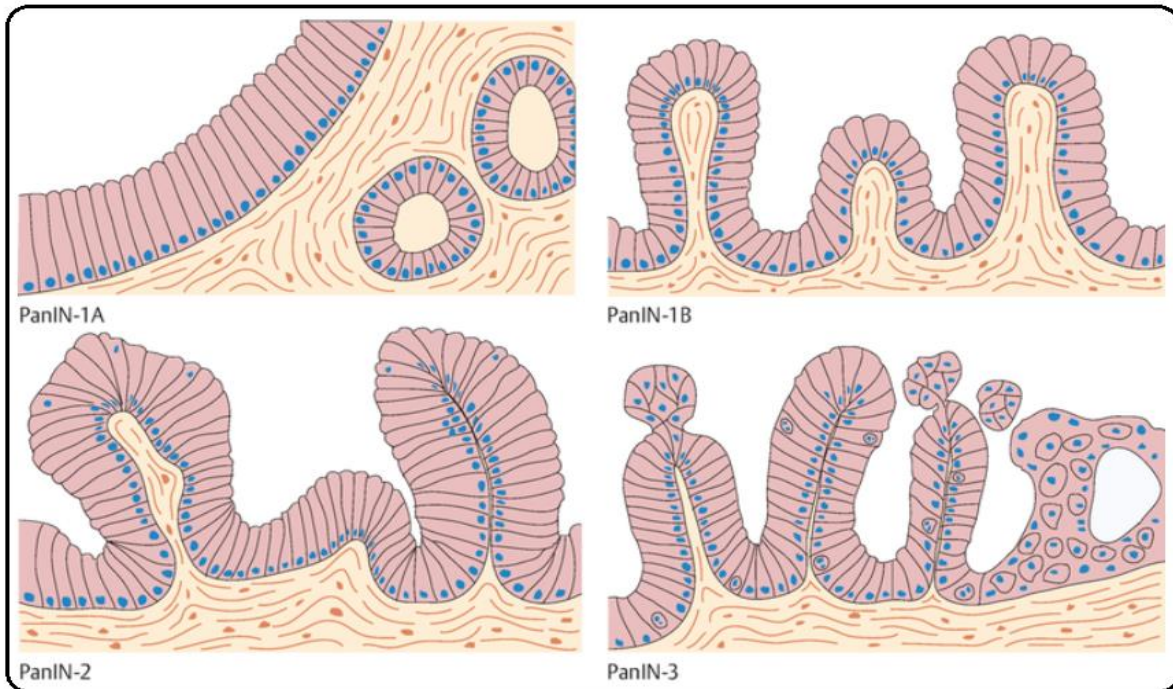


Abbildung 1-1 Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) als Vorläufer des duktalem Pankreasadenokarzinoms

PanIN-1A: flaches, stratifiziertes, muzinöses Zylinderepithel ohne Atypien; PanIN-1B: papilläres (fingerförmig) angeordnetes, muzinöses Zylinderepithel ohne Atypien; PanIN-2: beginnende „Unruhe“ des Zellbildes, vereinzelt nukleäre Atypien; PanIN-3: unruhiges Zellbild, nach apikal verlagerte, vergrößerte Kerne mit Nukleoli/starke nukleäre Atypien, aber keine Invasion (Krams et al. 2013).

Die Entwicklung der PanIN hin zum invasiven PDAC ist durch sequenzielle Veränderungen der molekularen Struktur des Erbmaterials der PDEZ gekennzeichnet. Die am frühesten und am häufigsten nachgewiesene Alteration ist eine aktivierende Punktmutation im Onkogen *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (KRAS). Sie lässt sich in über 90% aller PDAC und bereits im Stadium von PanIN-1-Läsionen nachweisen. KRAS codiert für das *rat sarcoma* (RAS)-Protein, welches als Bestandteil einer Rezeptortyrosinkinase-abhängigen Signaltransduktionkaskade Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozesse reguliert (Rassow et al. 2016). Die Enthemmung dieser Prozesse durch Daueraktivität des RAS-Proteins scheint dabei nicht nur für die Initiierung der Karzinogenese des PDAC eine

entscheidene Rolle zu spielen, sondern auch für das Überleben der PDAC-Zellen und damit der Tumorerhaltung essenziell zu sein. Desweiteren lassen sich bereits in über 90% der frühen PanIN-Stadien Telomererosionen nachweisen, die zu einer genomischen Instabilität innerhalb der PDEZ führen und den Weg für weitere genetische Alterationen ebnen können (Grant et al. 2016). Der am frühesten nachweisbare Verlust eines Tumorsuppressorgens ist der funktionelle Ausfall des Gens *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a* (CDKN2A), welches für P16^{INK4A} codiert. P16^{INK4A} ist ein Cyklin-abhängiger-Kinase-Inhibitor, der den Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase inhibiert (Heinrich et al. 2014). Der funktionelle Ausfall von CDKN2A lässt sich in über 95% aller PDAC sowie bereits in den früheren Stadien PanIN-1 und -2 nachweisen und folgt zeitlich nahezu direkt auf die onkogene KRAS-Mutation (Grant et al. 2016). Im PanIN-3 Stadium schließt sich letztlich der funktionelle Ausfall der Tumorsuppressorgene *tumor suppressor p53* (TP53) und *mothers against decapentaplegic homolog 4* (SMAD4) an (Pelosi et al. 2017). P53 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher bei Nachweis von Schäden in der *desoxyribonucleid acid* (DNA) die Transkription diverser Zielgene (u.a. CDKN1A/P21, *Bcl-2-associated X protein*, *p53 upregulated modulator of apoptosis*) induziert, mit denen es den Zellzyklus arretieren oder sogar die Apoptose der Zelle einleiten kann. Der funktionelle Verlust dieses als „Wächter des Genoms“ bezeichneten Gens lässt sich in ca. 70% aller PDAC nachweisen (Heinrich et al. 2014, Grant et al. 2016). Der funktionelle Verlust von SMAD4, eines in der *Transforming Growth Factor-beta* (TGF-β) Signalkaskade beteiligten Transkriptionsfaktors, wird als einer der finalen, kritischen Schritte in der Pathogenese des PDAC betrachtet und lässt sich in 55% aller PDAC nachweisen (Grant et al. 2016, Pelosi et al. 2017).

Neben den häufiger mutierten, bereits vorgestellten Onko- bzw. Tumorsuppressorgenen, die als Treibermutationen für die Karzinogenese des PDAC gelten, sind noch zahlreiche weitere Onkogene an der malignen Progression der PanIN in das PDAC beteiligt. Diese Onkogene weisen zwar selbst keine Mutationen auf, werden jedoch auf Grundlage einer veränderten Epigenetik dereguliert exprimiert. Als Beispiel für eine veränderte Epigenetik sei hier die Überexpression von *cellular-Myc* (c-Myc) genannt. C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Hyperphosphorylierung von P21 und *inhibitors of CDK4* (INK4) die Genexpression von

cyclin-dependent kinase 2 und *cyclin-dependent kinase 4* verstärkt und damit promotisch wirkt (Pelosi et al. 2017).

Histopathologisch ist das PDAC ein Konglomerat stark proliferierender, atypischer Gangepithelien, die drüsig angeordnet sind, Schleim bilden und diffus das gesunde Pankreasgewebe infiltrieren. Begleitet wird diese Infiltration von einer starken Bindegewebsvermehrung (Desmoplasie) und einer inflammatorisch-bedingten lymphoplasmazellulären Reaktion, die an das Bild einer chronischen Pankreatitis erinnern (Krams et al. 2013). Der desmoplastische, bindegewebige (stromale) Anteil kann dabei bis zu 90% der Tumormasse einnehmen und besteht aus einem komplexen System extrazellulärer Matrix (EZM), pankreatischer Myofibroblasten, Immunzellen und Blutgefäßen. In diesem System herrscht eine hohe Dynamik zirkulierender Metaboliten, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, mit denen Tumor- und Stromazellen in ständigem Austausch stehen und sich gegenseitig beeinflussen (Neesse et al. 2015). Beispielsweise fördern die PDAC-Zellen u.a. über die Sekretion von TGF- β die Transdifferenzierung pankreatischer Sternzellen in pankreatische Myofibroblasten, die wesentliche Komponenten der EZM synthetisieren und als wichtige Mediatoren entzündlicher Reaktionen im Pankreas agieren (Cannon et al. 2018, Yen et al. 2002). Inwieweit das desmoplastische Stroma dann das Verhalten der PDAC-Tumorzellen beeinflusst, ist nach aktueller Studienlage nicht eindeutig geklärt, da einerseits tumorfördernde, als auch –suppressive Wirkungen des desmoplastischen Stromas auf Proliferation, Motilität, Differenzierung und Resistenz der PDAC-Zellen nachgewiesen wurden (Cannon et al. 2018, Neesse et al. 2015, Pelosi et al. 2017). Trotzdem konnten Whatcott et al. eine Assoziation zwischen einer schlechteren Krankheitsprognose und erhöhten Leveln von EZM-Bestandteilen bei vorliegender Desmoplasie beobachten, sodass das desmoplastische Stroma weiterhin als ein potenzielles therapeutisches Ziel betrachtet wird (Whatcott et al. 2015). Es wird angenommen, dass die entzündliche Begleitreaktion beim PDAC die Invasionsfähigkeit des Tumors steigert und das Wachstum in das physiologische Pankreasgewebe erleichtert (Grant et al. 2016).

1.1.3 Klinik & Diagnostik

Das PDAC besitzt nahezu keine Frühsymptome und wird deswegen häufig erst in fortgeschrittenen Tumorstadien erstdiagnostiziert. Das häufigste Erstsymptom eines Pankreaskopfkarzinoms ist ein schmerzloser Ikterus, erkennbar durch eine Gelbfärbung der Haut und der Schleimhäute, der durch einen Galleaufstau in Folge eines tumorbedingten Verschlusses des Ductus choledochus entsteht. Der Ductus choledochus ist ein im Pankreaskopf gelegener Ausführungsgang, der Gallensekrete aus Leber und Gallenblase in das Duodenum drainiert. Im Pankreaskorpus und –schwanz gelegene Karzinome führen in der Regel nicht zu einem Verschluss des Ductus choledochus, sodass sich diese initial nicht durch einen Verschlussikterus präsentieren. Als weitere mögliche Symptome können gürtelförmige in den Rücken ausstrahlende Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, anhaltender Gewichtsverlust und körperliche Schwäche auftreten. In Folge eines Funktionsverlustes des endokrinen Pankreas kann es zudem in seltenen Fällen zu einer pathologischen Glukosetoleranzstörung kommen. Eine etwas seltenere Symptomatik, die nicht primär in Folge des Pankreaskarzinoms entsteht, sondern dieses als paraneoplastisches Syndrom begleitet, ist eine verstärkte Blutgerinnungsneigung, die zu häufigen Thrombosen in tiefen und oberflächlichen Venen führen kann (Arastéh et al. 2013).

Aktuell existiert keine Empfehlung hinsichtlich laborchemischer, molekularbiologischer oder bildgebender Verfahren zum Screening der asymptomatischen Normalbevölkerung auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms. Eine initiale Diagnostik erfolgt demnach in der Regel erst beim Vorliegen von Symptomen. Hierbei spielt vor allem die Oberbauchsonographie eine übergeordnete Rolle, es sind aber auch je nach Expertise weitere bildgebende Verfahren wie die Endosonographie, eine Computertomographie (CT) oder eine Magnetresonanztomographie für die Erstdiagnostik geeignet. Für das *staging* von Pankreaskarzinomen sind dann vor allem die Endosonographie zur Beurteilung der lokalen Infiltrationstiefe des Pankreaskarzinoms sowie des Befalls lokaler Lymphknoten und eine CT-Untersuchung zum Nachweis von Lymphknoten- und Fernmetastasen geeignet. Parallel dazu kann beim Nachweis einer Raumforderung im Pankreas eine laborchemische Kontrolle des Tumormarkers Carbohydrate-Antigen 19-9 erfolgen. Sofern Initial- und *staging*-Diagnostik einen potenziell kurablen, vollständig resezierbaren Befund ergeben, schließt sich die

operative Resektion des Tumors mit histologischer Sicherung des Befundes aus dem Resektat an (s. Abschnitt 1.1.5). Eine Ultraschall- oder CT-gesteuerte Sicherung einer Gewebeprobe erfolgt hingegen nur bei einem operativ nicht resezierbarem, potenziell palliativem Befund aus Initial- und *staging*-Diagnostik (Arastéh et al. 2013, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013).

1.1.4 Therapie & Prognose

Die einzige, aktuell verfügbare potenziell kurative Therapieoption des PDAC ist die vollständige operative Entfernung des Tumors im Gesunden (R0-Resektion). Eine R0-Resektion ist dabei unabhängig von der Lokalisation des Tumors und kann selbst bei lokal weit fortgeschrittenen Tumoren gegebenenfalls unter Mitentfernung von Nachbarorganen en bloc erfolgen. Im Anschluss an die operative Resektion des Tumors erfolgt in der Regel eine adjuvante Chemotherapie mit den Präparaten Gemcitabin oder 5-Fluorouracil für 6 Monate. Bei dem Nachweis von Organmetastasen (z.B. in der Leber), distanter Lymphknotenmetastasen, einer diffusen Infiltration des Bauchfells (Peritonealkarzinose) oder einer zu weit fortgeschrittenen lokalen Tumordinvasion *per continuitatem* ist eine Resektabilität des Tumors nicht mehr gegeben und sollte nach Empfehlung der aktuellen Leitlinie unterbleiben. In einer solchen Situation wird für Patienten, die aufgrund ihres Allgemeinzustandes maximal gelegentlich hilfsbedürftig in ihren Alltagsaktivitäten sind, die Empfehlung zur Einleitung einer palliativ intendierten Chemotherapie ausgesprochen. Obwohl als Erstlinientherapie standardmäßig eine ambulante Monotherapie mit dem Präparat Gemcitabin empfohlen wird, nehmen Kombinationsschemata mehrerer Chemotherapeutika einen zunehmenden Stellenwert in der Therapie ein. So kann alternativ Gemcitabin mit dem *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib beim metastasierten Pankreaskarzinom kombiniert werden. Patienten, die ein günstiges Risikoprofil aufweisen (Alter <75 Jahre, Bilirubinwert <1,5-fachem der Norm, selbstständig versorgender Patient trotz eingeschränkter Aktivität und Belastbarkeit) können mit der aggressiveren Chemotherapiekombination „FOLFIRINOX“, bestehend aus den Präparaten 5-Fluorouracil/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin, behandelt werden. Zwar wurde ein deutlicher Vorteil dieses Therapieregimes gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabin

nachgewiesen, jedoch ging dies mit einer deutlich höheren Toxizität für den Patienten einher. Desweiteren kommen in der Palliativtherapie beim PDAC die Bestrahlung von Knochenmetastasen und diverse supportive Therapiemaßnahmen zum Einsatz (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013).

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, geht die Diagnose eines PDAC mit einer sehr schlechten, in der überwiegenden Mehrheit der Fälle infausten Prognose einher. Dieser Tatsache liegen mehrere Ursachen zu Grunde. Sie resultiert aus den Eigenschaften des PDAC, relativ früh infiltrativ zu wachsen und Metastasen zu bilden, ohne dabei klinisch auffällig zu werden. Hiermit übereinstimmend erlaubt das derzeitige Wissen über die ätiopathogenetischen Zusammenhänge des PDAC keine Strategie zur frühzeitigen Detektion asymptomatischer Patienten zum Beispiel im Rahmen eines Screeningverfahrens. Beides macht eine rechtzeitige, frühe Diagnose relativ schwierig und führt dazu, dass über 80% der PDAC-Patienten bei Erstdiagnose bereits einen Tumor in weit fortgeschrittenem lokalen oder metastasierten Zustand aufweisen (Rahib et al. 2014, Pelosi et al. 2017). Damit bleibt für nur noch unter 20% der PDAC-Patienten überhaupt die Möglichkeit einer potenziell kurativen chirurgischen Behandlung. Aber selbst die Gruppe dieser R0-resezierten, adjuvant chemotherapeutisch und damit „kurativ“ behandelten Patienten weist eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 20% und eine mediane Überlebenszeit von 20 bis 28 Monaten auf (Grant et al. 2016, Tempero et al. 2017). Bei der großen Mehrheit der Patienten wird eine palliative Chemotherapie eingeleitet, deren Ergebnisse auf die Überlebenszeit der Patienten ebenfalls ernüchternd erscheinen. Im Vergleich zu einer rein symptomorientierten Supportivtherapie konnte zwar eine Senkung der 1-Jahres-Mortalität unter einer Chemotherapie mit Gemcitabin nachgewiesen werden, trotzdem beträgt die 1-Jahres-Überlebensrate (1-JÜR) unter dieser Therapie nur 18-20% und die mediane Überlebenszeit 6,8 Monate (Yip et al. 2006). Die Kombination von Gemcitabin mit Erlotinib ergab nur eine geringe Verbesserung der 1-JÜR auf 24% und selbst unter dem aggressivsten Chemotherapieregime FOLFIRINOX, welches vorbehaltlich für Palliativpatienten mit günstigem Risikoprofil zur Verfügung steht, konnte die mediane Überlebenszeit auf 11,1

Monate verlängert werden (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013).

Eine schwierige Diagnose, eine im Krankheitsverlauf meist zu spät initiierte, unzureichende Therapie und eine überaus schlechte Prognose sind damit wesentliche Kennzeichen des PDAC. Sie begründen den dringenden Bedarf an der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Konzepte.

1.2 Invasion & Metastasierung

Invasion und Metastasierung sind essenzielle Kennzeichen maligner Tumoren und werden als solche von Hanahan und Weinberg auch als „*hallmark of cancer*“ aufgeführt (Hanahan und Weinberg 2011). Diesem Charakteristikum kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da die Ausbildung und das Vorhandensein von Metastasen bei vielen soliden Tumoren, wie auch bei dem PDAC, häufig darüber entscheidend sind, ob ein Patient potenziell von seiner Tumorerkrankung geheilt werden kann (s. Abschnitt 1.1.4). Auch die letztlich zum Tode eines Krebspatienten führende Ursache (z.B. Organversagen von Leber und Gehirn, Tumorkachexie, pulmonale Erschöpfung, embolische Ereignisse etc.) lässt sich in der Mehrheit der Fälle auf das Vorhandensein von Metastasen und die Gesamtheit der Tumorlast zurückführen (Loberg et al. 2007, Talmadge und Fidler 2010).

1.2.1 Pathogenetische Grundlagen

Die Pathogenese der Metastasierung von Karzinomen wird mit dem Modell der „Invasions- und Metastasierungskaskade“ nach Fidler erklärt (Fidler 2003). Dieser postuliert darin eine sequenzielle Abfolge mehrerer, miteinander verbundener, kritischer Schritte im Prozess der Metastasierung, die einerseits von den intrinsischen Fähigkeiten der Tumorzellen selbst, andererseits aber auch von der Reaktion des Wirtes auf die Tumorzellen abhängen. Die Tumorzellen akkumulieren dabei genetische und epigenetische Alterationen, die sie funktionell zur Invasion und Migration befähigen. Ein Zellprogramm, das mit dem Erwerb dieser Fähigkeiten in Verbindung gebracht wird, ist die *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT). Die EMT spielt physiologisch eine Rolle in der Embryonalentwicklung von Geweben, der Wundheilung und der Gewebsreparation. Durch sie erhalten epitheliale Zellen die

Fähigkeit, sich aus einem Gewebeverband zu lösen, unabhängig von diesem zu überleben und in andere Gewebekompartimente zu migrieren. Sie geht einher mit der Minderexpression von epithelialen Zelladhäsionsmolekülen (wie beispielsweise E-Cadherin), die die Polarität epithelialer Zellen determinieren, und der zunehmenden Expression mesenchymaler Zellmarker wie Vimentin oder N-Cadherin. Sie wird über diverse Transkriptionsfaktoren wie SNAIL, SLUG, *zinc finger E-box-binding homeobox 1/2* (ZEB 1/2) gesteuert und kann durch extrazelluläre Faktoren und Zytokine wie TGF- β , Wnt und Notch induziert werden (Grant et al. 2016, Hanahan und Weinberg 2011, Pelosi et al. 2017).

Mit dem Durchbruch epithelialer Tumoren durch die Basalmembran und dem Einwachsen dieser in das daruntergelegene bindegewebige Stroma geht ein zuvor nicht invasives *Carcinoma in situ* in ein invasives Karzinom über (Lüllmann-Rauch 2012). Die Tumorzellen proliferieren und das Karzinom wächst. Ab einer Tumorgroße mit einem Durchmesser von 1-2 Millimeter können die Tumorzellen im Inneren des Tumors nicht mehr über Diffusion mit Nährstoffen versorgt werden, sodass diese zur Synthese und Sekretion angiogenetischer Faktoren (z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)) angeregt werden. Dies führt zu einer extensiven Vaskularisation des Tumors über Kapillaren, die aus dem tumorumgebenden Gewebe in den Tumor einsproßen. Hierdurch erhalten Tumorzellen direkten Kontakt zu dünnwandigen lymphatischen, venösen oder kapillären Gefäßen, die nur einen geringen Widerstand gegen die Penetration von einwachsenden Tumorzellen bieten. Es folgt die Embolisation des Gefäßes und die Abgabe einzelner Tumorzellen bzw. Tumorzellkonglomerate in den Blutkreislauf. Sofern diese die Zirkulation im Blutkreislauf überleben, setzen sich die Tumorzellen in den Kapillarbetten entfernter Organe ab, adhären an den Gefäßwänden und durchwandern diese schließlich. Im Parenchym des entfernten Organes nehmen die Tumorzellen dann durch den gegengerichteten Prozess der *Mesenchymal-Epithelial Transition* (MET) wieder einen epithelialen Phänotypus an und proliferieren. Dadurch kommt es zum Auswachsen von Mikro- und im späteren Verlauf Makrometastasen. Die Invasions- und Metastasierungskaskade kann sich hiervon ausgehend wiederholen und weitere Metastasen erzeugen (Fidler 2003, Hanahan und Weinberg 2011).

Der Prozess der Invasions- und Metastasierungskaskade ist sehr komplex und weist hohe Anforderungen an disseminierte Tumorzellen auf, sodass angenommen wird, dass es nur

einer geringen Anzahl an Tumorzellen überhaupt möglich ist, alle Stufen der Kaskade erfolgreich zu durchlaufen. Dem beipflichtend konnten Luzzi et al. in einem Mausmodell der Leber nachweisen, dass nur ca. 0,02% der Tumorzellen, die direkt intraportal in das venöse Zustromgebiet der Leber injiziert wurden, zu Makrometastasen in der Leber auswuchsen (Luzzi et al. 1998). Disseminierte Tumorzellen müssen in der Blutzirkulation den Scherkräften des Blutstromes und den Einflüssen des Immunsystems, vermittelt durch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) widerstehen. Im Parenchym des entfernten Organes nach Extravadiation aus dem Gefäßsystem angekommen, müssen die Tumorzellen dann den Einwirkungen des lokalen Immunsystems widerstehen, sich an die Bedingungen des umgebenden Mikromilieus anpassen und unter diesen zur Ausbildung einer Metastase proliferieren. So beobachteten Luzzi et al., dass zwar 80% der injizierten Tumorzellen die Mikrozirkulation der Leber überlebten und erfolgreich aus dem Gefäßsystem auswandern konnten, jedoch nur 2,5% von diesen eine Mikrometastase ausbildeten und sogar nur 1% der Mikrometastasen zu einer Makrometastase auswuchsen (Luzzi et al. 1998). In Anbetracht der Ausgangsmenge der direkt intrazirkulär injizierten Tumorzellen und der daraus resultierend geringen Anzahl an Makrometastasen liegt die Erkenntnis nah, dass die Metastasierung maligner Tumoren im Patienten auf dem nach Fidler postuliertem Weg einen ineffizienten Prozess darstellt (Talmadge und Fidler 2010).

Aktuell existieren zwei Erklärungsmodelle für den Zeitpunkt der Metastasierung maligner Tumoren. Beide Modelle stimmen zwar darin überein, dass die Tumorzellen sequenziell einen invasions- und metastasierungsfähigen Phänotyp erwerben, postulieren jedoch einen unterschiedlichen Zeitpunkt in der Dissemination potenziell Metastasen ausbildender Tumorzellen vom Primärtumor. Das klassische Modell der „linearen Progression“ beurteilt den Prozess der Metastasierung als späten Schritt in der Karzinogenese. Erst am Ende der Entartungssequenz der Tumorzellen, assoziiert mit einem fortgeschrittenen Primärtumorstadium, sei hiernach die Ausbildung komplett maligner, metastasierungsfähiger Tumorzellen möglich. Dies wurde aus der klinischen Beobachtung geschlossen, dass ein erhöhtes Primärtumorvolumen mit einem häufigeren Auftreten von Metastasen assoziiert ist. Das alternative Erklärungsmodell der „parallelen Progression“ wurde 2009 durch Christoph Klein auf Grundlage von klinischen und experimentellen

Beobachtungen am Brustkrebs aufgestellt (Klein 2009). In diesem Modell kommt es relativ früh zur Dissemination einzelner prämaligener Tumorzellen aus dem Primärtumor, zur sequenziellen Entartung dieser am Ort ihrer Aussaat und letztlich zur dortigen Ausbildung einer Metastase. Die maligne Progression der Tumorzellen des Primärtumors und die der Metastasen laufen hierbei unabhängig voneinander und parallel zueinander ab. Theoretisch könnten demnach sogar Tumorzellen aus präneoplastischen Vorläuferläsionen (wie beispielsweise PanIN) relativ früh in entfernte Organe disseminieren und dort die Grundlage zur Ausbildung einer Metastase schaffen. Obgleich für beide Progressionsmodelle für-, als auch gegensprechende klinische sowie experimentelle Beobachtungen gemacht werden konnten, und die Studienlage diesbezüglich uneinheitlich ist, konnten Rhim et al. Hinweise für die parallele Progression in der Karzinogene des PDAC liefern (Klein 2009, Rhim et al. 2012, Valastyan und Weinberg 2011). In einem Mausmodell wiesen sie bereits in PanIN-2 und -3 Vorläuferläsionen EMT-durchlaufende prämaligene Zellen und im Blut zirkulierende, disseminierte pankreatische Zellen nach. Auch wenn dies keinen direkten Beweis für die Ausbildung von Metastasen aus eben jenen Zellen darstellt, ist es doch ein Hinweis für die frühe Dissemination invasions- und migrationsfähiger, prämaligener PDEZ aus PanIN-Läsionen (Rhim et al. 2012).

1.2.2 Invasion & Metastasierung im PDAC

Das PDAC neigt früh zur lokoregionalen Invasion des peripankreatischen Gewebes. Davon häufig betroffen sind das peripankreatische Fettgewebe, der Zwölffingerdarm und die Gallenwege. Aufgrund der anatomischen Nähe des Pankreas zur Mesenterialwurzel und zum Portalsystem sind nicht selten Venen (u.a. Vena mesenterica superior, Vena portae hepatis) und Arterien (u.a. Truncus coeliacus, A. mesenterica superior) dieser anatomischen Strukturen lokal infiltriert oder ummauert (Hiddemann et al. 2004). Als prognostisch besonders ungünstig gilt auch die frühe Infiltration des PDAC in nervale Leitungsbahnen des Magen-Darm-Traktes und entlang dieser in das Retroperitoneum zur Aorta. Zum Zeitpunkt der operativen Versorgung finden sich in über 70% der Fälle Metastasen in Lymphknoten entlang der arteriellen Gefäße der Mesenterialwurzel und der abgehenden Arterien des Truncus coeliacus (Cubilla und Fitzgerald 1985, Siewert 2010). Hämatogene Fernmetastasen des PDAC finden sich primär fast immer in der Leber (>70%). Des Weiteren stellen

nachrangig das Peritoneum, die Lunge und in selteneren Fällen die Knochen und das Gehirn Manifestationsorte der hämatogenen Metastasierung des Pankreaskarzinoms dar (Hiddemann et al. 2004).

1.2.3 Die Leber als Ziel hämatogener Metastasierung des PDAC

Die Leber ist mit ca. 1500 Gramm die größte Drüse des menschlichen Körpers und nimmt eine zentrale Rolle im allgemeinen Stoffwechsel ein. Intraperitoneal-abdominell im rechten Oberbauch gelegen, sind weitere wesentliche Aufgaben der Leber die Galleproduktion und -sekretion, die Synthese zahlreicher Plasmaproteine, sowie die Entgiftung und Ausscheidung körpereigener und -fremder Giftstoffe. Die Leber wird zu 80% über die Pfortader (V. portae hepatis) mit Blut versorgt (Lüllmann-Rauch 2012). In das Zustromgebiet der V. portae hepatis ist auch das Pankreas inbegriffen, sodass disseminierte Tumorzellen aus einem Pankreastumor über die venösen Gefäße des Pankreas zunächst in die Mikrozirkulation der Leber gelangen (Schünke et al. 2009).

Die inter- und intrahepatischen Ausläufer der Pfortader, des Gallengangs und der Leberarterie laufen ab ihrer Einmündung an der Leberpforte stets parallel zueinander. Als Glisson-Trias bezeichnet, unterteilen die Endausläufer dieser drei Gefäße das Leberparenchym in mikroskopische Bau- und Funktionseinheiten, die Leberläppchen. Stark vereinfacht stellen diese im Querschnitt sechseckige Gebilde dar, in deren Zentrum sich jeweils eine Zentralvene befindet und die jeweils von drei Glisson-Trias umgeben werden. Innerhalb der Leberläppchen sind die Leberepithelzellen (Hepatozyten) zu Balken angeordnet, die radspeichenartig von der Zentralvene aus zum Rand der Leberläppchen ziehen. Zwischen diesen Balken verlaufen die Sinusoide, blutführende Kanäle, die mit einem stark fenestrierten Endothel ausgekleidet sind. In ihnen fließt das Blut entlang der Hepatozyten von den Gefäßen der Glisson-Trias aus in Richtung der Zentralvene und über diese in die Venae hepaticae. Zwischen dem Endothel der Sinusoide und den Hepatozytenbälkchen eröffnet sich der Disse-Raum. In ihm findet der Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und dem vorbeifließenden Blut statt. Er kann aufgrund der großen Poren innerhalb des Endothels durch alle Blutbestandteile (Zellen, Plasmaproteine etc.) erreicht werden. Im Disse-Raum finden sich u.a. Kupffer-Zellen, die als leberspezifische

Makrophagen Phagozytose betreiben, und hepatische Sternzellen (Ito-Zellen, HSC), die im Darm resorbiertes Vitamin A intrazellulär speichern. Die HSC sind gleichmäßig über den Disse-Raum verteilt und gelten zudem als Produzenten der spärlichen intralobulären Bindegewebsfasern, über die die mechanische Verbindung zwischen dem Bindegewebe der Zentralvene und den Glisson-Trias hergestellt wird (Lüllmann-Rauch 2012).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen spielen diese HSC als Effektorzellen eine entscheidende Rolle. Kommt es durch die Einwirkung von Noxen (wie beispielweise Alkohol) zu einer Nekrose von Hepatozyten, führt dies zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytos- bzw. Chemokine sowohl aus den untergehenden Hepatozyten selbst als auch aus Immunzellen wie den Kupffer-Zellen. Diese proinflammatorischen Signalstoffe wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), TGF- β , Interleukin (IL)-1 β /6 oder reaktive oxidative Spezies (ROS) führen zur Transdifferenzierung bzw. „Aktivierung“ der HSC in hepatische Myofibroblasten (HMF) (Higashi et al. 2017). Die HMF modulieren aktiv die Zusammensetzung und Morphologie der EZM des Disse-Raumes über die Produktion von Kollagen I und III. Vice versa erhält und fördert eine veränderte EZM im Disse-Raum die Transdifferenzierung der HSC in HMF und stellt ein Reservoir zur Bindung diverser Wachstumsfaktoren dar. Über *Platelet Derived Growth Factor*, *Fibroblast Growth Factor* und EGF kommt es zur Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten und anderer Zellentitäten, die in Zusammenarbeit mit den HMF die EZM des Disse-Raumes und des Leberparenchyms darüber hinaus fibrotisch umbauen (Higashi et al. 2017). Bei repetitiven entzündlichen Stimuli führt dies über einen längeren Zeitraum zur Entwicklung einer Leberzirrhose (Lüllmann-Rauch 2012). Im Folgenden wird deutlich, dass dieser Prozess auch eng mit der Ausbildung von Metastasen maligner Tumoren in der Leber assoziiert ist.

In einer Zusammenfassung über die genauen molekularpathologischen Vorgänge im Prozess der Lebermetastasierung definiert Vidal-Vinaclocha et al. vier Phasen vom Eintreffen zirkulierender Tumorzellen im portalvenösen Blutkreislauf der Leber bis hin zum Auswachsen einer etablierten Lebermetastase. In diesen beschreibt er Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Zellen des Mikromilieus der Leber, die förderlich für die Metastasenetablierung sind, als Teil einer prometastatischen Nische. In der ersten, der mikrovaskulären Phase, setzen sich zirkulierende Tumorzellen entweder solitär oder in der

Mehrzahl als Tumorzellmikroemboli in den Lebersinusoiden ab. Die Tumorzellen sind in dieser Phase sowohl den durch die Blutzirkulation hervorgerufenen Scherkräften, als auch der leberspezifischen antitumoralen Immunantwort ausgesetzt. Über mechanischen Stress, die Phagozytose durch Kupffer-Zellen und die Zytolyse durch von aktivierten NK-Zellen ausgeschütteten Perforinen und Granzymen kommt es zur Tumorzellzerstörung. Bei einer Embolie unter ischämischen Stress gesetzte Sinusoidendothelzellen sezernieren Stickoxide, ROS und toxische Radikale, die ebenfalls zum Tumorzelltod führen können. Die Kupffer-Zellen agieren als Mediatoren einer umfassenderen Entzündungsreaktion und aktivieren bzw. mobilisieren über die Sekretion von Zytokinen (z.B. Interferon- γ oder TNF α) weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten oder T-Lymphozyten (Brodt 2016, Vidal-Vanaclocha 2008). Obgleich, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, nur wenige Tumorzellen diese vielfältige, antitumorale Entzündungsreaktion überleben können, wurden jedoch auch tumorzellprotektive und damit prometastatische Wirkungen hierunter festgestellt (Luzzi et al. 1998). Über die inflammatorisch induzierte Expression von *cell adhesion molecules* (CAM), wie VCAM-1, ICAM-1 und E-selectin, auf den Sinusoid-Endothelzellen wird es den Tumorzellen ermöglicht, solitär oder in Assoziation zu einer Immunzelle (Neutrophiler Granulozyt oder Kupffer-Zelle) am Endothel zu adhären und in den Disse-Raum zu diapedieren (Brodt 2016, Vidal-Vanaclocha 2008). Hier beginnt die nach Vidal-Vinaclocha definierte zweite Phase, die intralobulär mikrometastatische oder präangiogenetische Phase. Sie ist geprägt von einer fibrogenen Stromazellrekrutierung um und in die noch avaskuläre Metastase. Durch Kupffer-Zellen über TGF- β aktivierte HMF produzieren ein kollagenreiches (hauptsächlich Kollagen I und V), desmoplastisches Stroma, in welches die Mikrometastase infiltrativ wächst (Brodt 2016, Vidal-Vanaclocha 2008). Begleitet wird dies von Makrophagen (u.a. Kupffer-Zellen) sezernierten Zytokinen wie Matrix-Metalloproteinase (MMP)- 9 und -14, die das infiltrative Wachstum der Metastase beschleunigen (Brodt 2016). Die HMF gelten als Initiatoren des Überganges der Mikrometastase in die dritte, die angiogenetische Phase. Über die Produktion und Sekretion von VEGF, Angiopoietin-1 und MMPs (MMP-2, -9, -13) stimulieren sie die Einsprossung von Gefäßen in die Metastase und orchestrieren in perizytärer Funktion ein kapillares Gefäßsystem im Bereich der Metastase (Brodt 2016, Vidal-Vanaclocha 2008). Der Übergang von der zweiten in die dritte Phase ist fließend. Beide sind kennzeichnet durch die Abhängigkeit von einer tumorpermissiven oder

sogar -protektiven Immunantwort. Unter der Einwirkung von TGF- β , sezerniert von HMF und Kupffer-Zellen, kommt es zur Ausbildung tumorprotektiver N2-Neutrophiler Granulozyten und M2-Makrophagen. Desweiteren werden *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) rekrutiert. Die MDSC hemmen tumorlytische *cluster of differentiation* (CD)8+ T-Lymphozyten und regen die Ausbildung regulatorischer T-Zellen an, die ihrerseits einen Status der Immuntoleranz gegenüber der sich ausbildenden Metastase induzieren können (Brodthorn 2016). In der letzten Phase, der Wachstumsphase, definiert Vidal-Vinaclocha die Metastase als etabliert (Vidal-Vinaclocha 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zirkulierende Tumorzellen, die den initial antitumoralen Einwirkungen des Immunsystems der Leber widerstehen, im Prozess der Extravasation und in der Ausbildung einer etablierten Metastase von einem entzündlich-veränderten Mikromilieu in der Leber profitieren. In Bezug auf das PDAC konnten Lenk et al. dem beipflichtend zeigen, dass die PDEZ *in vitro* in Anwesenheit von HMF deutlich stärker proliferieren als in Gegenwart von HSC. *In vivo* korrelierte die Größe von Lebermetastasen mit der Präsenz von HMF. So wiesen Makrometastasen in ihrer Lebermikroumgebung einen deutlich höheren Anteil an HMF auf (Lenk et al. 2017).

Überdies mehren sich die Hinweise, dass der Primarius bereits vor Ausbildung von Metastasen einen inflammatorischen Mikromilieustatus der Leber induziert. Er schafft sich damit eine „prämetastatische Nische“ mit erhöhter Empfänglichkeit des Lebermilieus für eine erfolgreiche metastatische Kolonisation. So konnten Costa-Silva et al. 2015 in einem transgenen Mausmodell nachweisen, dass PDAC-Zellen über zirkulierende Lipidvesikel (Exosomen) hepatische Kupffer-Zellen zur Ausschüttung von TGF- β anregen und damit eine inflammatorische Signalkaskade mit Aktivierung der HSC induzieren (Costa-Silva et al. 2015). Grünwald et al. wiesen 2016 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem transgenen Mausmodell die Aktivierung von HSC über einen CD63-abhängigen Signalweg durch das zirkulierende Glykoprotein *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP1) nach. Dabei zeigte sich sogar auch, dass bereits PDEZ im PanIN-Stadium zur Expression und Sekretion von TIMP1 befähigt waren. Unter der Einwirkung von TIMP1 exprimierten aktivierte HSC den *stromal-derived factor-1* (SDF-1), ein Chemokin für Migration und Diapedese von neutrophilen Granulozyten in das Parenchym der Leber (Grünwald et al. 2016). Über die

Expression von SDF-1 wird die Diapedese zirkulierender Tumorzellen in den Disse-Raum ermöglicht.

1.3 Glukosestoffwechsel

Die Verwertung und Umwandlung von Glukose dient als Hauptenergiequelle des menschlichen Organismus und ist Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher, körpereigener Produkte. Grob zusammengefasst wird der Glukosestoffwechsel in eine anaerobe und eine aerobe Phase unterteilt. Die anaerobe Phase besteht aus der Glykolyse. Ihr schließt sich der Citratzyklus an, der als eine Art „Drehscheibe“ diverse Intermediärprodukte als Ausgangssubstrate für weitere Stoffwechselwege liefert und die Verbindung beider Phasen darstellt. Die aerobe Phase besteht aus der oxidativen Phosphorylierung und findet unter obligater Einbeziehung von Sauerstoff an der mitochondrialen Membran statt. Als weiterer, wichtiger Prozess im Glukosestoffwechsel sei noch der Pentose-Phosphat-Weg (PPW) genannt, der als Abzweigung von der anaeroben Glykolyse ausgeht. Hoch adaptiv an die Energie- und Substratbedürfnisse der Zelle liefert dieser entweder Ribonukleotide für die Synthese von Nukleinsäuren oder schleust seine Substrate nach mehreren enzymatischen Umwandlungen wieder in die Glykolyse zur Energiegewinnung ein (Müller-Esterl 2018). Ein schematischer Überblick über den zellulären Glukosestoffwechsel lässt sich in Abbildung 1-2 nachvollziehen.

Die anaerobe Glykolyse findet im Zytoplasma der Zellen statt. Über zehn verschiedene Enzyme entsteht zusammengefasst aus Glukose Pyruvat. Netto entstehen dabei zwei Moleküle Adenosintriphosphat (ATP), welches als universeller Energieträger fungiert (grüne Umrandung in Abbildung 1-2) (Müller-Esterl 2018).

Das aus der anaeroben Glykolyse gewonnene Pyruvat gelangt mittels eines Protonen (H⁺)-Symporters in die Matrix der Mitochondrien und wird dort über einen multifunktionellen Enzymkomplex zu Acetyl-Coenzym A (CoA) dehydrogenisiert. Acetyl-CoA mündet dann unter Bildung von Citrat in den Citratzyklus (Müller-Esterl 2018). Der Citratzyklus ist ein geschlossener, unidirektionaler Kreislauf von neun enzymatischen Reaktionen und beginnt stets bei der Bildung von Citrat aus Oxalacetat und Acetyl-CoA. Kurz zusammengefasst wird

in der ersten Hälfte des Citratzyklus das Intermediärprodukt Isocitrat über zwei Oxidoreduktasen zweimalig zu Succinyl-CoA decarboxyliert. Nach Abspaltung von CoA wird das hieraus entstandene Succinat in der zweiten Hälfte des Citratzyklus über drei Reaktionsstufen und zwei weiteren Oxidoreduktasen zu Oxalacetat regeneriert. Die im Rahmen dieser exergonen Reaktionen frei werdenden Elektronen und Protonen werden auf die Coenzyme Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Flavinadenindinukleotid (FAD) übertragen und gelangen über diese in die oxidative Phosphorylierung. Die an dem Citratzyklus beteiligten Enzyme sind frei in der mitochondrialen Matrix gelöst. Eine Ausnahme dabei bildet der Enzymkomplex Succinatdehydrogenase (SDH). Dieser ist an der inneren mitochondrialen Membran fixiert und besteht aus vier Untereinheiten. Die beiden hydrophilen Untereinheiten Succinatdehydrogenase Subeinheit A und Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB) katalysieren die oxidative Reduktion von Succinat im Citratzyklus in der mitochondrialen Matrix. Die beiden anderen, hydrophoben Untereinheiten Succinatdehydrogenase Subeinheit C und Succinatdehydrogenase Subeinheit D befinden sich innerhalb der inneren mitochondrialen Membran und fungieren als Komplex II in der Atmungskette. Sie schleusen die aus der Reduktion von Succinat gewonnenen Elektronen direkt über reduziertes Flavinadenindinukleotid (FADH_2) in die oxidative Phosphorylierung ein. Die SDH stellt damit ein direktes Bindeglied zwischen Citratzyklus und oxidativer Phosphorylierung dar (Citratzyklus im Mitochondrium in Abbildung 1-2) (Heinrich et al. 2014, Müller-Esterl 2018).

Die oxidative Phosphorylierung findet an der inneren mitochondrialen Membran statt und lässt sich in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase werden die Elektronen von reduziertem Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und FADH_2 auf Sauerstoff übertragen. Dies erfolgt über vier große Membranproteinkomplexe (I, II, III, IV) sowie über in der Membran gelöste, mobile Überträger. Die Komplexe I, III und IV koppeln den Elektronentransport an eine Translokation von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum. Es entsteht somit ein Konzentrations- und Ladungsgradient an der inneren mitochondrialen Membran mit einem Überschuss an Protonen im Intermembranraum. In der zweiten Phase der oxidativen Phosphorylierung wird dieser Protonengradient zur Synthese von ATP genutzt. Gekoppelt an den Reflux von Protonen in

die mitochondriale Matrix synthetisiert die ATP-Synthase (Komplex IV) ATP aus Adenosindiphosphat + Phosphat (ADP+P) (Oxidative Phosphorylierung im Mitochondrium in Abbildung 1-2) (Müller-Esterl 2018).

Während die anaerobe Glykolyse lediglich zwei ATP durch Substratkettenphosphorylierung generiert, werden in der aeroben Glykolyse durch die vollständige Oxidation eines Glucosemoleküls bis zu 30 ATP synthetisiert (Müller-Esterl 2018).

Wie bereits eingangs erwähnt, ist der PPW ein hoch adaptiver Stoffwechselweg, der einerseits katabole, andererseits auch anabole Funktionen aufweist. Er findet im Zytosol der Zelle statt und wird über das Schlüsselenzym Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) initiiert. Durch Dehydratation des in der Glykolyse entstehenden Glucose-6-phosphat beginnt über G6PD der oxidative Teil des PPW. Über die Enzyme Lactonase und G6PD entsteht die Pentose Ribulose-5-phosphat. Ribulose-5-phosphat steht nach Isomerisierung zu Ribose-5-phosphat als wichtiger Grundbaustein zur Synthese von *ribonucleid acid* (RNA), DNA und nukleotidhaltigen Cofaktoren bereit. Im oxidativen Teil des PPW entstehen ebenfalls zwei Moleküle Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), die für die Regeneration von Glutathion benötigt werden. Glutathion wird als Antioxidans gegen Peroxide und zur Reduktion von oxidiertem Hämoglobin eingesetzt. Benötigt die Zelle mehr NADPH als Ribose-5-phosphat, schließt sich der nicht-oxidative (reduktive) Teil des PPW an. In diesem werden über eine Epimerase, der Transketolase und der Transaldolase, die Glykolyse-Intermediate Glycerinaldehyd-3-phosphat und Fructose-6-phosphat erzeugt. Diese können dann erneut in die Glykolyse eingespeist und so letztlich unter Generierung von ATP abgebaut werden (lila Umrandung in Abbildung 1-2) (Müller-Esterl 2018).

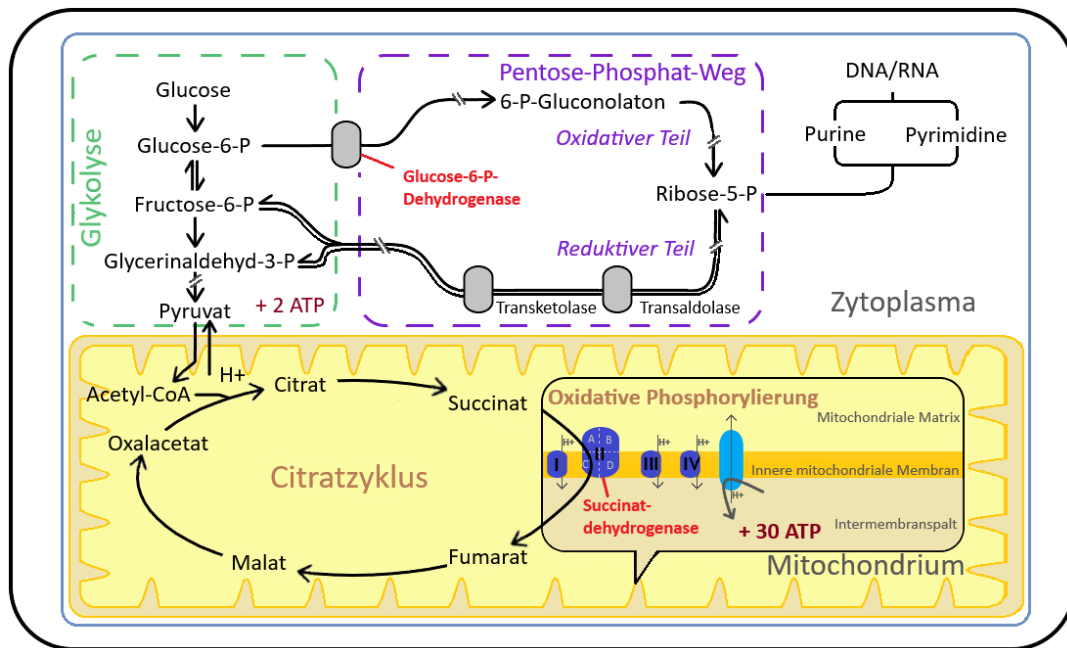


Abbildung 1-2 Schematischer Überblick über den Glukosestoffwechsel

Über die im Zytoplasma stattfindende Glykolyse entsteht aus Glukose unter Generierung von zwei Adenosintriphosphat (ATP) Pyruvat. Hiernach schließt sich der in der mitochondrialen Matrix stattfindende Citratzyklus an. Dieser unidirektionale Kreislauf besteht aus neun enzymatischen Reaktionen. Als Bindeglied und Schlüsselenzym zwischen oxidativer Phosphorylierung und Citratzyklus befindet sich die Succinatdehydrogenase (SDH) an der inneren mitochondrialen Membran. Sie besteht aus den zwei hydrophilen Untereinheiten A und B sowie den zwei hydrophoben Untereinheiten C und D. Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung entstehen über einen Elektronentransport-gekoppelten Protonengradienten mittels der ATP-Synthase bis zu 30 ATP. Der Pentose-Phosphat-Weg (PPW) ist ein adaptiver Stoffwechselweg, dessen Schlüsselenzym die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) ist. Angepasst an die Stoffwechselbedürfnisse stellt dieser entweder Pentosen als Bestandteil für Nukleinsäuren bereit oder schleust diese über den reduktiven Teils des PPW wieder in die Glykolyse ein.

1.3.1 Veränderter Metabolismus in Krebszellen und im PDAC

Bereits in den 1920er Jahren beschrieb Otto Warburg den Umstand eines veränderten Metabolismus in Tumorzellen. Er beobachtete, dass Tumorzellen paradoxerweise trotz ausreichendem Angebot an Sauerstoff ATP unter Produktion von Laktat aus der Glykolyse generierten. Otto Warburg definierte diese Form der zellulären Energiegewinnung daher später als „aerobe Glykolyse“ und schlussfolgerte, dass Tumorzellen diesen zur ATP-Produktion ineffizienteren Stoffwechselweg wählen, wenn sie nicht mehr zur oxidativen Phosphorylierung fähig sind (s. Abschnitt 1.3). Er schloss daraus, dass Krebs eine metabolische Erkrankung sei und dass der Verlust der Atmungskette in gesunden Zellen zur Ausbildung von Krebszellen führe (Warburg 1956).

Diese metabolisch-zentrierte Sichtweise zur Krebsentstehung wurde jedoch mit der Entdeckung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen im Rahmen der Molekulargenetik verworfen (Menendez et al. 2013). Ein aerob-glykolytischer metabolischer Phänotyp wurde demnach lediglich als Konsequenz eines selektiven Prozesses unter den Tumorzellen innerhalb eines schnell proliferierenden, eher minderperfundierten Tumormilieus und nicht als deren Ursache gesehen (Menendez et al. 2013). Diese Annahme war jedoch keine hinreichende Erklärung für Warburgs eingangs erwähnte Beobachtung. Vander Heiden et al. eröffneten 2009 in „*Understanding the Warburg effect*“ eine neue Sichtweise in der Betrachtung dieser Frage. Sie stellten die Hypothese auf, dass sich der Metabolismus sowohl von Tumorzellen als auch von allen weiteren, proliferierenden Zellen, nach den zellulären Bedürfnissen für die Zellteilung ausrichte. Und diese Bedürfnisse bestehen vor allem aus der Generierung der hierfür notwendigen Biomasse. Dazu zählen Makromoleküle (Nukleotide, Aminosäuren, Lipidstrukturen), Substrate (z.B. Acetyl-CoA) oder Cofaktoren (z.B. NADPH-H). Viele der genannten Moleküle lassen sich aus der Verwertung von Glukose in der aeroben Glykolyse ableiten (s. Abschnitt 1.3). Eine vollständige Verwertung der Glukose zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) zur Generierung von ATP in der oxidativen Phosphorylierung wäre demnach kontraproduktiv für eine proliferierende Tumorzelle (Vander Heiden et al. 2009).

Pavlidis et al. sprachen 2009 in „*The reverse Warburg effect*“ der oxidativen Phosphorylierung eine neue Rolle zu. Sie definierten zwei Subpopulationen innerhalb des Tumors mit unterschiedlichen Metabotypen. Die eine Population besteht aus epithelialen Tumorzellen, die einen durch die oxidative Phosphorylierung dominierten Metabolismus haben. Sie induzieren in Fibroblasten des umliegenden Stromas eine Transdifferenzierung mit Ausbildung eines glykolytischen Metabolismus. Dieses inflammativ veränderte Stromagewebe liefert die entsprechende Biomasse zur Proliferation und produziert als Endprodukte der Glykolyse Laktat und Pyruvat. Diese energiereichen Metaboliten werden dann von den epithelialen Tumorzellen aufgenommen und im Citratzyklus sowie in der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Generierung verwendet (Gonzalez et al. 2014, Pavlidis et al. 2009, Vander Heiden et al. 2009). Obgleich eine induktive Funktion epithelialer Tumorzellen in der Beeinflussung des metabolischen Phänotyps tumorassoziierter Stromazellen ungeklärt bleibt, konnte bereits in mehreren Tumoren eine symbiotische

Beziehung Laktat-produzierender und –verwertender Subpopulationen nachgewiesen werden.

Als Hanahan und Weinberg 2011 ihre „*hallmarks of cancer*“ aktualisierten, berücksichtigten sie die erworbenen Erkenntnisse zu einem veränderten Metabolismus in Tumoren. Sie fügten den maßgeblichen Einfluss aktivierter Onkogene (z.B. KRAS, c-Myc), inaktivierter Tumorsuppressorgene (z.B. TP53, Von-Hippel-Lindau-Faktor) und ganzer Expressionskaskaden (z.B. PI3K/Akt/mTOR) auf den „Metabotyp“ von Tumorzellen an. Um den maßgeblichen Einfluss eines veränderten Metabolismus auf die Tumorbilogie zu unterstreichen, nahmen sie diese Eigenschaft als „*emerging hallmark of cancer*“ auf (Hanahan und Weinberg 2011).

Im PDAC kann die Wirkung distinkter genetischer Alterationen im Ras- oder p53-Gen auf den metabolischen Phänotyp von PDAC-Tumorzellen ebenfalls nachgewiesen werden. Ein Großteil der PDAC-Tumorzellen zeigt ebenfalls eine Umregulierung des Energiehaushaltes hin zur Glykolyse unabhängig vom lokalen Angebot an Sauerstoff. 30% der Tumorzellen im PDAC sind jedoch hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und ihre glykolytische Aktivität übersteigt die der Tumorzellen in einer normoxischen Mikroumgebung im PDAC nochmals stark. Auch im PDAC konnten einerseits Laktat-produzierende als auch -konsumierende Tumorsubpopulationen in symbiotischer Wechselwirkung zueinander nachgewiesen werden (Guillaumond et al. 2014).

1.4 Das Konzept von Krebsstammzellen

Tumoren weisen eine hohe zelluläre Heterogenität auf und folgen keiner histologischen Ordnung. Lange Zeit wurde dies durch evolutionäre Prozesse genomisch instabiler Tumorzellen erklärt (Hanahan und Weinberg 2011). Durch Zellteilungen entstehen in einem proliferierenden Tumor diverse Zellklone, die sich untereinander in ihrem Geno- und Phänotyp unterscheiden. In einem darwinistischen Prozess setzen sich die Zellklone durch, die am besten an die äußeren Wachstumsbedingungen angepasst sind. Sie bilden letztlich einzelne Subpopulationen, aus denen sich die Gesamtpopulation des Tumors zusammensetzt (Fulawka et al. 2014).

Basierend auf der „Embryonaltheorie“ von Cohnheim, die besagt, dass Tumoren aus embryonalen, undifferenzierten Vorläuferzellen hervorgehen, entwickelte sich im Verlauf des 20. Jahrhunderts die Theorie der Krebsstammzellen (CSC) (Talmadge und Fidler 2010). In ihrer wegweisenden Arbeit konnten Bonnet und Dick 1997 erstmalig CSC in der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie nachweisen. Sie zeigten, dass eine distinkte Subpopulation von Leukämiezellen Stammzeleigenschaften besaßen und *in vivo* tumorinitiierendes Potential aufwies (Bonnet und Dick 1997). In soliden Tumoren wurden CSC erstmalig von Al-Hajj 2003 beim Brustkrebs nachgewiesen. Später folgten die Nachweise beim Dickdarm-, Prostata-, Ovarial- und Lungenkrebs sowie letztlich auch dem PDAC (s. Abschnitt 1.4.1) (Al-Hajj et al. 2003, Batlle und Clevers 2017, Patrawala et al. 2006).

Der Theorie nach sind CSC eine kleine Population undifferenzierter Tumorzellen, welche in der Tumorentstehung und –erhaltung eine entscheidende Rolle spielen (Aponte und Caicedo 2017). Ähnlich wie physiologische Stammzellen haben sie Selbsterneuerungspotenzial. Über eine symmetrische Zellteilung sind CSC dazu fähig, sich selbst zu replizieren und damit sowohl ihren Geno- als auch ihren Phänotypus über einen längeren Zeitraum stabil zu erhalten. Auch wenn sich die CSC im Vergleich zu anderen Tumorzellsubpopulationen nur selten teilen, ist ihr Erhalt entscheidend für das langfristige Tumorwachstum. Über eine asymmetrische Zellteilung generieren die CSC Progenitorzellen, die hoch proliferativ sind und den Großteil der Tumormasse erzeugen (Aponte und Caicedo 2017, Batlle und Clevers 2017, Najafi et al. 2019). Bei bestehender genomischer Instabilität gehen hierbei dann diverse heterogene Subklone hervor (Fulawka et al. 2014). Die ruhenden CSC zeichnen sich durch ihr niedriges Ansprechen auf konventionelle Chemotherapeutika aus. Sie werden durch die vor allem auf schnell proliferierende Gewebe ausgerichtete Systemtherapie nicht erfasst und stehen daher in dem Verdacht, nach abgeschlossener Therapie ein Tumorrezidiv initiieren zu können (Batlle und Clevers 2017, Han et al. 2013).

Physiologische Stammzellen sind umgeben von stromalen Zellen, Gefäßen und der EZM. Diese als Nische bezeichnete Mikroumgebung ist essenziell zum Schutz der Stammzellen und zum Erhalt derer Pluripotenz. Die Nische und die Stammzellen interagieren miteinander, über parakrine Signalmoleküle und Adhäsionsmoleküle treten sie in wechselseitige Kommunikation. So ergeben aus der Nische beispielsweise Wachstumssignale, die die

ruhenden Stammzellen zur Zellteilung anregen. In Tumoren interagieren die CSC ebenfalls mit ihrer Nische, welche als Tumormikroumgebung (TMU) bezeichnet wird. Die TMU beeinflusst wesentlich Selbsterneuerungspotenzial und Teilungsverhalten der CSC. Sie stellt das Überleben der CSC sicher und unterhält damit die Krebsprogression. So schafft sie ein immunpermissives Milieu zur Immunevasion der CSC, unterstützt die lokale Tumordinvasion sowie Metastasierung, wirkt proangiogenetisch, reduziert ROS und induziert Resistenzmechanismen der CSC gegenüber Chemotherapeutika (Aponte und Caicedo 2017, Fulawka et al. 2014).

Basierend hierauf entstand die Theorie, dass Krebsstammzellcharakteristika induzierbar sind und ihr Erscheinen damit variabel ist. Beeinflusst durch die TMU konvertieren die CSC zwischen mehreren Zellstatus: undifferenziert/differenziert, ruhend/proliferativ, asymmetrisch-/symmetrisch-teilend, chemoresistent/chemosensibel, invasiv (EMT)/nicht-invasiv (MET) (s. Abschnitt 1.2.1) (Batlle und Clevers 2017, Najafi et al. 2019). Hinweise für diese „Krebsstammzellplastizität“ ließen sich bereits in Lungen-, Brust- und Dickdarmkrebs erbringen (Andriani et al. 2016, Chaffer et al. 2013, Schwitalla et al. 2013). So konnte beispielsweise an Dickdarmkrebs gezeigt werden, dass bereits differenzierte Tumorzellen über einen proinflammatorischen, *nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*-abhängigen Signalweg entdifferenzieren und erneut Tumor-initiiierendes Potenzial aufweisen können (Schwitalla et al. 2013).

Aus der dargestellten Komplexität von CSC und ihrer Interaktion mit dem Mikromilieu ergeben sich neue therapeutische Ansätze und Perspektiven in der Tumorforschung (Han et al. 2013).

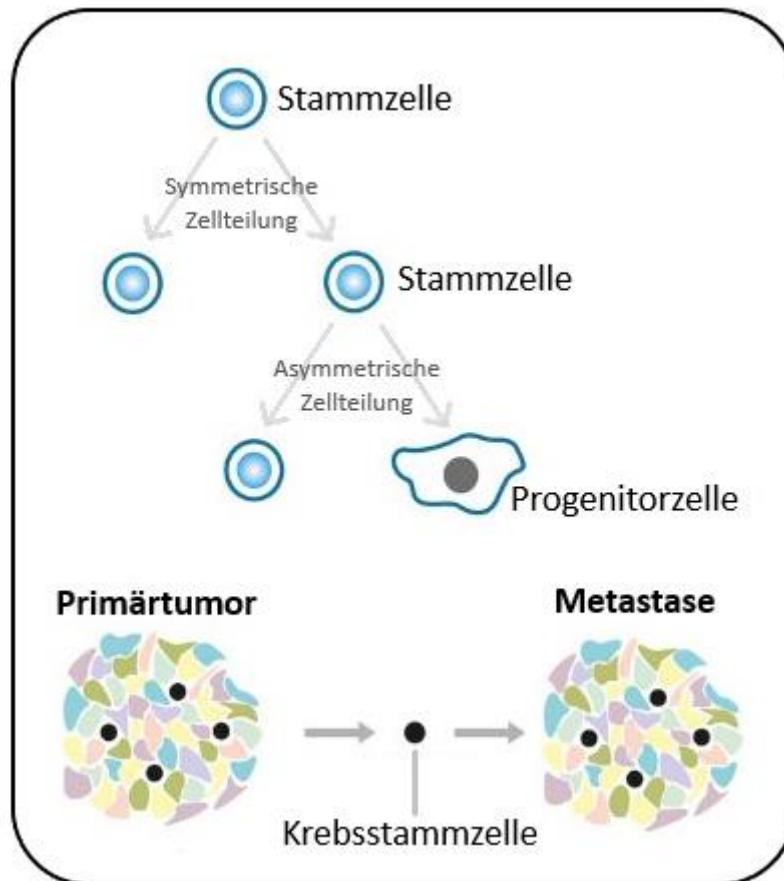


Abbildung 1-3 Das Konzept der Krebsstammzellen

Über die symmetrische Zellteilung sind Krebsstammzellen (CSC) dazu befähigt, sich selbst zu replizieren und damit die CSC-Population zu erhalten. Über eine asymmetrische Zellteilung gehen aus ihnen die hochproliferativen Progenitorzellen hervor, die den Großteil der Tumormasse generieren. Innerhalb der heterogenen Tumorzellpopulation nehmen die CSC nur eine zahlenmäßig geringe Rolle ein. Sie sind umgeben von der Tumormikroumgebung (TMU), mit welcher sie interagieren. CSC werden auch dafür verantwortlich gemacht, sekundäre Tumoren ausbilden zu können und ein Tumorrezidiv zu initiieren (Fulawka et al. 2014).

1.4.1 Der Nachweis von Krebsstammzellen generell und im PDAC

Der Erstdnachweis von CSC und deren Isolation aus der Gesamttumormasse erfolgte initial über funktionelle Assays, die entweder *in vivo* oder *in vitro* Krebsstammzeleigenschaften wie Tumorentstehungspotenzial, Selbsterneuerungspotenzial und Chemoresistenz untersuchten. Als *in vitro* Verfahren etablierte sich der *colony formation assay* (CFA) (Tan et al. 2011). Zellen aus einem Zellverband werden dabei aufgetrennt und *in vitro* als Einzelzelle neu ausgesät. Über die Anzahl und Morphologien der Kolonien, die sich aus diesen einzelnen Zellen ergeben, lassen sich Rückschlüsse über deren Stammzeleigenschaften schließen. Die

Kolonien werden ihrer Morphologie nach in Holo-, Mero- und Paraklone eingeteilt (s. Abschnitt 2.2.3). Die Holo-, Mero- und Paraklone weisen dabei in absteigender Reihenfolge Stammzeleigenschaften auf und werden stellvertretend für Zellverbände aus undifferenzierten Stammzellen (Holoklone), frühen Progenitor- (Meroklone) und späten, differenzierten Progenitorzellen (Paraklone) angesehen (Beaver et al. 2014). Die Implantation der aus einem Prostatakarzinom isolierten, verschiedenen Klontypen in Mäuse zeigte dabei, dass Zellen aus Holoklonen exklusiv die Fähigkeit besaßen, weitere Tumore *in vivo* ausbilden zu können (Beaver et al. 2014). Als *in vivo* Verfahren und Goldstandard zur Identifikation von CSC etablierte sich die Xenotransplantation einer geringen Anzahl humaner Tumorzellen in immunkompromittierte, *nonobese diabetic/severe combined immunodeficient* (NOD/SCID)-Mäuse. Über serielle Xenotransplantation von in NOD/SCID-Mäusen gewachsener Tumoren in weitere NOD/SCID-Mäuse lassen sich Rückschlüsse auf das Selbsterneuerungspotenzial und Tumorinitiierungspotenzial der Tumorzellen ziehen (Han et al. 2013).

Tumorzellpopulationen, die funktionell Stammzeleigenschaften aufwiesen, konnten anhand der Expression von Oberflächenmolekülen, intrazellulärer Enzyme, Transkriptionsfaktoren und molekularer Signalwege identifiziert und charakterisiert werden. In Bezug auf das PDAC wurde erstmalig durch Li et al. 2007 eine Tumorzellsubpopulation mit Krebsstammzeleigenschaften und der Expression der Oberflächenmoleküle CD44, CD24 und *Epithelial-Specific Antigen* (ESA) nachgewiesen (Li et al. 2007). Im Verlauf konnten noch die Oberflächenmoleküle CD133, LGR5, EpCAM, c-Met und CXCR4 mit den CSC im PDAC assoziiert werden (Dalerba und Clarke 2007, Hermann et al. 2007, Valle et al. 2018, Zhao et al. 2017a). Für die Chemoresistenz dieser CSC gerieten vor allem intrazelluläre ABC-Transporter wie *multidrug resistance gene 1* (MDR1) und *ATP-binding cassette super-family G member 2* (ABCG2), die intrazelluläre Aldehyddehydrogenase 1 Isoform und das antiapoptotische *B-cell lymphoma 2* (BCL-2)-Protein in den Fokus (Valle et al. 2018). Die Transkriptionsfaktoren Oct4, *sex determining region Y-box 2* (SRY-2 bzw. SOX-2) und Nanog gelten als Kernfaktoren für die Pluripotenz und lenken damit sämtliche Stammzeleigenschaften. Die Transkriptionfaktoren SLUG, SNAIL, Twist und ZEB 1 induzieren die EMT und können damit als Bindeglied zwischen EMT und der Plastizität der CSC gesehen

werden (Herreros-Villanueva et al. 2014, Krebs et al. 2017). Signaltransduktionswege, die mit der Entstehung und dem Erhalt von CSC assoziiert werden, konnten ebenfalls für die CSC des PDAC nachgewiesen werden. Hierbei seien exemplarisch die physiologisch in der Embryonalentwicklung aktiven Hedgehog-, Notch- und Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionswege genannt (Han et al. 2013, Valle et al. 2018). Explizit auf das PDAC bezogen wiesen Tan et al. ein erhöhtes Tumorigenitätspotenzial in Holoklonen nach Implantation in NOD/SCID-Mäusen nach. Die Holoklone zeigten eine verstärkte Expression einzelner, exemplarisch genannter Stammzellmarker und eine erhöhte Chemoresistenz (Tan et al. 2011).

1.4.2 Krebsstammzellmarker Nanog und Nestin

Wie bereits in Abschnitt 1.4.1 erwähnt, konnten bereits mehrere Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionskaskaden, Oberflächenmoleküle, Enzyme und Strukturproteine mit CSC assoziiert werden. Im folgenden Abschnitt liegt der Fokus auf den Krebsstammzellmarkern Nanog und Nestin, welche auch im Zentrum dieser Arbeit stehen.

Nanog ist ein Transkriptionsfaktor, der erstmalig in Stammzellen von Mausembryonen beschrieben wurde (Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek 2016). Er bindet an Zielgenen in der DNA und erleichtert deren Proteinbiosynthese. Er ist damit vorzugsweise im Nukleus von Zellen nachweisbar, kann jedoch auch im Zytoplasma vorkommen (Sun et al. 2014). Zusammen mit Oct4 und SOX-2 gilt Nanog als Schlüsseltranskriptionsfaktor zum Erhalt von Pluripotenz und Selbsterneuerungspotenzial von Stammzellen (Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek 2016, Herreros-Villanueva et al. 2014, Wong und Cheung 2016). Zusammen bilden sie ein Transkriptionsnetzwerk, in welchem zahlreiche, weitere Pluripotenz erhaltende Gene exprimiert werden (Gong et al. 2015). Physiologisch kommt Nanog daher mit Ausnahme von humanen Fibroblasten nur in undifferenzierten Zellen vor und kann nicht in adulten, nativen Zellen nachgewiesen werden (Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek 2016). In multiplen humanen Tumoren konnten bereits Hinweise für die essenzielle Rolle von Nanog und SOX-2 auf Tumorentstehung, -erhaltung und -progression gefunden (Sun et al. 2014, Tam und Ng 2014). In Speiseröhren-, Ovarial-, Brust-, Blasen-, Magen-, Prostata- und Leberzellkarzinomen ist die Überexpression von Nanog mit einer schlechteren Prognose, einer erhöhten Resistenz

gegenüber Chemotherapeutika und einer geringeren Differenzierung assoziiert. Im Leberzell- und Lungenkarzinom steigert Nanog über Induktion der EMT das Invasions- und Metastasierungspotenzial der Tumorzellen. Über vermehrte Translation des MDR1-Proteins steigert Nanog im Lungenkarzinom beispielweise die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin. Im Zervixkarzinom konnten Hinweise erbracht werden, dass die Expression von Nanog die Immunevasion von Tumorzellen fördern kann (Gawlik-Rzemieniewska und Bednarek 2016, Sun et al. 2014, Wong und Cheung 2016). In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von Nanog mit vermehrten Krebsstammzelleigenschaften einhergeht (Gong et al. 2015). Im PDAC wurde bereits ebenfalls eine Überexpression von Nanog festgestellt. Die Daten deuten darauf hin, dass ein erhöhtes Nanog im PDAC ebenfalls mit einer schlechteren Prognose und einer früheren Metastasierung einhergeht (Herrerros-Villanueva et al. 2014, Sun et al. 2014).

Neuroepithelial stem cell protein (Nestin) ist ein Klasse VI-Intermediärfilament, welches erstmalig 1985 in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) beschrieben wurde (Kawamoto et al. 2009). Als Teil des Zytoskeletts ist es mitverantwortlich für die mechanische Integrität und Gewebsorganisation von Zellen in einem Gewebsverband (Neradil und Veselska 2015). Im Verlauf konnte Nestin zudem in der Embryogenese von Skelettmuskel-, Herzmuskel-, Haarfollikel-, Leber- und Nierenprogenitorzellen nachgewiesen werden. In adulten Geweben wurde Nestin in Zellen nachgewiesen, welche als „reaktive Reserve“ auf Gewebsverletzungen proliferieren und differenzieren. Dazu zählen reaktive Astrozyten im ZNS, Inselzellen im Pankreas, Retinazellen im Auge, Myokardzellen im Herzmuskel, Ovalzellen in der Leber, sowie Leydigzellen im Hoden. Nestin ist vor allem dann präsent in diesen adulten Zellen, wenn diese undifferenziert, plastisch, vermehrt mobil und unter pathologischen Konditionen stehen (Kawamoto et al. 2009, Krupkova et al. 2010, Neradil und Veselska 2015). Nestin ist generell in solchen Tumoren hoch exprimiert, die aus undifferenzierten Progenitorzellen hervorgehen (Krupkova et al. 2010). Es konnte jedoch auch schon vermehrt in epithelialen Tumoren festgestellt und überdies mit vermehrten Stammzelleigenschaften in Zusammenhang gebracht werden. Im Ovarialkarzinom zeigten Tumorzellen, die vermehrt Nestin exprimierten, ein erhöhtes Tumorigenitätspotenzial und eine vermehrte Resistenz

gegenüber Chemotherapeutika. Beim Prostata-, Mundboden- und Gallenblasenkarzinom gehört Nestin neben CD-133, Nanog, SOX-2 und Oct4 zu den Zellmarkern, die in Tumorzellen mit Stammzellpotenzial vermehrt nachgewiesen wurden. Im Brustkrebs ging der Knockdown (KD) von Nestin in Tumorzellen mit einem Zellzyklusarrest, Apoptose, verminderter Migrationsfähigkeit und Arretierung einer spontanen EMT einher (Kawamoto et al. 2009, Neradil und Veselska 2015). Im PDAC nimmt Nestin als Krebsstammzellmarker eine eher kontroverse Rolle ein. In einem Mausmodell führte die Aktivierung von kRas in Nestin-positiven Zellen zur Ausbildung prämaligener PanIN (Lenz et al. 2011). In einem Xenotransplantationsmodell mit PDAC-Zellen konnte Nestin in einer Tumorsubpopulation nachgewiesen werden, welche ein erhöhtes Tumorigenitätspotenzial aufwies (Neradil und Veselska 2015). Des Weiteren konnte eine signifikante Assoziation zwischen der Expression von Nestin in Pankreastumorzellen und der Infiltration des Pankreaskarzinoms in Perineuralscheiden sowie in das Retroperitoneum nachgewiesen werden (Kawamoto et al. 2009). Die Vermutung, dass Nestin somit als prognostischer Parameter zur Beurteilung der Invasionsfähigkeit des PDAC gilt, konnte jedoch nicht vollends bestätigt werden. Eine vermehrte Expression von Nestin ging nicht mit einer schlechteren Krankheitsprognose, einer früheren Metastasierung oder einer geringeren Überlebenszeit einher. Es wird daher vermutet, dass eine Überexpression von Nestin letztlich nur Ausdruck des neurologischen Remodellings der Perineuralscheiden auf schädigende Reize ist, die sowohl im Rahmen der Infiltration von Tumorzellen als auch bei Entzündungen wie einer chronischen Pankreatitis auftreten können (Lenz et al. 2011, Neradil und Veselska 2015).

1.5 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit basiert auf den Vorerkenntnissen der Arbeitsgruppe, in der untersucht wird, inwieweit eine veränderte Mikroumgebung der Leber die Metastasierung des PDAC beeinflusst und als prämetastatische Nische sogar unterstützt. Hierfür wurde ein *in vitro* Kokultursystem etabliert, in welchem prä maligne, KRAS-mutierte H6c7eR-Kr Pankreasgangepithelzellen (im Folgenden **kRas** genannt) oder maligne duktale, KRAS-, TP53-, CDKN2a/p16-mutierte, SMAD4-WT Pankreasadenokarzinomzellen (im Folgenden **Panc1** genannt) in Wechselwirkung mit immortalisierten, murinen Leberstromazellen treten. Es wurden dabei hepatische Sternzellen M14-HSC (im Folgenden **HSC** genannt) als Modell für eine physiologische Lebermikroumgebung und hepatische Myofibroblasten M-HT (im Folgenden **HMF** genannt) als Modell für eine entzündete Lebermikroumgebung verwendet. Lenk et al. wiesen nach, dass sowohl prä maligne kRas-Zellen als auch maligne Panc1-Zellen in Kokultur mit HMF im Vergleich zur Kokultur mit HSC deutlich stärker proliferierten. In Kokultur mit HSC zeigten Panc1- und kRas-Zellen einen deutlich niedrigeren Proliferationsindex (Ki67). Zudem konnten mehr Zellen mit Dormanz-assoziierten Eigenschaften (z.B. Seneszenz-assoziierte beta-Galactosidase- und p21- Expression) nachgewiesen werden. *In vivo* bestätigte sich dieses Bild, indem Proliferationsaktivität und Größe von Lebermetastasen in einem syngenem, orthotopen PDAC-Mausmodell mit dem Nachweis von HMF in den Metastasen korrelierten (Lenk et al. 2017). Alexander Fabian befasste sich im Kontext dessen mit den Metabotypen der o.g. PDEZ. In seiner Arbeit konnte er zeigen, dass kRas-Zellen vermehrt zur oxidativen Phosphorylierung mit erhöhter Expression der Succinatdehydrogenase Subeinheit B (**SDHB**) tendierten. Panc1-Zellen hingegen zeigten hingegen einen aerob-glykolytischen Metabolismus und exprimierten vermehrt das Schlüsselenzym des oxidativen PPW Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (**G6PD**) (s. Abschnitt 1.3). Nach HSC-Kokultur exprimierten sowohl Panc1- als auch kRas-Zellen vermehrt SDHB und nach Kokultur mit HMF vermehrt G6PD (Fabian 2019). Knaack et al. konnten zeigen, dass nach Kokultur mit HSC beide PDEZ-Linien ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial *in vitro* aufwiesen. Im Vergleich zu den Panc1-Zellen konnten aus CFA mit kRas-Zellen nur selten Holo- oder Meroklone generiert werden. Insbesondere aus HSC-Kokulturen generierte Panc1-Holoklone besaßen ein hohes Maß an

Stammzeleigenschaften. Diese Holoklone zeigten entsprechend ein hohes Tumorinitiierungspotenzial *in vivo* und exprimierten vermehrt Stammzell- und EMT-Marker. Hierzu zählten u.a. ABCG2, **Nanog** und exklusiv **Nestin**. Aus HSC-Kokulturen generierte kRas-Holoklone exprimierten vermehrt Nanog (Knaack et al. 2018).

Auf Grundlage dessen wurde folgendes Modell entwickelt: In einer physiologischen Lebermikroumgebung zeigen sowohl prämaligne als auch maligne PDEZ einen dormanten Phänotyp, weisen vermehrt Krebsstammzeleigenschaften auf und generieren Energie vornehmlich aus der oxidativen Phosphorylierung. In einer entzündeten Lebermikroumgebung hingegen sind die PDEZ hoch proliferativ, weisen nur vermindert Krebsstammzeleigenschaften auf und generieren ihre Energie über einen vorwiegend glykolytischen Stoffwechsel. In den Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden die Parameter Krebsstammzeleigenschaften und Metabolismus der PDEZ in Abhängigkeit des hepatischen Mikromilieus nur isoliert betrachtet. Ein gegebenenfalls bestehender, kausaler Zusammenhang blieb indes ungeklärt.

Diese experimentelle Arbeit sollte daher folgende Fragen beantworten:

1. Beeinflussen metabolische Alterationen den Erwerb oder Verlust von Krebsstammzeleigenschaften in prämaligen und malignen PDEZ in Abhängigkeit der hepatischen Mikroumgebung?
2. Führt der Verlust von Krebsstammzellmarkern zu einem veränderten Metabolismus in prämaligen und malignen PDEZ?
3. Lässt sich hieraus eine wechselseitige Beziehung zwischen Krebsstammzeleigenschaften und dem Metabolismus prämaligener und maligner PDEZ erkennen?

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden *small interfering RNA* (siRNA) Transfektion-basierte, *in vitro* KD-Versuche mit den PDEZ unternommen. SDHB-, G6PD-, Nanog- oder Nestin-defiziente Panc1- oder kRas-Zellen wurden mit HMF oder HSC kokultiviert und dann verschiedenen analytischen Verfahren zugeführt.

Das Zellwachstum wurde durch Zellzahlbestimmung unter dem Lichtmikroskop untersucht. Im Rahmen eines CFA wurden die transfizierten PDEZ hinsichtlich ihres

Koloniebildungspotenzials und ihrer Klonogenität untersucht. Auf Proteinebene erfolgten immunfluoreszenzmikroskopische Analysen der Expression von Nanog, Nestin, SDHB und G6PD. Auf Zellpopulationsebene wurde mittels Westernblot-Verfahren die Proteinexpression von SDHB, G6PD, sowie weiterer Metabolismus-assoziiierter Proteine bestimmt. Auf RNA-Ebene erfolgte mittels *real-time quantitative polymerase chain reaction* (qRT-PCR) die Untersuchung von Nanog, Nestin und weiterer Krebsstammzellmarker. Ein Überblick über das Studiendesign und die verwendeten analytischen Verfahren ist in Abbildung 1-4 angeführt.

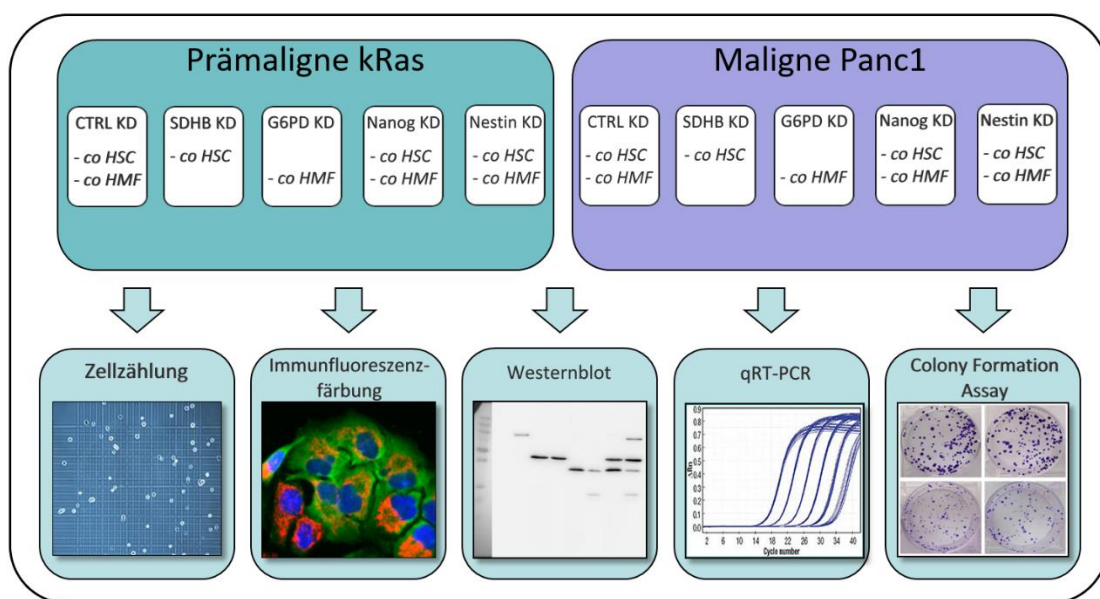


Abbildung 1-4 Studiendesign

Wie in Abschnitt 2 beschrieben, erfolgten siRNA-Transfektion-basierte Knockdown (KD)-Versuche mit prä-malignen kRas-Zellen und malignen Panc1-Zellen. Auf Basis der Vorarbeiten erfolgten SDHB-defiziente pankreatische, duktale Epithelzellen (PDEZ) Kokultur-Versuche nur mit hepatischen Sternzellen (HSC) und G6PD-defiziente PDEZ Kokultur-Versuche nur mit hepatischen Myofibroblasten (HMF). Nach 1 Woche Kokultur wurden die PDEZ mittels Zellzählung, Immunfluoreszenzfärbung, Westernblot, quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) und *colony formation assay* (CFA) analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1 Verwendete Geräte mit Angabe des Herstellers

Biologische Sicherheitswerkbänke	Hersteller
HERA Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HERA Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Inkubationsgeräte	Hersteller
BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gyrotwister Laborschüttler	Labnet international, Woodbridge, USA
HERA Cell 240 Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QBA1 Blockthermostat	Grant, Cambridge, UK
Roller mixer SRT9 stuart	Bibby Scientific, Stone, UK
W12 Wasserbad	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, D
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
WTC ED-53 Inkubationsschrank	Binder, Tuttlingen, D

Pipetten	Hersteller
Finnpipette F1 0.2-2 Mikroliter (µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F1 1-10µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F1 2-20µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F1 20-200µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finnpipette F1 100-1000µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Macro Pipette Controller	Brand, Wertheim, D
Pipetboy	Integra Biosciences, Zizers, CH
Ripette	Ritter, Schwabmünchen, D

Zentrifugen	Hersteller
Galaxy Mini	VWR, Radnor, USA
Heraeus Biofuge pico	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, D
Sprout mini centrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA

Mikroskope	Hersteller
AE2000	Motic, Wetzlar, D
Axioskop 40	Zeiss, Jena, D
Axio Scope.A1	Zeiss, Jena, D
BZ-9000 II	Keyence, Osaka, JP
EvosXL Core	AMG, Bothell, USA

Laborwaagen	Hersteller
Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB 120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

Messgeräte	Hersteller
Fusion SL Lumineszenzdetektor	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
Infinite® M200 Pro	Tecan Group, Männedorf, CH
LightCycler® 480 II	Roche, Basel, CH
NanoQuant Platte	Tecan, Crailsheim, D
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
pH 7110 pH-Meter	inoLab, Weilheim, D

Weitere Geräte	Hersteller
ARPEGE 110 Stickstofftank	AirLiquide, Paris, FR
Gefrierschrank (-20 Grad Celsius (°C))	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Genius 3	IKA, Staufen, D
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, D
MILLI-Q Reagent Water System	Merck Millipore, Billerica, US
MR Hei-Mix S Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, D
OmniPAC MIDI CS-300 Volt (V) Netzteil	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
OmniPAGE VS10D Gelkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
SD20 Semi Dry Maxi Transferkammer	Cleaver Scientific, West Sussex, GB
Ultraschallhomogenisator PG.1029	MSE, London, GB
VF2	IKA, Staufen, D
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Angabe des Herstellers

Material	Hersteller
0,05 Milliliter (ml), 0,5 ml, 1,25 ml, 5,0 ml Ritips®	Ritter, Schwabmünchen, D
0,1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nuembrecht, D
1,5 ml, 2 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, D
15 ml, 50 ml Zentrifugengefäße	Sarstedt, Nuembrecht, D
18 Millimeter (mm) Deckgläschen	Menzel, Braunschweig, D
5 ml, 10 ml, 50 ml Serumpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
6-, 12-, 96-Well-Platten, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
12-Well ThinCert™ Zellkultur-Einsätze, Porengröße 0,4 Mikrometer (µm) (Transwells)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
96-Well-PCR-Platte, weiß	Roche, Basel, CH
CryoPure Gefäß, 1,0 ml, weiß	Sarstedt, Nuembrecht, D
Micro-Touch Nitril Handschuhe	Ansell, München, D
Parafilm M	Brand, Wertheim, D
RA Lamb Deckglas und Färbegestell zum Eindecken	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
SuperFrost Objektträger, 76 x 26 mm	Menzel, Braunschweig, D
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nuembrecht, D
Uhrmacher-Pinzette Nr. 6	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Westrans Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran 0,45 µm	Th.Geyer GmbH, Renningen, D
Whatman-3MM Filterpapier	Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen Cellstar® TC, 75 Quadratcentimeter (cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellschaber 25 Zentimeter (cm)	Sarstedt, Nuembrecht, D

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2-3 Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D
6-Aminocapronat	Sigma-Aldrich, München, D
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck Millipore, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Merck Millipore, Darmstadt, D
Clarity Western ECL Substrat	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA, Pasching, A
EGF	Life Technologies, Carlsbad, USA

Ethanol 99%, vollvergällt	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, D
Ethanol, reinst	Merck Millipore, Darmstadt, D
FluorSave Reagenz	Merck Millipore, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Grams Kristallviolettlösung	Merck Millipore, Darmstadt, D
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Venlo, NL
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München, D
Isopropanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Keratinocytenmedium	Life Technologies, Carlsbad, USA
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
Methanol	Merck Millipore, Darmstadt, D
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra-pur	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumorthovanadat	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, D
Natriumpyruvat 100 Millimolar (mM)	Biochrom, Berlin, D
Opti-MEM Medium	Life Technologies, Carlsbad, USA
PageRuler Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA) 4,5% (w/v)	BUEFA Chemikalien GmbH Co. KG, Hude, D
Phosphate-buffered saline (PBS)	PAA, Pasching, A
Penicillin-Streptomycin	PAA, Pasching, A
Poly-D-Lysin 0,01%	Sigma-Aldrich, München, D
Puromycin 20 Mikrogramm (µg)/µl	Sigma-Aldrich, München, D
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, D
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid/Bisacrylamid 40% Lösung (BAA)	
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
SuperSignal West Dura	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TGF-β1 10 Milligramm (mg)/ml (rekombinant-human)	BioLegend, San Diego, USA
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, D
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat	PAA, Pasching, A
Tween	Sigma-Aldrich, München, D
Wasserstoffperoxid 30%	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, D

2.1.4 Rezepturen

Tabelle 2-4 Verwendete Lösungen mit Angabe der Rezeptur

Lösung	Rezeptur
Ammoniumperoxodisulfat 10% (APS)	1 Gramm (g) APS 10 ml aqua destillata
Blot-Puffer A	300 mM Tris-Base 20% volume per volume (v/v) Methanol pH 11
Blot-Puffer B	25 mM Tris-Base 20% (v/v) Methanol pH 10,6
Blot-Puffer C	25 mM Tris-Base 20% (v/v) Methanol 40 mM 6-Aminocapronat pH 10,6
Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer (BLOTTO)	5 g Milchpulver 100 ml Tris-buffered saline Tween (TBS-T)
PBS (10x)	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Natriumdihydrogenphosphat 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat 1000 ml aqua destillata pH 7,4
Laemmli-Puffer (2x)	128 mM Tris-Base 4,6% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerol 1 mM Natriumorthovanadat pH 7,6
Tris-buffered saline (TBS; 10x)	20 mM Tris-Base 140 mM NaCl pH 7,6
TBS-T	100 ml TBS (10x) 1000 µl Tween 20 1000 ml aqua destillata
Westernblot Farbpuffer	2,5% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,005% (w/v) Bromphenolblau Laemmli-Puffer (2x)
Westernblot Laufpuffer	15,5 g Tris-Base 72,1 g Glycin 5 g SDS 5000 ml aqua destillata
Westernblot Sammelgel	0,75 ml aqua destillata 312,5 µl Tris Puffer (pH 6,8) 162,5 µl Acrylamid 30% (w/v)

Westernblot Trenngel 10%	6,75 µl APS-Lösung 10% (w/v) 1,25 µl TEMED 0,75 ml Aqua destillata 1,5 ml Tris-Puffer (pH 8,8) 1,5 ml Acrylamid 30% (w/v) 22 µl APS-Lösung 10% 4,4 µl TEMED
--------------------------	---

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Westernblot-Antikörper

Tabelle 2-5 Verwendete Primärantikörper beim Westernblot

Antigen (Klon)	Donor / Klonalität	Stockkonzentration	Verdünnung in BLOTTO	Katalognummer
G6PD (H-160)	Kaninchen / polyklonal	0,2 mg/ml	1:1000	sc-67165*
HSP90 (H-114)	Kaninchen / polyklonal	0,2 mg/ml	1:2000	sc-7947*
SDHB (FL-280)	Kaninchen / polyklonal	0,2 mg/ml	1:1000	sc-25851*
TALDO (C-5)	Maus / IgG ₁	0,2 mg/ml	1:1000	sc-365449*
TKT (H-50)	Kaninchen / polyklonal	0,2 mg/ml	1:1000	sc-67120*

* bezogen von Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

Tabelle 2-6 Verwendete Sekundärantikörper beim Westernblot

Spezifität	Konjugat	Donor	Stockkonzentration	Verdünnung in BLOTTO	Katalognummer
Kaninchen-IgG	Meerrettich-peroxidase	Ziege	83 µg/ml	1:2000	#7074*
Maus-IgG	Meerrettich-peroxidase	Pferd	170 µg/ml	1:2000	#7076*

* bezogen von Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Tabelle 2-7 Verwendete Primärantikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen

Antigen (Klon)	Donor / Isotyp	Stockkonzentration	Verdünnung in 1% BSA in PBS mit 0,3% Triton	Katalognummer
G6PD	Maus / IgG ₁	1,050 mg/ml	1:400	ab119949*
SDHB	Kaninchen / IgG ₁	1,081 mg/ml	1:400	ab175225*

*bezogen von Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 2-8 Verwendete Sekundärantikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen

Spezifität	Konjugat	Donor	Stockkonzentration	Verdünnung in 1% BSA in PBS mit 0,3% Triton	Katalognummer
Maus-IgG	AlexaFluor 488	Ziege	2 mg/ml	1:500	#A32723*
Kaninchen-IgG	AlexaFluor 647	Ziege	2 mg/ml	1:500	#A32733*

*bezogen von Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.1.6 Small interfering RNA (siRNA)

Tabelle 2-9 Verwendete siRNA mit Angabe des Herstellers

siRNA	Stockkonzentration	Katalognummer	Hersteller
Kontroll-siRNA-A	10 Mikromolar (μ M)	sc-37007	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
G6PD siRNA	10 μ M	sc-60667	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Nanog siRNA	10 μ M	sc-43958	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Nestin siRNA	10 μ M	sc-36032	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
SDHB siRNA	10 μ M	sc-44088	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

2.1.7 Primer für die qRT-PCR

2.1.7.1 Primer des Herstellers Eurofins (Ebersberg, D)

Tabelle 2-10 Verwendete qRT-PCR Primer des Herstellers Eurofins

Primer	Primersequenz (5'-3')	Verdünnung in Nuklease-freiem Wasser	Annealing-Temperatur
ABCG2	forward	GTTTATCCGTGGTGTGTCTGG	61°C
	reverse	CTGAGCTATAGAGGCCTGGG	
GAPDH	forward	TCCATGACAACCTTTGGTATCGTGG	58°C
	reverse	GACGCCTGCTTCACCACTTCT	
Nestin	forward	GAAACAGCCATAGAGGGCAAA	58°C
	reverse	TGGTTTTCCAGAGTCTTCAGTGA	
SOX-2	forward	GCTACAGCATGATGCAGGACCA	58°C
	reverse	TCTGCGAGCTGGTCATGGAGTT	

2.1.7.2 Primer des Herstellers RealTimePrimers (via Biomol, Hamburg, D)

Tabelle 2-11 Verwendete qRT-PCR Primer des Herstellers RealTimePrimers

Primer	Primersequenz (5'-3')	Verdünnung in Nuklease-freiem Wasser	Annealing-Temperatur
Nanog	forward	ACCTACCTACCCCAGCCTTT	58°C
	reverse	CATGCAGGACTGCAGAGATT	

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 2-12 Verwendete Pankreasgangepithelzelllinien

Pankreasgangepithelzelllinie (PDEZ)	Beschreibung	Quelle
H6c7eR-Kr (kRas)	<ul style="list-style-type: none"> • teils tumorigene humane pankreatische Epithelzelllinie • immortalisiert durch transduziertes HPV-Onkoprotein E6/E7 • transduzierter retroviraler pBabepuro-K-<i>ras</i>4BG12V-Vektor • Modell für prämalignes Pankreasgangepithel 	M.S. Tsao, Toronto, Kanada (Qian et al. 2005)
PANC-1 (Panc1)	<ul style="list-style-type: none"> • Humane, maligne Pankreasgangepithelzelllinie, die aus einem Adenokarzinom des Pankreaskopfes eines 56-jährigen Mannes hervorgeht • KRAS-, TP53- und CDKN2A/p16-Mutationen • SMAD4-Wildtyp • Modell für malignes Pankreasgangepithel 	ATCC, Manassas, USA (Deer et al. 2010, Lieber et al. 1975)

Tabelle 2-13 Verwendete hepatische Stromazelllinien

Hepatische Stromazelllinie	Beschreibung	Quelle
M1-4HSC (HSC)	<ul style="list-style-type: none"> • murine immortalisierte hepatische Sternzelllinie (HSC) • aus p19ARF-defizienten Mäusen • Modell für physiologische Lebermikroumgebung 	W. Mikulits, Wien, Österreich (Proell et al. 2005)

M-HT (HMF)	<ul style="list-style-type: none"> • murine immortalisierte hepatische Myofibroblastzelllinie (HMF) • aus M1-4HSC Zellen durch TGF-β1-vermittelte Aktivierung und Transdifferenzierung • Modell für entzündliche Lebermikroumgebung 	W. Mikulits, Wien, Österreich (Proell et al. 2005)
------------	---	--

2.1.9 Medien

Tabelle 2-14 Verwendete Kulturmedien mit Angabe der Zusammensetzung

Kulturmedium (Zelllinie)	Zusammensetzung
HPDE-Medium (H6c7eR-Kr)	500 ml serumfreies Keratinozytenmedium 500 ml RPMI 1640 2,5 Nanogramm (ng)/ml EGF 5% (v/v) FKS 0,5% (v/v) L-Glutamin 25 μ g/ml Rinderhypophysenextrakt
Panc1-Medium (PANC-1)	500 ml RPMI 1640 10% (v/v) FKS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Natriumpyruvat
MiM+P/S (M1-4HSC)	500 ml DMEM High Glucose 10% (v/v) FKS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Natriumpyruvat 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin
MiM+P/S (M-HT)	500 ml DMEM High Glucose 10% (v/v) FKS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Natriumpyruvat 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin 1 ng/ml TGF- β 1*

*Direktzugabe von 10 ng TGF- β 1 in 75 cm²-Kulturflasche frisch passagierter HMF (s. Abschnitt 2.2.1.2)

Tabelle 2-15 Verwendete Kokulturmedien mit Angabe der Zusammensetzung

Kokulturmedium (Zelllinien)	Zusammensetzung
KK-Medium (H6c7eR-Kr kokultiviert mit M1-4HSC oder M-HT)	500 ml RPMI 1640 10% (v/v) L-Glutamin 10% (v/v) FKS
MiM-P/S/Panc1-Medium (PANC-1 kokultiviert mit M1-4HSC oder M-HT)	500 ml DMEM High Glucose 500 ml RPMI 1640 10% (v/v) FKS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Natriumpyruvat

2.1.10 Kits

Tabelle 2-16 Verwendete Kits mit Angabe des Herstellers

Kit	Hersteller
DC Protein Assay	BioRad Laboratories, Hercules, USA
RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Total RNA Kit peqGOLD	VWR PeqLab, Erlangen, DE

2.1.11 Software

Tabelle 2-17 Verwendete Software mit Angabe des Herstellers

Software	Hersteller
BIOREVO	Keyence, Osaka, JP
BZ Analyzer II	Keyence, Osaka, JP
FusionCapt Advance Software	Vilber Lourmat, Eberhardzell, D
i-control	Tecan Group, Männedorf, CH
LightCycler480 Software	Roche, Basel, CH
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SigmaPlot 12.5	Systat Software, Chicago, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit mit vitalen Zelllinien erfolgte zum Schutze einer Kontamination unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank, die durch filterbasierte Partikelaufräumung eines laminaren und homogen geführten Luftstromes eine sterile Arbeitsfläche schafft. Sowohl die Reinigung der Arbeitshandschuhe vor dem Hineingreifen in den sterilen Arbeitsbereich als auch die zusätzliche Reinigung der Arbeitsfläche in regelmäßigen Abständen erfolgte unter Verwendung einer 70% Isopropanollösung. Die sterilen Medien und Reagenzien wurden vor der Verwendung in einem 37°C warmen Wasserbecken vorgewärmt. Die Inkubation der verschiedenen Zellreihen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxidbegasung und 86% Humidität.

2.2.1.1 Inkulturnahme von Zelllinien

Die Lagerung der in den Versuchen verwendeten Zellreihen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Für die Konservierung wurden dabei sogenannte Kryogefäße benutzt, in dem sich die Zellen mit 10% DMSO in FKS befanden. DMSO verhindert während des Einfrierprozesses bei der Kryokonservierung nahezu vollständig die Bildung von Eiskristallen und erhält damit die Vitalität der Zellen, ist aber bei Raumtemperatur und in höheren Konzentrationen zytotoxisch, sodass es während des Auftauprozesses galt, die Zellen und das DMSO möglichst schnell voneinander zu trennen (Brayton 1986). Dies erfolgte unter vorsichtiger, aber zügiger Resuspension des Kryoansatzes mit 5 ml zelllinientypischem Nährmedium in einem 50 ml Röhrchen. Nach 5-minütiger Zentrifugation der Suspension bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) wurde der Flüssigkeitsüberstand abgenommen und das zurückbleibende Zellpellet erneut in 5 ml Nährmedium gelöst. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Das Zellpellet wurde dann schließlich in 30 ml des Nährmediums gelöst und daraufhin in drei beschrifteten 75 cm²-Kulturflaschen mit 10 ml pro Flasche überführt. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank.

2.2.1.2 Passagieren von Zelllinien

Die Zellen in den 75 cm²-Kulturflaschen verbrauchen mit der Zeit die Nährstoffe des ihnen umgebenden Kulturmediums, sie scheiden Stoffwechselprodukte aus und teilen sich. Da die verwendeten Zelllinien immortalisiert sind, erhöht sich die Anzahl der Zellen innerhalb der Zellkulturflasche exponentiell. Auf einer begrenzten Wachstumsfläche führt das unweigerlich zu einer zunehmenden Konfluenz der Zellen und zu einer erhöhten Konkurrenz um die vorhandenen Nährstoffe. Damit dieser Vorgang nicht zu einem veränderten Wachstumsverhalten, einer stressbedingten Transdifferenzierung oder sogar zum Absterben der Zellpopulation führt, ist die Passage dieser nötig.

Dies umfasste die Lösung der Zellen aus ihren Zellkulturflaschen und ihre Neuaussaat in mehrere neue Zellkulturflaschen mit frischen Kulturmedien. Dazu wurde das in der Zellkulturflasche befindliche Medium zunächst abgesaugt. Für die vollständige Auswaschung des restlichen Mediums erfolgte dann eine Waschung der Zellen mit 5 ml PBS, welches daraufhin wieder abgesaugt wurde. Um die Zellen nun von dem Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurden den PDEZ-Linien Panc1 und kRas sowie den HMF 5 ml Trypsin beigefügt, den HSC hingegen 5 ml Accutase. Es erfolgte eine Inkubationszeit im Brutschrank von 10 Minuten bei der Verwendung von Trypsin und 20 Minuten bei der Verwendung von Accutase. Unter dem Lichtmikroskop wurde daraufhin das Ablösungsergebnis beurteilt und bei unzureichendem Progress die Inkubationszeit verlängert. Sofern ausreichend viele Zellen gelöst waren, wurde die Ablösungsreaktion mit 5 ml eines mit der Zellreihe korrespondierenden, vorgewärmten Nährmediums in einem 50 ml Röhrchen gestoppt. Danach erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 1200 U/min, durch die die Zellen von dem Trypsin- bzw. Accutase-Nährmedium-Gemisch getrennt wurden. Nach vorsichtiger Absaugung des Überstandes wurden die Zellen in 20 ml eines der Zellreihe korrespondierenden, vorgewärmten Nährmediums gelöst und auf zwei neue 75 cm²-Kulturflaschen zu je 10 ml aufgeteilt. Abschließend wurden den ausgesäten HMF noch 10 ng TGF-β1 pro Zellkulturflasche zugeben. Die nun frisch passagierten Zellen wurden dann im Brutschrank inkubiert. Ebenso wurde eine Kulturflasche der alten Passage als Reserve für den Fall einer Kontamination der Zellen während des Passagevorganges aufbewahrt. Die wiederholte Passage von Zellen kann sich in Veränderungen ihres Proliferations- und

Expressionsverhaltens äußern, sodass nach maximal 15 Passagen die Zellen verworfen wurden und eine neue Zellreihe aus der Kryokonservierung in Kultur genommen wurde (s. Abschnitt 2.2.1.3). Alle Zellen wurden regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen getestet.

2.2.1.3 Konservierung der Zelllinien

Um sich einen hohen Bestand an Zellen niedriger Passage zu bewahren, können diese dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Die zu konservierenden Zellen wurden dafür aus einer 75 cm²-Kulturflasche gewonnen. Nach vorsichtigem Absaugen des alten Mediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Dieses wurde dann erneut vorsichtig abgesaugt. Danach wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche gelöst, in 5 ml PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert (s. Abschnitt 2.2.1.2). Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet dann in 1 ml 10% DMSO in FKS gelöst und in ein Kryogefäß überführt. Anschließend erfolgte die stufenweise Abkühlung der Zellen in einem vorgekühlten Kryokarussell im Gefrierschrank bei -80°C. Nach 2 Tagen wurde das Kryogefäß dann dem Kryokarussell entnommen und in einem Tank mit flüssigem Stickstoff dauerhaft aufbewahrt.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Aussaat von Zellen einer definierten Menge bei einem Versuch wurden die Neubauer-Zählkammer und die Trypanblaufärbung verwendet. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der für die Vitalitätsbestimmung von Zellen verwendet wird. Avitale Zellen nehmen im Gegensatz zu vitalen Zellen mit intakter Plasmamembran den Farbstoff auf, der intrazellulär an diverse Plasmaproteine bindet und die avitalen Zellen dadurch blau anfärbt (Adan et al. 2016). Da das Trypanblau jedoch an vitalen Zellen nach kurzer Zeit zytotoxisch wirkt, sollte die Zellzählung direkt im Anschluss an die Färbung erfolgen. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus einem Deckgläschen und einer gläsernen Grundplatte mit einem Zählraster. Für die Zählung wird das Deckgläschen angefeuchtet und unter Druck auf die Grundplatte aufgebracht. Bei korrektem Sitz des Deckgläschens auf der Grundplatte lassen sich auf diesem die sog. Newtonschen Ringe erkennen.

Bei der Zählung der Zellen zur Aussaat eines Versuches erfolgte wie bei dem Passagieren der Zellreihen zunächst die lichtmikroskopische Kontrolle, die Lösung, die Zentrifugation und die Resuspension der benötigten Zellreihe in 10 ml des entsprechenden, vorgewärmten Nährmediums (s. Abschnitt 2.2.1.2). Bei der Zellzahlbestimmung im Rahmen der Aufarbeitung erfolgte die Lösung der PDEZ aus ihrem 12-Well nach initialer PBS-Wäsche mit 1 ml Trypsin/Well. Die PDEZ wurden dann in 1 ml zellinientypischem, vorgewärmten Medium in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß von Eppendorf aufgenommen und bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die PDEZ wieder in 1 ml Medium aufgenommen.

Von den Zellsuspensionen wurden dann 18 µl abpipettiert und 2 µl Trypanblau beigefügt. Dabei war darauf zu achten, dass die Zellsuspension homogen gemischt war, um eine möglichst repräsentative Zellzahl zu ermitteln. Von den 20 µl des Zellsuspension-Trypanblau-Gemisches wurden 10 µl entnommen und unter das Deckgläschen auf die Grundplatte aufgebracht. Die Zählung der Zellen erfolgte dann unter dem Lichtmikroskop. Dabei wurden alle vitalen, nicht gefärbten Zellen, die sich auf dem Zählraster der Grundplatte befanden, gezählt. Das Zählraster teilte sich in vier Quadranten auf, bei Teilung der gezählten Zellen durch vier ergab sich dabei ein Mittelwert. Dieser wurde mit dem Kammerfaktor ($\times 10^4$) und dem Verdünnungsfaktor ($\times 10^1$) multipliziert, woraus die Zellzahl pro ml Suspension resultiert. Zur Ermittlung der Gesamtzahl vorhandener Zellen in der Suspension muss die Zellzahl pro ml Suspension mit dem vorhandenen Volumen (in der Regel 10 ml) multipliziert werden.

2.2.1.5 Kokultivierung der Zellen

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten und den Erwerb von Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ mit unterschiedlichem Metabolismus im Kontext eines veränderten hepatischen Mikromilieus zu untersuchen. Dies wurde mit einem Well-Transwell-System zur indirekten Kokultur der Zellen *in vitro* simuliert. Dabei handelte es sich um eine 12-Well-Platte, in der die Aussaat und Anzucht der PDEZ stattfand (unteres Kompartiment), und um ein einlegbares Transwell, in dem die hepatischen Stromazellen ausgesät und angezüchtet wurden (oberes Kompartiment) (Abbildung 2-1). Das Transwell verhinderte dabei einen direkten Kontakt und Zusammenwachsen der hepatischen Stromazellen mit den dukta-

Pankreasepithelzellen, jedoch standen diese über lösliche Faktoren, die durch kleine Perforationen im Boden des Transwells (Durchmesser 0,4 µm) frei diffundieren konnten, in indirektem Kontakt. Damit war es möglich die gegenseitigen, parakrinen Wechselwirkungen zwischen den kokultivierten Zellreihen selektiv in den einzelnen Zellreihen zu analysieren.

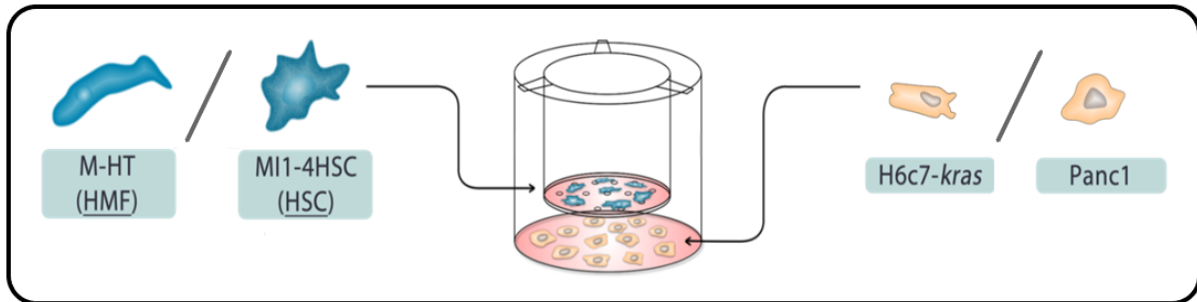


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des Well-Transwell-Systems

Die Anzucht der hepatischen Sternzellen (HSC) und hepatischen Myofibroblasten (HMF) erfolgte im Transwell (oberes Kompartiment), die Anzucht der kRas- und Panc1-Zellen erfolgte im Well (unteres Kompartiment). Beide Zellreihen interagieren indirekt über lösliche Faktoren, die über kleine Poren im Transwell frei zwischen beiden Kompartimenten diffundieren können.

2.2.1.6 Aussaat eines Versuches

Die Versuche, die in dieser Studie durchgeführt wurden, hatten eine Gesamtdauer von einer Woche. An Tag 1 des Versuches erfolgte die Aussaat der PDEZ-Linien Panc1 und kRas in jeweils 12-Well-Platten. Die Verteilung und nachfolgend geplante Aufarbeitung der Zellen aus den einzelnen Wells erfolgte nach einem festgelegten Belegungsplan. Dies beinhaltete beispielsweise, dass solche Wells, aus denen Coverslip-Färbungen gewonnen werden sollten, vor der Zellaussaat mit einem Coverslip bestückt wurden. Vor der Zellaussaat erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle von Morphologie und Menge der zu verwendenden PDEZ. Sofern diese als vital und morphologisch unauffällig eingestuft wurden, schloss sich daraufhin die Ablösung der Zellen aus der Kulturflasche und die Lösung der Zellen in 10 ml des entsprechenden, vorgewärmten Nährmediums an (s. Abschnitt 2.2.1.2). Nach Zählung der PDEZ (s. Abschnitt 2.2.1.4) wurden diese in 25 ml Medium wie folgt resuspendiert:

kRas-Zellen: 25 ml HPDE-Medium mit einer Zellkonzentration von 2×10^4 pro ml Medium.

Panc1-Zellen: 25 ml Panc1-Medium mit einer Zellkonzentration von 1×10^4 pro ml Medium.

Nach sorgfältiger Durchmischung wurde 1 ml Suspension pro Well auf die 24 Wells verteilt, sodass sich bei kRas 2×10^4 Zellen und bei Panc1 1×10^4 Zellen zu Beginn des Versuches in jedem Well befanden. Die PDEZ wurden dann für 24 Stunden zur Adhäsion in den Brutschrank gestellt.

An Tag 2 erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Aussaat des Vortages. Dabei wurden die Anzahl der angewachsenen PDEZ und die homogene Verteilung dieser in jedem Well sowie über die Gesamtheit der Wells hinweg beurteilt. Sofern dabei keine Auffälligkeiten zu erkennen waren, schloss sich daraufhin die siRNA-vermittelte Transfektion der PDEZ an (s. Abschnitt 2.2.2). Parallel dazu fand die Aussaat der hepatischen Stromazellen statt. Dafür wurden jeweils pro Zelllinie 1 ml des entsprechenden, vorgewärmten Nährmediums (MiM+P/S) in ein Well einer 12-Well-Platte gefüllt und in jedes Well ein Transwell mittels einer sterilen Pinzette eingelegt. Wie bei den am Vortag ausgesäten PDEZ erfolgte auch bei den hepatischen Stromazellen zuerst die lichtmikroskopische Kontrolle der Morphologie und Menge der zu verwendenden Passage. Dies musste gerade bei den HSC mit besonderer Sorgfalt erfolgen, da diese in Stresssituationen, wie beispielsweise einer zu hohen Zellzahl in der Kulturflasche mit konsekutivem Nährstoffmangel, in HMF transdifferenzieren. Dem schloss sich bei Unbedenklichkeit die Ablösung der Zellen aus der Kulturflasche, die Lösung der Zellen in 10 ml MiM+P/S-Medium und die Zählung der Zellen an (s. Abschnitt 2.2.1.2 und 2.2.1.4). Hier wurden jeweils für HSC und HMF eine Suspension von 25 ml MiM+P/S-Medium mit einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^4$ pro ml Medium angesetzt.

Aus jeder Zellsuspension wurde dann jeweils 1 ml in jedes Transwell gefüllt, sodass sich jeweils pro Zellreihe 24 Transwells mit einer jeweiligen Zellzahl von $2,5 \times 10^4$ zu Beginn ergaben. Auch die hepatischen Stromazellen wurden dann für 24 Stunden in den Brutschrank zur Adhärenz gestellt.

An Tag 3 des Versuches erfolgte nach initialer Kontrolle der Aussaat des Vortages die Zusammenlegung der PDEZ mit den hepatischen Stromazellen und damit der Start der Kokultivierung. Dafür war zunächst ein Medienwechsel im Well als auch im Transwell auf ein spezifisches Kokulturmedium nötig. Zunächst wurde durch vorsichtiges Einführen einer gläsernen Absaugpipette an den Rand des Wells das alte Medium um die PDEZ vorsichtig

entfernt und durch jeweils 1 ml neues, vorgewärmtes Kolkulturmedium ersetzt. Bei den Panc1-Zellen war dies MiM-P/S/Panc1-Medium, bei den kRas-Zellen war dies KK-Medium (s. Abschnitt 2.1.9). Danach wurde das Medium um die hepatischen Stromazellen in Well und Transwell auf die gleiche Weise entfernt und die Transwells zügig mit einer sterilen Pinzette in die Wells mit den PDEZ eingelegt. Die Transwells mit HSC-Kulturen und die Transwells mit HMF-Kulturen, die in Kokultivierung mit den kRas-Zellen gebracht wurden, wurden jeweils mit 1 ml KK-Medium befüllt. Solche, die in Kokultur mit Panc1-Zellen gebracht wurden, wurden jeweils dazu korrespondierend mit 1 ml MiM-P/S/Panc1-Medium befüllt. Die indirekten Kokulturen wurden dann für 5 Tage in den Brutschrank zur Inkubation gestellt und regelmäßig unter dem Lichtmikroskop auf eine bestehende Kontamination kontrolliert.

Am Ende von Tag 7 wurde die indirekte Kokultur dann beendet, das Medium aus den Transwells abgesaugt, die Transwells samt der HMF und HSC verworfen und die PDEZ ihrer entsprechenden Aufarbeitung zugeführt (s. Abschnitt 2.2.3- 2.2.8).

2.2.2 siRNA-Transfektion der PDEZ

Um die Auswirkungen und Wechselwirkungen bestimmter Metabolismus-assoziiierter Enzyme und Krebsstammzellmarker in den PDEZ zu untersuchen, wurde deren Expression in einem transienten KD-Verfahren inhibiert. Dabei wurde die siRNA-Transfektion verwendet, die zu einer transienten Gensuppression führt. Die siRNA-Transfektion beruht auf dem Prinzip der nach Fire und Mello 1998 benannten RNA-Interferenz (RNAi), welche im Folgenden grob beschrieben wird (Borkhardt 2003).

Bei der RNAi werden kurze RNA-Fragmente einer doppelsträngigen RNA über Vesikelfusion in die Zelle eingebracht, die als Einzelstränge in einen Ribonukleoproteinkomplex, den *RNA-induced silencing complex* (RISC), inkorporiert werden (Strachan und Read 2005). Der RISC stellt eine mRNA-spezifische RNA-Endonuklease dar, die hoch spezifisch mRNA-Transkripte im Zytoplasma abbaut und damit gezielt die Translation von Genen posttranskriptionell inhibiert (Borkhardt 2003).

Die siRNA-Transfektion der PDEZ fand, wie in Abschnitt 2.2.1.6 bereits beschrieben, an Tag 2 des Versuches nach 24-stündiger Inkubation der PDEZ im Brutschrank statt. Zunächst wurde

das in den Wells befindliche Kulturmedium abgesaugt und durch 1 ml neues, vorgewärmtes Kokulturmedium pro Well ersetzt. Im Anschluss erfolgte die Zusammenstellung des Transfektionsansatzes auf Eis. Dieser bestand pro transfiziertem Well aus 100 µl FKS-freiem Opti-MEM-Medium und 6 µl *HiperFect*, einem Transfektionsreagenz bestehend aus kationischen und neutralen Lipiden, welches die Lipidvesikelbildung zum Transport der siRNA in die Zelle ermöglicht. Für den KD von SDHB und G6PD wurden dem Transfektionsansatz noch 1 µl SDHB-siRNA bzw. G6PD-siRNA pro Well beigefügt, für den KD von Nanog und Nestin 2 µl Nanog-siRNA bzw. Nestin-siRNA pro Well. Für die Kontrollen wurden entsprechend 1 µl bzw. 2 µl Kontroll-siRNA verwendet. Der fertige Transfektionsansatz wurde dann für 10 Minuten zur Inkubation auf Eis belassen und anschließend tröpfchenweise unter stetigem Schwenken in das entsprechende Well pipettiert. Bei dem KD von SDHB und G6PD wurden die PDEZ dann für 8 Stunden zur Inkubation in den Brutschrank gestellt, beim KD von Nanog und Nestin betrug die Inkubationszeit 24 Stunden. Nach dieser Inkubationsphase erfolgten die lichtmikroskopische Kontrolle der transfizierten Zellen und ein Mediumwechsel mit frischem, vorgewärmtem Kokulturmedium.

2.2.3 Colony formation assay (CFA)

Der CFA ist ein Zellkulturverfahren, das das Koloniebildungspotenzial einzelner PDEZ *in vitro* erfasst. Damit lassen sich Rückschlüsse auf das Selbsterneuerungspotenzial und die Proliferations- und Teilungsfähigkeit der PDEZ ziehen (Han et al. 2013). Die Aussaat eines CFAs schloss sich direkt an das Versuchsende an Tag 7 eines Versuches an (s. Abschnitt 2.2.1.6). Die PDEZ wurden nach initialer PBS-Wäsche mit 1 ml Trypsin pro Well aus diesem gelöst, zentrifugiert, in Suspension aufgenommen und gezählt (s. Abschnitt 2.2.1.4). Danach wurden sie in Duplikaten für jede Kulturbedingung mit je 400 PDEZ in 2,5 ml des zellinientypischen Nährmediums in einer 6-Well-Platte erneut ausgesät. Je nach Wachstumsverhalten und -geschwindigkeit erfolgte dann eine Inkubationsphase von 8 bis maximal 14 Tagen im Brutschrank. Es folgte nach einmaliger Wäsche mit PBS zur Entfernung des Mediums die Fixierung der PDEZ mit 1 ml 4,5% PFA pro Well für 10 Minuten. Anschließend wurde das PFA durch zweimalige Wäsche mit destilliertem Wasser entfernt und die PDEZ mit 1 ml Grams-Kristallviolett-Lösung pro Well für 1 Stunde unter dem Abzug

bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kristallviolettlösung wurde dann über 5 Waschschriffe mit destilliertem Wasser entfernt und die PDEZ über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Unter dem Lichtmikroskop (*Evos XL Core Cell Imaging System*) wurden zur Auswertung die Anzahl der Kolonien mit einer Mindestzellzahl von 50 Zellen gezählt und deren Morphologie bestimmt (Franken et al. 2006). Die Kolonien wurden ihrer Morphologie nach in Holo-, Mero- und Paraklone aufgeteilt (Abbildung 2-2).

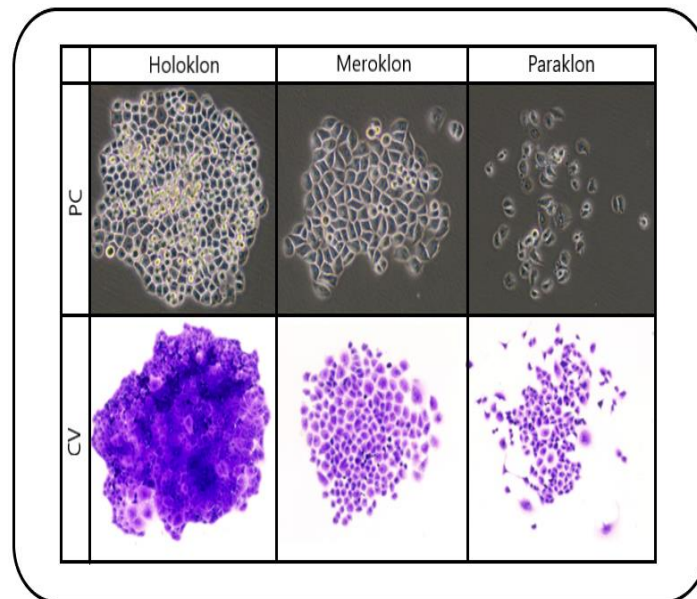


Abbildung 2-2 Darstellung eines CFA Klonen unterschiedlicher Morphologie

In der oberen Reihe sind die einzelnen Klonmorphologien in phasenkontrastmikroskopischer Ansicht (PC) exemplarisch dargestellt, in der unteren Reihe sind die Klone nach der Färbung mit Kristallviolett (CV) dargestellt. Die Einteilung erfolgte nach der Zelldichte in absteigender Reihenfolge von Holo-, über Mero- zu Paraklonen (Viol 2015).

2.2.4 Proteingewinnung aus Ganzzelllysaten

2.2.4.1 Erstellung von Ganzzelllysaten

In dieser Studie erfolgte im Rahmen der Aufarbeitung ab Tag 7 des Versuchs die Gewinnung von Ganzzelllysaten (GZL) aus den unterschiedlich kultivierten und behandelten PDEZ. Für die Lyse der Zellen wurde Laemmli-Puffer (2x), versetzt mit Natriumorthovanadat, verwendet (s. Abschnitt 2.1.4). Die Zelllysate wurden dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen gewonnen. Sofern die PDEZ zunächst für eine Zellzählung vorgesehen waren, wurde diese wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben durchgeführt. Die PDEZ wurden wieder für 5

Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden den Zellpellets 50 µl Laemmli-Puffer (2x) zugegeben. Sofern keine Zählung der PDEZ zuvor vorgesehen war, konnten die PDEZ direkt im Well lysiert werden. Dafür wurde zunächst das sich im Well befindliche Medium vorsichtig abgesaugt und die PDEZ einmalig mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS aus dem Well abgesaugt war, wurden 80 µl Laemmli-Puffer (2x) in das Well pipettiert und die Zellen damit lysiert. Diese wurden dann mit einem Zellschaber von dem Well abgelöst und in 2 ml Mikroreaktionsgefäße von Eppendorf transferiert. Alle GZL wurden dann 5x à 1 Sekunde mit 1,87 Newton (N) pro Quadratmeter (m²) mittels eines Ultraschallhomogenisators behandelt und auf Eis gestellt. Die langfristige Lagerung der GZL erfolgte bei -20°C.

2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung des GZL wurde das *BioRad Dc Protein Assay Kit* verwendet und nach Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Prinzipiell ist der Assay eine optimierte Variante des Lowry-Tests, eine seit 1951 beschriebene biochemische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. Zunächst reagieren die Peptidbindungen der Proteine des GZL mit Kupfer (II)-tartrat (Reagenz A) in einem alkalischen Milieu. Dabei entsteht ein blauvioletter Protein-Kupfer-Farbkomplex. Des Weiteren wird bei dieser Reaktion das enthaltene Kupfer (II) zu Kupfer (I) reduziert. Kupfer (I) führt wiederum in der zweiten Reaktion zur Reduktion des beigefügten Folin-Reagenzes (Reagenz B). Hieraus entstehen verschiedene blaue Reaktionsprodukte, deren Konzentration zusammen mit der des Protein-Kupfer-Farbkomplexes kolorimetrisch bei einem Absorptionsmaximum von 750 Nanometer (nm) gemessen werden kann (Lowry et al. 1951, Peterson 1979).

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden 96-Well-Platten verwendet und die im *BioRad Dc Protein Assay Kit* vorhandenen Reagenzien von 4°C auf Raumtemperatur aufgewärmt. Jede Probe bzw. Referenz wurde doppelt mit 5 µl pro Well angesetzt und jeweils 25 µl A´ (bestehend aus Reagenz A und Reagenz S im Verhältnis von 1:0,02) sowie 200 µl Reagenz B zugegeben. Als Referenz wurde eine Standardreihe aus mehreren definierten Verdünnungen von bovinem Serumalbumin (BSA) in Laemmli-Puffer (2x) mit

einer Proteinkonzentration von 0 mg/ml bis 1,55 mg/ml verwendet. Nachdem dies erfolgt war, wurde die 96-Well-Platte zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt und für 15 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde die Lichtabsorption der Proben im Photometer *Infinite® M200 Pro* bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und anhand der Lichtabsorption der Standardreihe die jeweilige Proteinkonzentration pro Well abgeleitet.

2.2.5 Westernblot

Das Westernblot-Verfahren dient dem Nachweis, der Charakterisierung und der vergleichenden Quantifizierung von Proteinen. Es lässt sich in 3 Phasen aufteilen: Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, Transfer der Proteine auf eine Trägermembran und Chemolumineszenz-basierte Immundetektion der Proteine.

2.2.5.1 Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine

Das aus den GZL der PDEZ gewonnene heterogene Proteingemisch konnte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) der Größe nach aufgetrennt und dadurch einer selektiveren Analyse zugeführt werden. Dafür wurden Proben mit einem Gesamtvolumen von 25-55 µl und einem Proteingehalt von 8-15 µg erstellt. Jeder Probe wurden in Laemmli-Puffer (2x) gelöstes SDS, der Farbstoff Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol hinzugegeben. Danach wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht, auf Eis gekühlt und kurzzeitig zentrifugiert. Das Aufkochen der Proben in Verbindung mit der Zugabe von β-Mercaptoethanol und SDS führte dabei zu einer Denaturierung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine. Dies ermöglichte die Bindung von SDS an hydrophobe Seitenketten der einzelnen Aminosäuren der Proteine. SDS fügte den Proteinen Negativladungen zu und verdeckte in einem entsprechenden Puffer effektiv die Eigenladung der Proteine. Die dadurch entstandene negative Gesamtladung der Proteine befähigte diese bei anliegender Spannung zur Migration zur Anode (Hnasko und Hnasko 2015). Nach Aufarbeitung der Proben erfolgten der Aufbau der Spannungsapparatur und das Gießen der 10 %-Polyacrylamidgele. Dabei wurde die Spannungsapparatur zunächst mit dem Trenngel und nach 30-minütigem Aushärten mit dem Sammelgel befüllt (s. Abschnitt 2.1.4). In das Sammelgel wurde abschließend zur Schaffung von Geltaschen ein Kamm mit 12 Zinken gelegt. Zum Schutz vor Austrocknung wurde das Gel mit Isopropanol bedeckt.

Nachdem das Sammelgel 30 Minuten ausgehärtet war, wurde das Isopropanol mit destilliertem Wasser und einem Filterpapier vorsichtig entfernt. Die Apparatur mit den ausgehärteten Gelen wurde dann aus dem Spannungsblock entnommen und in der mit Laufpuffer gefüllten Gelkammer *OmniPAGE VS10D* fixiert. Nach behutsamem Entfernen des Kammes konnten die entstandenen Taschen in dem ausgehärteten Gel mit den Proben befüllt werden. In die beiden Randtaschen und in die zentrale Tasche wurden anstelle einer Probe 5 µl eines Proteinstandards (*PageRuler*) pipettiert. Dabei handelt es sich um ein Gemisch vorgefärbter Proteine definierter Größe, anhand dessen die Laufhöhe der Proteine zugeordnet wurde. Nachdem die Taschen mit den Proben und dem Proteinstandard entsprechend bestückt waren, wurde im Sammelgelbereich eine Spannung von 90 V und im Trenngelbereich eine Spannung von 130 V angelegt. Anhand des in den Proben vorhandenen Farbstoffes Bromphenolblau konnte die bereits passierte Laufstrecke der Proteine verfolgt und der Verlauf der Wanderung der Proteine durch das Gel in Richtung Anode laufend kontrolliert werden. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine ist primär abhängig von ihrer Größe. Das Sammel- bzw. Trenngel wirkt in diesem Zusammenhang wie ein dreidimensionales Sieb, in dem große Proteine mit hoher Molekülmasse eher zurückgehalten werden und damit langsamer migrieren, und kleinere Proteine mit niedriger Molekülmasse freier und damit schneller Richtung Anode migrieren (Hnasko und Hnasko 2015). Kurz bevor die Bromphenolblau-Bande am unteren Rand des Trenngels angekommen war, wurde die Spannung abgenommen und die Gele aus der Kammer entnommen. Die Proteine eines GZL befanden sich nun ihrer Größe nach aufgetrennt in ihrer jeweiligen Spalte innerhalb des Gels.

2.2.5.2 Proteintransfer auf eine Trägermembran

Im Anschluss an die SDS-Page erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran im *semi-dry blotting* Verfahren mittels der *Sandwich*-Methode. Dafür wurde die zunächst hydrophobe PVDF-Membran mit Hilfe eines 1-minütigen Bades in Methanol und anschließend in destilliertem Wasser hydriert. Nachdem dies erfolgt war, konnte das *sandwich* nach folgendem Aufbau geschichtet werden. Von der Anode zur Kathode aus betrachtet, bestand dies aus sechs in Puffer A getränkten Whatman-Papieren, drei in Puffer B getränkten Whatman-Papieren, der PVDF-Membran, dem Gel und sechs in Puffer C

getränkten Whatman-Papieren (Abbildung 2-3). Danach wurde eine Stromstärke von standardmäßig 70 Milliampere (mA) pro *sandwich* für 60 Minuten über den Blots angelegt. In dieser Zeit migrierten die Proteine ihrer Ladung nach in Richtung Anode und damit auf die PVDF-Membran. Die anzulegende Stromstärke ergab sich dabei aus der Formel: $\text{Stromstärke/sandwich [mA]} = \text{Länge [Zentimeter (cm)]} \times \text{Breite [cm]} \times 1,25 \text{ mA}$. Nachdem der Proteintransfer abgeschlossen war, wurde die PVDF-Membran dem *sandwich* entnommen, für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und bei 4°C über Nacht in BLOTTO auf dem Laborschüttler inkubiert. BLOTTO bindet dabei alle noch freien Stellen auf der sehr proteinaffinen PVDF-Membran und blockiert diese für unspezifische Antikörperbindungen (Mahmood und Yang 2012).

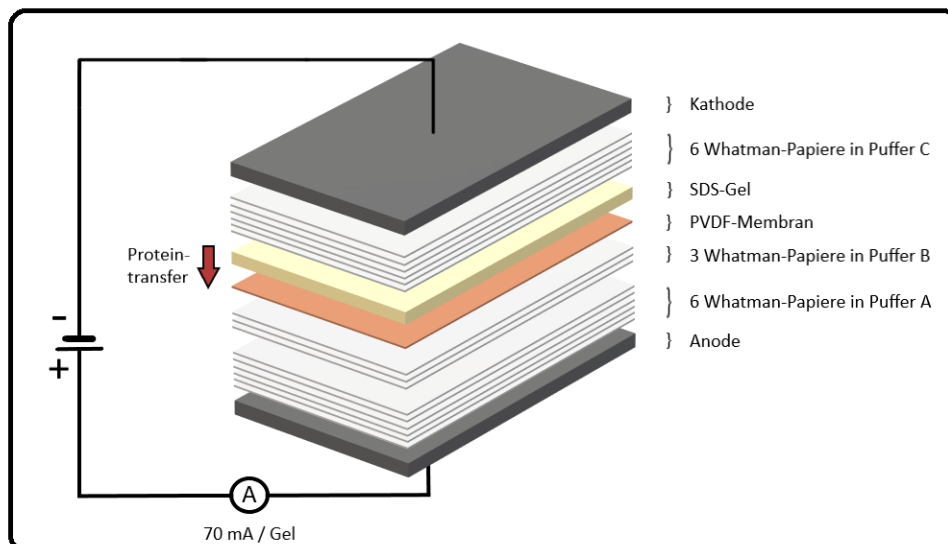


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der *sandwich*-Methode beim *semi-dry blotting*

Aufbau des *sandwiches* von der Anode zur Kathode aus betrachtet aus sechs in Puffer A getränkten Whatman-Papieren, drei in Puffer B getränkten Whatman-Papieren, der Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, dem Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gel und sechs in Puffer C getränkten Whatman-Papieren. Proteintransfer vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran anodenwärts.

2.2.5.3 Chemolumineszenz-basierte Immundetektion

Für die spezifische Färbung und Analyse einzelner Proteine auf der Membran wurden diese antikörpervermittelt detektiert und mit dem Verfahren der verstärkten Chemolumineszenz (*enhanced chemiluminescence* (ECL)) visualisiert. Dafür wurde die PVDF-Membran nach der Blockade in BLOTTO zunächst anhand der Bandenfärbung des *PageRulers* in kleinere Streifen zerschnitten. Da in dieser Studie mehrere Proteine auf der PVDF-Membran detektiert

wurden, erfolgte dies zur Vermeidung antikörpervermittelter, unspezifischer Kreuzreaktionen und chemolumineszenter Artefakte anderer, bereits detektierter Proteine. Danach wurden die einzelnen Streifen in 50 ml Röhren mit dem spezifischen Primärantikörper in entsprechender Verdünnung entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert (s. Abschnitt 2.1.5.1). Die Streifen wurden dann den Röhren entnommen und 3x 10 Minuten in TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper von diesen zu entfernen. Es folgte die Inkubation der Streifen mit dem Sekundärantikörper. In Abhängigkeit des Spenders des Primärantikörpers wurden die Streifen entweder mit einem Anti-Maus- oder einem Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert (s. Abschnitt 2.1.5.1). Nach dreimaliger Wäsche à 10 Minuten in TBS-T konnten die nun markierten Proteine mittels ECL visualisiert werden. Bei dem Sekundärantikörper handelt es sich um ein Fusionsprotein, das aus einem spezifischen Antikörper, der mit seinem Fab-Fragment an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet, und einem Reporterenzym, der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase* (HRP)) besteht. HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol oder anderen Dioxetanen in ihre oxidierte Form, die Chemolumineszenz erzeugen. Als Substratlösung für die HRP wurde *Clarity Western ECL*, eine Zweikomponentenlösung bestehend aus einem Peroxid- und einem Luminolanteil, verwendet. Sie wurde im Verhältnis 1:1 angesetzt und die Streifen wurden für 5 Minuten bei Dunkelheit darin inkubiert. Die dabei entstandene Chemolumineszenz in Form einer Proteinbande wurde dann mithilfe des *Fusion SL* detektiert und fotografiert.

Aus der vergleichenden Analyse der Leuchtintensitäten der Proteinbanden der verschiedenen Proben konnten dann Rückschlüsse auf die Quantität des detektierten Proteins innerhalb dieser gezogen werden. Um eine unregelmäßige Beladung oder eine fehlerhafte Proteinauftrennung der Proben auszuschließen, wurde eine Ladekontrolle eingesetzt. Dafür wurde das Haushaltsprotein Hitzeschockprotein 90 (HSP90) für jede Probe auf der Membran immunodetektiert und entsprechend visualisiert.

2.2.6 RNA-Gewinnung aus Proteinlysaten

2.2.6.1 RNA-Isolierung und -Aufarbeitung

Für die Isolierung und Aufreinigung der Gesamt-RNA aus den PDEZ wurde das *Total RNA Kit peqGOLD* verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden die PDEZ im Well nach initialer PBS-Wäsche mit 300 µl *Lysis Buffer T* pro Well lysiert und mittels eines Zellschabers und einer Pipette diesem entnommen. In mehreren Waschschrritten mit spezifischen Puffern und Zentrifugationsschritten über selektiv permeable bzw. reversibel bindende Membranen erfolgte die Entfernung von Zelldebris und anderer Kontaminationen sowie die Inhibition endogener bzw. exogener RNasen. Abschließend wurde die aus den PDEZ gewonnene und nun aufgereinigte RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.6.2 RNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration der extrahierten und aufgereinigten RNA wurde mit Hilfe des *Infinite® 200 PRO Microplate Reader (Tecan)* bestimmt. Dafür wurden 2 µl der in RNase-freiem Wasser gelösten RNA aus den Proben auf die Quarzgläser der *NanoQuant® Plate (Tecan)* pipettiert und ihre Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die aus der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm errechnete Extinktion OD_{260} ergibt bei Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor V und dem Umrechnungsfaktor F ($c(\text{RNA})$, bei der $OD_{260}=1$; $F=40$) [ng/µl] die Konzentration der RNA c [ng/µl]. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm OD_{280} dient dem Nachweis einer potenziellen Kontamination beispielsweise durch Proteine. Aus beiden Extinktionen wird die Ratio $OD\ 260/280$ gebildet, die als Maß für den Reinheitsgehalt der gemessenen Probe gesehen wird. Eine reine, nicht-kontaminierte RNA-Lösung besitzt dabei Werte der Ratio $OD\ 260/280$ um 2 (Hauk 2013). Nach Abschluss der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA dann im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

2.2.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion und dient dem quantitativen Nachweis sich vervielfältigender Nukleinsäuren im Rahmen einer induzierten DNA-Replikation. Hierfür wird die Fluoreszenzemission eines in die neu

synthetisierte doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffes während der Replikationszyklen, also in Echtzeit, gemessen (Holzapfel und Wickert 2007). Als Grundlage für die qRT-PCR dient die gewonnene RNA (s. Abschnitt 2.2.6). Die Quantifizierung ihrer Menge für ein spezifisches Gen-Transkript stellt ein indirektes Maß für die Genexpression des zu untersuchenden Zielgenes dar. Die qRT-PCR einer Probe läuft in drei unterschiedlichen Phasen ab. Zu Beginn, in der Startphase, ist die DNA-Menge für die PCR noch zu gering, als dass sie unter optimalen Bedingungen ablaufen kann. Dem schließt sich die exponentielle Phase an, in der die PCR unter optimalen Bedingungen abläuft und die replizierte DNA sich im Idealfall pro Zyklus verdoppeln sollte. Am Ende der exponentiellen Phase folgt die Plateauphase, in der die DNA-Menge so stark angestiegen ist, dass Produktfragmente der PCR spontan miteinander hybridisieren und damit die ablaufende Replikation hemmen. Für die Quantifizierung wird der Übergang der PCR von der Start- in die exponentielle Phase verwendet. Hierbei wird der Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz steigt, als *threshold cycle* (C_T) fixiert. Der C_T -Wert des zu untersuchenden Zielgenes wird danach auf den C_T -Wert eines Referenzgenes derselben Probe normalisiert, um eventuell divergierende RNA- bzw. DNA-Ausgangsmengen für die qRT-PCR auszugleichen. Das in dieser Studie verwendete Referenzgen war die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH zeichnet sich dabei durch seine leichte Detektionsfähigkeit und konstante Genexpression, unabhängig von Zellzyklus oder experimentellen Einflüssen aus (Holzapfel und Wickert 2007). Der normalisierte C_T -Wert kann dann als n-facher Unterschied der PDEZ mit KD im Vergleich zu denen ohne KD angegeben werden.

Für die qRT-PCR musste zunächst die gewonnene aufgearbeitete RNA unter Verwendung einer reversen Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (s. Abschnitt 2.2.7.1), bevor diese dann im zweiten Schritt als Matrix für die DNA-Polymerase der qRT-PCR verwendet werden konnte.

2.2.7.1 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription der extrahierten RNA in cDNA wurde *das RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit* der Firma Thermo Fischer Scientific verwendet. Hierbei wurden 30-200 ng

der RNA mit 1 µl eines *Oligo(dT)*-Primers auf Eis in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12,5 µl gebracht. Die Proben wurden dann für 5 Minuten bei 65°C inkubiert, auf Eis wieder abgekühlt und kurzzeitig in einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Danach wurden jeder Probe 7,5 µl eines Mastermixes aus folgenden Komponenten zugegeben: 4 µl Reaktionspuffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl einer 10 mM-konzentrierten dNTP-Lösung und 1 µl *SuperScript-IV-Reverse Transkriptase*. Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte dann bei 42°C für 60 Minuten, bevor sie mittels einer Inkubation von 5 Minuten bei 70°C gestoppt wurde. Abschließend wurde die fertig synthetisierte cDNA mit 60 µl Nuklease-freiem Wasser auf 1:4 der bisherigen Konzentration verdünnt. Sie konnte dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert werden.

2.2.7.2 cDNA-Amplifikation

Für die qRT-PCR wurden jeweils 2,5 µl der cDNA in Dupli- oder Triplikaten in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert und pro Well 7,5 µl (*Eurofins Primer*) bzw. 15 µl (*Realtimeprimers*) eines Mastermixes hinzugeben. Die Komponenten dieses Mastermixes divergierten entsprechend der Herstellerangaben für die verwendeten Primer:

- *Eurofins Primer*: verwendet für GAPDH, Nestin, SOX-2 & ABCG2

- 5 µl *SYBR Green I Mastermix* (2x)
- 1 µl *forward* Primer (vorverdünnt)
- 1 µl *reverse* Primer (vorverdünnt)
- 0,5 µl Nuklease-freies Wasser

- *Realtimeprimers*: verwendet für Nanog

- 10 µl *SYBR Green I Mastermix* (2x)
- 2 µl Primer (vorverdünnt)
- 3 µl Nuklease-freies Wasser

Die Verdünnungen der einzelnen Primer sind in Abschnitt 2.1.7 vermerkt. Danach wurde die 96-Well-PCR-Platte versiegelt, kurzzeitig zentrifugiert und für die Amplifikation in den

LightCycler® 480 II gestellt. Die qRT-PCR wurde dann mit einer maximalen Zyklusanzahl von 50 Zyklen gestartet. Die PCR-Zyklen enthielten dabei eine Dehybridisierungsphase bei 95°C für 10 Sekunden, eine Annealingphase bei einer Primer-spezifischen Temperatur für 20 Sekunden bzw. 45 Sekunden bei Nanog und eine Amplifikationsphase bei 72°C für 30 Sekunden. Da *SYBR Green I* nicht nur in der amplifizierten, doppelsträngigen DNA des Zielgens interkaliert und entsprechend fluoresziert, sondern auch in PCR-Beiprodukten bzw. Primer-Dimeren, erfolgte nach der PCR eine Schmelzkurvenanalyse der amplifizierten DNA zur Überprüfung der Spezifität des PCR-Produktes (Holzapfel und Wickert 2007).

2.2.8 Immunfluoreszenzfärbungen

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen handelte es sich in dieser Studie um Kofärbungen von SDHB oder G6PD in Kombination mit der Kernfärbung Hoechst (#33258). Die Immundetektion, Färbung und Fluoreszenzquantifizierung dieser Proteine erfolgte dabei in auf Deckgläschen gewachsenen, fixierten PDEZ. Hierfür wurde an Tag 7 des Versuches das Medium aus den Wells der PDEZ abgesaugt und die PDEZ einmalig mit PBS gewaschen (s. Abschnitt 2.2.1.6). Danach wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml 4,5% PFA pro Well fixiert. Nach dreimaliger Wäsche à 5 Minuten mit PBS wurden die PDEZ in einem zweiten Fixierungsschritt mit 1 ml eiskaltem Methanol pro Well für 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Die PDEZ wurden dann erneut dreimalig mit PBS unter Verwendung eines Laborschüttlers für jeweils 5 Minuten gewaschen und nachfolgend mit 500 µl 4% BSA in PBS mit 0,3% Triton (PBS-Triton) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Danach erfolgte die Inkubation der PDEZ in 50 µl entsprechend verdünntem Primärantikörper (s. Abschnitt 2.1.5.2) in 1% BSA in PBS-Triton in einer Feuchtkammer bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag folgte dann das dreimalige Waschen der PDEZ mit PBS-Triton à 5 Minuten und die Inkubation der PDEZ mit dem Sekundärantikörper. Die Sekundärantikörper waren je nach Donor des Primärantikörpers entsprechend Anti-Maus- bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper und mit einem Fluorochrom (*AlexaFluor 488* bzw. *AlexaFluor 647*) gekoppelt. Für die Färbung der Zellkerne wurde Hoechst (#33258), ein bei einer Wellenlänge von etwa 350 nm angeregtes, bläulich-cyan emittierendes Bisbenzimid, das in die kleine Furche der DNA interkaliert, verwendet (Bainbridge und Macey 1983, Portugal und Waring 1988). Die Inkubation der PDEZ in 50 µl entsprechend verdünntem Sekundärantikörper in 1% BSA in PBS-Triton fand

dabei für 1 Stunde in einer dunklen Feuchtkammer bei Raumtemperatur statt. Um ein Ausbleichen der Fluorochrome durch Licht zu vermeiden, erfolgten ab diesem Zeitpunkt alle Arbeitsschritte in einer Dunkelkammer. Die PDEZ wurden danach dreimalig mit PBS und einmalig mit destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend unter ihrem Deckgläschen auf einem Objektträger in *FluorSave*-Eindeckmedium eingedeckelt. Abschließend wurden die Deckgläschen dann mit transparentem Nagellack kreisrund abgedichtet und damit auf dem Objektträger fixiert.

Die Auswertung und Bildaufnahme der Färbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop *BZ-9000 II* von *Keyence*. Hierfür wurden pro Deckgläschen mehrere, repräsentative Aufnahmen in 10- bis 100-facher Vergrößerung bei den für die eingesetzten Fluorochrome entsprechenden Wellenlängen gemacht.

2.2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm *SigmaPlot 12.5* verwendet. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurde die Normalverteilung der eingegebenen Werte überprüft. Sofern die Daten normalverteilt waren, konnten diese einem parametrischen Test unterzogen werden und entsprechend verglichen werden. Dabei wurden zwei Gruppen parametrischer Daten in einem ungepaarten t-Test verglichen, multiple Gruppen parametrischer Daten hingegen mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung (*one-way repeated measures analysis of variance*). Der Vergleich nicht-normalverteilter Datensätze erfolgte bei zwei Gruppen nicht-parametrischer Daten unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests und bei multiplen Gruppen nicht-parametrischer Daten mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse der Rangplatzsummen mit dem Kruskal-Wallis-Test (*Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks*). Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 5% angenommen, sodass Daten mit einem p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant erachtet und entsprechend mit einem * markiert wurden. Daten mit einem p-Wert von $<0,01$ wurden mit einem ** markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf prämaligne und maligne PDEZ

Der Einfluss der hepatischen Mikroumgebung auf das Zellwachstum sowie die Expression von metabolischen Enzymen und Krebsstammzellmarkern wurde bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben. In Kokultur mit den HSC - stellvertretend für ein physiologisches Lebermikromilieu - zeigten die prämaligen kRas- und malignen Panc1-Zellen eine verminderte Proliferationsrate. Auf metabolischer Ebene exprimierten die PDEZ vermehrt ein Schlüsselenzym der oxidativen Phosphorylierung, die SDHB. HSC-kokultivierte PDEZ zeigten ferner ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial und bildeten mehr Holoklone aus. Diese exprimierten vermehrt Stammzellmarker wie ABCG2, Nanog und Nestin. In Kokultur mit den HMF - stellvertretend für ein entzündliches Lebermikromilieu - proliferierten die PDEZ hingegen deutlich stärker im Vergleich zur HSC-Kokultur. Weiterhin exprimierten gerade die prämaligen PDEZ vermehrt das Schlüsselenzym des PPW, die G6PD. Gegenüber der Kokultur mit den HSC zeigten die PDEZ in Kokultur mit den HMF ein vermindertes Selbsterneuerungspotenzial und bildeten entsprechend weniger Kolonien aus (s. Abschnitt 1.5) (Fabian 2019, Knaack et al. 2018, Lenk et al. 2017).

3.2 Der Einfluss der SDHB auf Wachstumsverhalten und Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ in Gegenwart einer physiologischen Lebermikroumgebung

Um nun zu untersuchen, inwieweit die vermehrte SDHB-Expression HSC-kokultivierter PDEZ das Wachstumsverhalten, das Selbsterneuerungspotenzial und die Expression der G6PD sowie Krebsstammzell-assoziiierter Proteine der PDEZ beeinflusst, erfolgte ein siRNA-vermittelter KD der SDHB-Expression in Panc1- und kRas-Zellen mit anschließender Kokultur mit HSC.

3.2.1 Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der SDHB-Expression

Zur Kontrolle der Suppression der SDHB in den PDEZ über den Kokulturzeitraum erfolgten Westernblot-Analysen der SDHB-Expression.

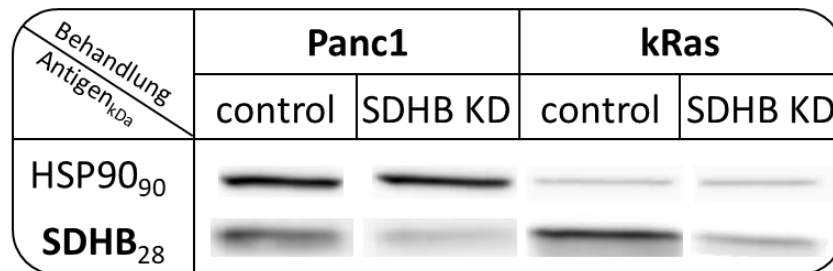


Abbildung 3-1 Westernblot-basierte Expressionsanalyse der SDHB zur Knockdown-Kontrolle

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA (control)- und andererseits SDHB-siRNA (SDHB-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus sechs Versuchen bei den Panc1-Zellen und fünf Versuchen bei den kRas-Zellen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-1 *a*).

Die siRNA-transfizierten PDEZ zeigten eine deutliche Suppression der SDHB gegenüber den control-transfizierten PDEZ für den gesamten Versuchszeitraum. Es zeigte sich jedoch auch, dass die SDHB-Expression der PDEZ nicht vollständig inhibiert wurde, da eine Restexpression in den SDHB-KD-Gruppen auf Zellpopulationsebene nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen aus Immunfluoreszenzaufnahmen der SDHB in SDHB-defizienten PDEZ, die ebenfalls zur KD-Kontrolle herangezogen wurden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Die transiente Suppression der SDHB unter HSC-Kokultur steigert das Wachstumsverhalten der PDEZ

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der PDEZ nach Kokultur mit HSC unter SDHB-KD untersucht. Hierfür wurden die siRNA-transfizierten PDEZ nach 7-tägiger Kokultur mit HSC gelöst und die Lebendzellzahlen bestimmt (s. Abschnitt 2.2.1.4).

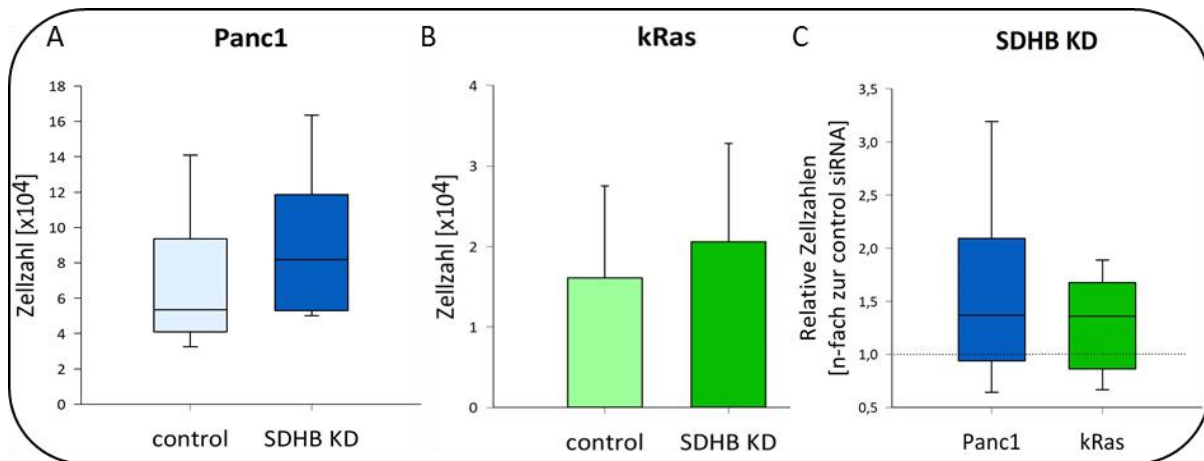


Abbildung 3-2 Lebendzellzahlen der HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression

Die Zählung der Kontroll-siRNA (control)- und Succinatdehydrogenase Subeinheit B-siRNA (SDHB-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen erfolgte nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC). Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der Panc1-Zellen (A) erfolgte unter Angabe der Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der kRas-Zellen (B) erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurden ein Mann-Whitney-U-Test (A) und ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test (B) verwendet. Zur Darstellung der relativen Zellzahlen (C) wurden die Zellzahlergebnisse der SDHB-KD-Gruppe auf die control-Gruppe normalisiert und als n-faches angegeben. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus fünf bzw. sechs unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Der KD der SDHB-Expression in HSC-kokultivierten prämaligen kRas- als auch malignen Panc1-Zellen ging mit erhöhten Lebendzellzahlen einher. Im Median betragen die Lebendzellzahlen der Panc1-Kontrollzellen $5,35 \times 10^4$, wohingegen die der SDHB-supprimierten Panc1-Zellen bei $8,19 \times 10^4$ lagen (Abbildung 3-2 A). Bei den kRas-Zellen waren die Lebendzellzahlen insgesamt niedriger im Vergleich zu denen der Panc1-Zellen, aber auch hier war der gleiche Trend wie bei den Panc1-Zellen zu verzeichnen. Im Mittel lag die Zellzahl in der control-Gruppe bei $1,61 \times 10^4$ Zellen, bei den SDHB-supprimierten Zellen hingegen bei $2,06 \times 10^4$ (Abbildung 3-2 B). Damit stieg die mediane Lebendzellzahl der HSC-kokultivierten, SDHB-supprimierten Panc1-Zellen auf das 1,36-fache und die der kRas-Zellen auf das 1,35-fache (Abbildung 3-2 C).

3.2.3 Die Suppression der SDHB-Expression beeinflusst die Krebsstammzeleigenschaften der Pankreasepithelzelllinien in unterschiedlicher Weise

Um zu klären, inwieweit sich eine verminderte Expression der SDHB nun auf Krebsstammzeleigenschaften der PDEZ in einer physiologischen Lebermikroumgebung auswirkt, erfolgten Expressionsanalysen der Krebsstammzellmarker Nanog, Nestin, SOX-2 und ABCG2 mittels RT-qPCR (s. Abschnitt 2.2.7). Mithilfe des CFA wurde das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ auf funktioneller Ebene analysiert (s. Abschnitt 2.2.3).

Die Panc1-Zellen wiesen eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors Nanog bei Suppression der SDHB-Expression nach Kokultur mit HSC auf. Normiert auf die Ergebnisse der Panc1-Zellen der control-Gruppe war die Expression von Nanog auf das 1,73-fache im Median erhöht. Die Expression des Transkriptionsfaktors SOX-2 verblieb unverändert bei Suppression der SDHB. So betrug der Median der Werte aus der SDHB-KD-Gruppe das 1,05-fache im Vergleich zur control-Gruppe. Die SDHB-supprimierten Panc1-Zellen exprimierten zudem weniger Nestin und ABCG2. So betrug die Expression von Nestin in der SDHB-KD-Gruppe das 0,85-fache und von ABCG2 das 0,87-fache im Median im Vergleich zur control-Gruppe (Abbildung 3-3 A). In Bezug nehmend auf die Expression von Nanog, Nestin und Sox-2 der Panc1-Zellen, wiesen die SDHB-supprimierten kRas-Zellen hingegen ein genau gegenläufiges Bild auf. Sie zeigten eine auf das 0,5-fache erniedrigte Nanog-, eine auf das 0,18-fache erniedrigte SOX-2- und eine auf das 2,4-fache erhöhte Nestin-Expression gegenüber der control-Gruppe. Die Expression von ABCG2 SDHB-supprimierter kRas-Zellen betrug im Median das 0,68-fache im Vergleich zur control-Gruppe und zeigte damit den gleichen Trend wie die Panc1-Zellen (Abbildung 3-3 B).

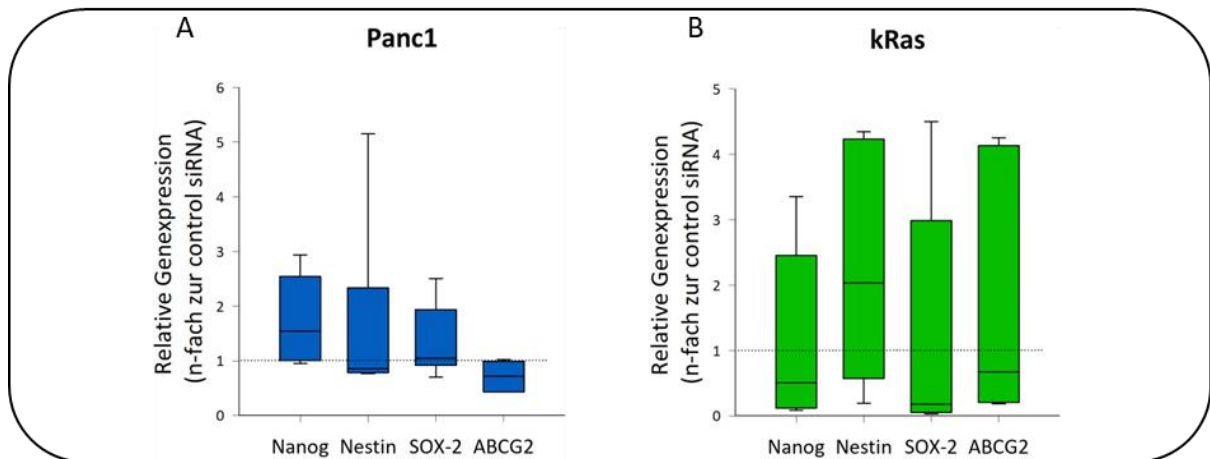


Abbildung 3-3 Expressionsanalyse von Krebsstammzellmarkern in HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression

Die Expressionsanalyse der Krebsstammzellmarker Nanog, Nestin, *sex determining region Y-box 2* (SRY-2 bzw. SOX-2) und *ATP-binding cassette super-family G member 2* (ABCG2) erfolgte an Kontroll-siRNA (control)- und Succinatdehydrogenase Subeinheit B-siRNA (SDHB-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC). Die RT-qPCR-basierte Quantifizierung der Genexpression in Panc1- (A) und kRas-Zellen (B) erfolgte als Quotient aus den C_T -Werten des Zielgens und des Referenzgens GAPDH (s. Abschnitt 2.2.7). Hiernach wurden die Werte der PDEZ aus der SDHB-KD-Gruppe auf die Werte der PDEZ aus der control-Gruppe normalisiert und als n-faches dargestellt. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus fünf bzw. sechs unabhängigen Experimenten bei Panc1-Zellen (A) und fünf unabhängigen Experimenten bei kRas-Zellen (B). Zur statistischen Testung wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Auf funktioneller Ebene beeinflusste der KD der SDHB-Suppression das Selbsterneuerungspotenzial der HSC-kokultivierten PDEZ in unterschiedlicher Weise. Die Anzahl an Gesamtkolonien, die durch Panc1-Zellen ausgebildet wurden, wurde nicht durch den KD der SDHB beeinflusst. So betrug die durchschnittliche Kolonienzahl bei den Panc1-Zellen sowohl in der control-Gruppe als auch in der SDHB-KD-Gruppe 242 Kolonien. Die kRas-Zellen hingegen bildeten bei Suppression der SDHB-Expression deutlich mehr Kolonien aus. Bei ihnen betrug die durchschnittliche Kolonienzahl 71 in der control-Gruppe, jedoch 108 in der SDHB-KD-Gruppe (Abbildung 3-4 A und B). Die prozentualen Anteile der einzelnen Klonmorphologien waren kaum verändert bei Suppression der SDHB-Expression. Bei den Panc1-Zellen betrug die Anteile der Paraklone im Median 73,1% in der control- und 73,7% in der SDHB-KD-Gruppe, der Meroklone 23,6% in der control- und 23,9% in der SDHB-KD-Gruppe, der Holoklone 1,2% in der control- und 1,1% in der SDHB-KD-Gruppe. Bei den kRas-Zellen betrug die Anteile der Paraklone im Median 97,4% in der control- und 96,5% in der

SDHB-KD-Gruppe, der Meroklone 2,6% in der control- und 3,5% in der SDHB-KD-Gruppe. Holoklone konnten bei den kRas-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3-4 C und D). Insgesamt bildeten die Panc1-Zellen im Vergleich zu den kRas-Zellen deutlich mehr Kolonien und auch mehr Holoklone, die mit erhöhten Krebsstammzeleigenschaften assoziiert sind, aus.

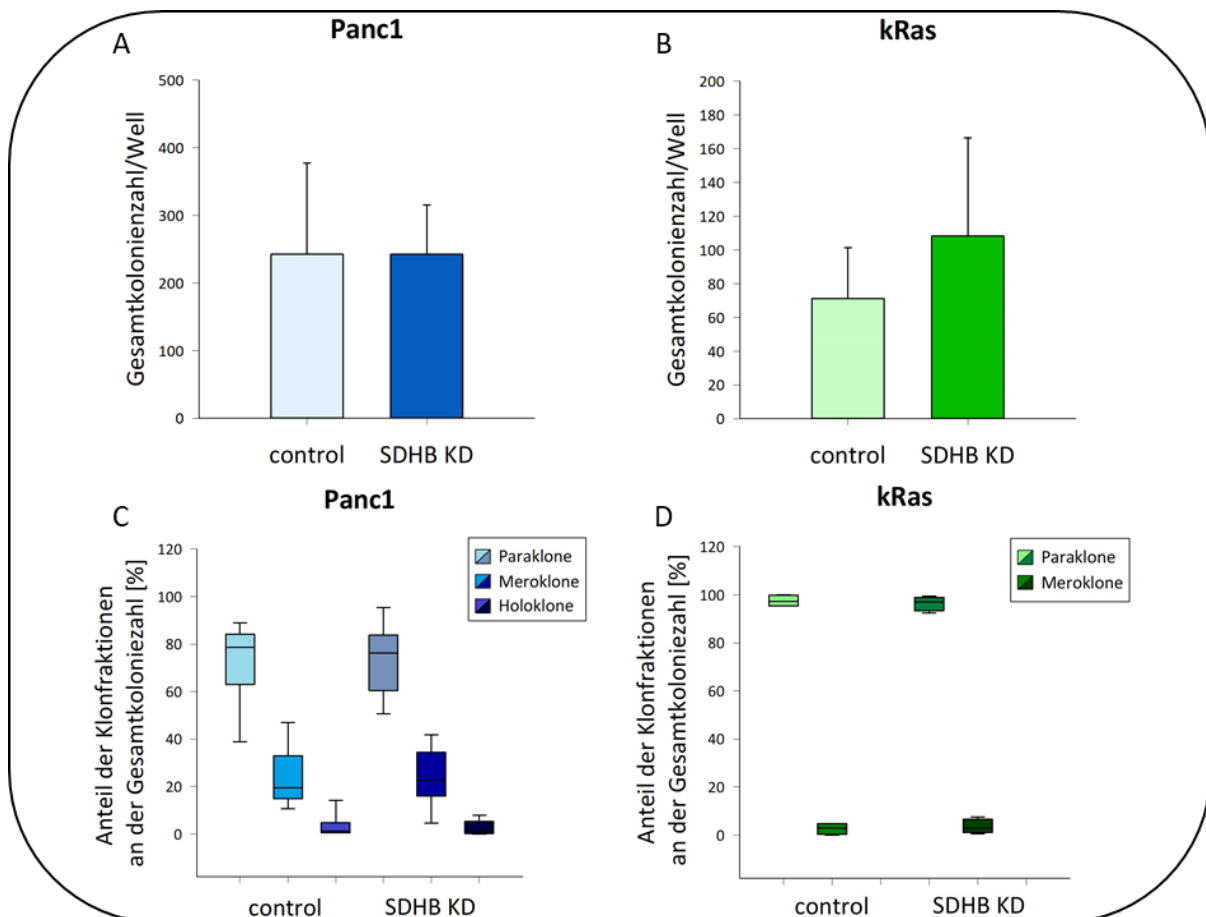


Abbildung 3-4 Selbsterneuerungspotenzial und Koloniebildungsfähigkeit von HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression

Nach 7-tägiger Kokultur von Kontroll-siRNA (control)- und Succinatdehydrogenase Subeinheit B-siRNA (SDHB-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas- Zellen mit hepatischen Sternzellen (HSC) erfolgte die Wiederaussaat zur Koloniebildung für weitere 7-14 Tage. Hiernach wurden die PDEZ gezählt und den einzelnen Koloniephänotypika zugeordnet (Holo-, Mero- und Paraklone). Die Darstellung der Gesamtkolonienzahl/Well (A/B) erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus sechs (A) bzw. vier (B) unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test verwendet. Die Darstellung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Klonmorphologien an der Gesamtkolonienzahl (C/D) erfolgte unter Angabe der Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus sechs (C) bzw. vier (D) unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurden ein Mann-Whitney-U-Test und ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test verwendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit der Suppression der SDHB-Expression unterschiedliche Effekte auf die PDEZ verknüpft waren. Die Panc1-Zellen zeigten bei Suppression der SDHB-Expression eine stärkere Genexpression der Transkriptionsfaktoren Nanog und SOX-2 und eine verminderte Genexpression von Nestin und ABCG2. Das Selbsterneuerungspotenzial der Panc1-Zellen wurde durch die Suppression der SDHB-Expression nicht beeinflusst. SDHB-supprimierte kRas-Zellen zeigten eine vermehrte Transkription von Nestin und wiesen ein deutlich höheres Selbsterneuerungspotenzial auf. Die Genexpression von Nanog, SOX-2 und ABCG2 der kRas-Zellen nahm bei Suppression der SDHB-Expression ab.

3.2.4 Bei Suppression der SDHB-Expression weisen die Panc1-Zellen eine vermehrte Expression der G6PD auf

Mit der Suppression der Expression von SDHB, einem Schlüsselenzym der oxidativen Phosphorylierung, ergeben sich für die PDEZ erhebliche Auswirkungen auf die Deckung ihres Energiebedarfes. Inwieweit sich dies nun auf die Expression der G6PD, seinerseits Schlüsselenzym der anaeroben Glykolyse, in den PDEZ auswirkt, wurde mittels Westernblot- und Immunfluoreszenz-Analyse detektiert.

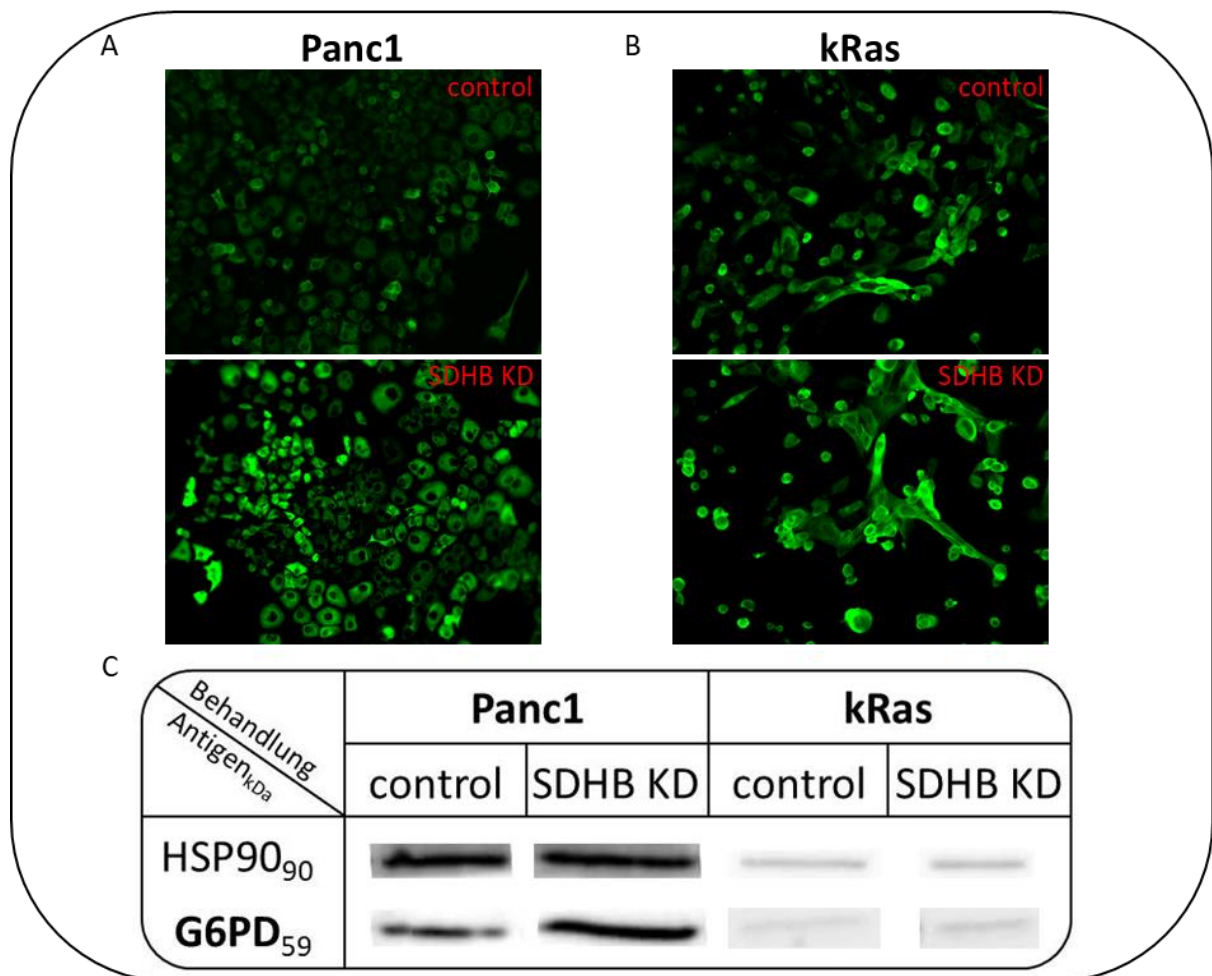


Abbildung 3-5 Expressionsanalyse der G6PD in HSC-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der SDHB-Expression

Die Immunfluoreszenzfärbung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) erfolgte an Kontroll-siRNA (control)- und Succinatdehydrogenase Subeinheit B-siRNA (SDHB-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC). Dargestellt in A und B sind Immunfluoreszenzbilder von G6PD (grün) der Panc1- (A) und kRas-Zellen (B). Im jeweils oberen Bild sind Zellen aus der control-Gruppe, im jeweils unteren Bild Zellen aus der SDHB-KD-Gruppe dargestellt. G6PD und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA- (control) und andererseits SDHB-siRNA-transfizierten (SDHB-KD) Panc1- oder kRas-Zellen detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf Versuchen bei den Panc1-Zellen und drei Versuchen bei den kRas-Zellen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-1 b).

Der Westernblot zeigt, dass die Panc1-Zellen bei Suppression der SDHB zu einer deutlich vermehrten G6PD-Expression tendierten. Exemplarisch ist hierzu eine Immunfluoreszenzaufnahme von Panc1-Zellen gezeigt, die unter Suppression der SDHB vermehrt G6PD (grün) exprimierten (Abbildung 3-5 A und C). Die kRas-Zellen zeigten im Westernblot-Verfahren hingegen eine eher schwache und zudem unveränderte G6PD-

Expression unter Suppression der SDHB. Sofern die kRas-Zellen den gleichen Trend zur vermehrten Expression von G6PD unter Suppression der SDHB wie die Panc1-Zellen zeigen würden, wäre dieser anhand der in dieser Studie erhobenen Daten nur als minimal zu werten. Die unveränderte oder gegebenenfalls minimal verstärkte Expression der G6PD in den kRas-Zellen bei Suppression der SDHB ist exemplarisch in einer hierzu korrespondierenden Immunfluoreszenzaufnahme dargestellt (Abbildung 3-5 B und C).

3.3 Der Einfluss der G6PD auf Wachstumsverhalten und Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ in Gegenwart einer entzündlichen Lebermikroumgebung

Um zu überprüfen, welche Rolle die erhöhte Expression von G6PD der PDEZ in einer entzündlichen Lebermikroumgebung einnimmt, erfolgten KD-Versuche der G6PD in HMF-kokultivierten PDEZ. Die control-transfizierten und G6PD-defizienten PDEZ wurden anschließend hinsichtlich ihres Zellwachstums, ihrer Krebsstammzeleigenschaften und ihrer Expression der SDHB untersucht.

3.3.1 Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der G6PD-Expression

Zur Kontrolle der Suppression der G6PD-Expression in PDEZ über den Kokulturzeitraum erfolgten im Rahmen der Probenaufarbeitung ebenfalls Westernblot-Analysen der G6PD-Expression.

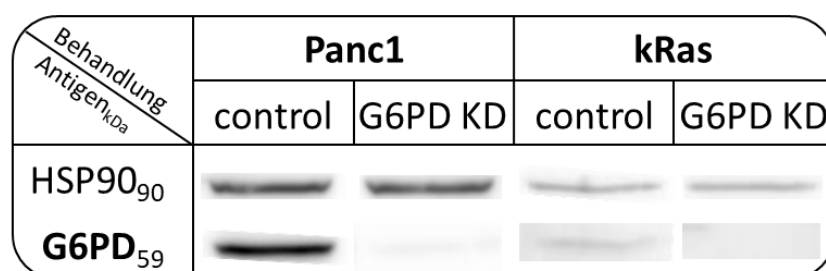


Abbildung 3-6 Westernblot-basierte Expressionsanalyse der G6PD zur Knockdown-Kontrolle

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA (control)- und andererseits G6PD-siRNA (G6PD-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach Kokultur mit hepatischen Myofibroblasten (HMF) detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus sechs Versuchen bei

den Panc1-Zellen und fünf Versuchen bei den kRas-Zellen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen sind, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-1 c).

Die siRNA-transfizierten PDEZ zeigten einen deutlichen KD der G6PD gegenüber den control-transfizierten PDEZ für den gesamten Versuchszeitraum. In der G6PD-KD-Gruppe ließ sich nur noch eine minimale Restexpression der G6PD nach 7-tägiger Kokultur mit den HMF nachweisen (Abbildung 3-6). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen aus Immunfluoreszenzaufnahmen der G6PD in G6PD-defizienten PDEZ, die ebenfalls zur KD-Kontrolle herangezogen wurden (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Die Suppression der G6PD-Expression zeigt keine hemmenden Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der PDEZ

Vander Heiden et al. begründeten den glykolytisch-dominierten Metabolismus in Krebszellen durch ihren Bedarf an Makromolekülen zur Proliferation (Vander Heiden et al. 2009). Die G6PD gilt als Schlüsselmolekül des PPW, welcher über seinen oxidativen Anteil Phosphoribonukleotide zur DNA- und RNA-Synthese generiert (s. Abschnitt 1.3). Inwieweit nun die Suppression der G6PD-Expression das Wachstumsverhalten HMF-kokultivierter PDEZ beeinflusst, wurde mittels Lebendzellzahlbestimmung G6PD-defizienter und –suffizienter PDEZ untersucht und verglichen.

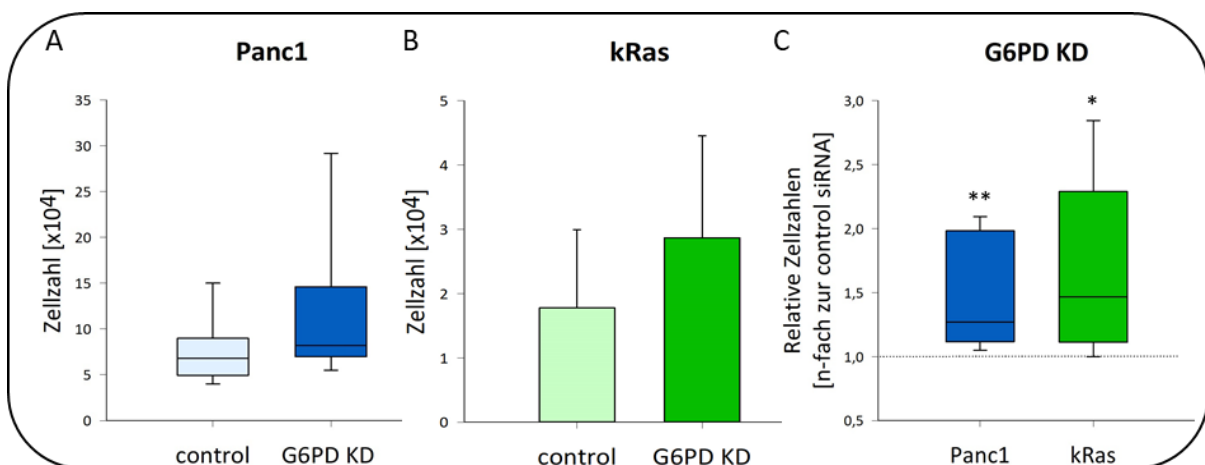


Abbildung 3-7 Lebendzellzahlen der HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression

Die Zählung der Kontroll-siRNA (control)- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-siRNA (G6PD-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen erfolgte nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Myofibroblasten (HMF). Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der Panc1-Zellen (A)

erfolgte unter Angabe der Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der kRas-Zellen (B) erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurden ein Mann-Whitney-U-Test (A) und ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test (B) verwendet. Zur Darstellung der relativen Zellzahlen (C) wurden die Zellzahlergebnisse der G6PD-KD-Gruppe auf die control-Gruppe normalisiert und als n-faches angegeben. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus fünf bzw. sechs unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Signifikante Unterschiede aus der G6PD-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem *, bei einem $p < 0,01$ mit einem ** markiert.

Sowohl die Panc1- als auch die kRas-Zellen zeigten deutlich höhere Lebendzellzahlen in der G6PD-KD-Gruppe. Die Lebendzellzahlen der Panc1-Zellen in der control-Gruppe betragen im Median $6,8 \times 10^4$ und die der G6PD-supprimierten Panc1-Zellen $8,19 \times 10^4$ (Abbildung 3-7 A). Bei den kRas-Zellen betragen die Lebendzellzahlen im Mittel in der control-Gruppe $1,78 \times 10^4$ und bei den G6PD-supprimierten kRas-Zellen $2,87 \times 10^4$ (Abbildung 3-7 B). Damit stieg die mediane Lebendzellzahl der HMF-kokultivierten, G6PD-supprimierten Panc1-Zellen signifikant auf das 1,27-fache ($p = 0,002$) und die der kRas-Zellen signifikant auf das 1,46-fache ($p = 0,032$) (Abbildung 3-7 C).

3.3.3 Die Krebsstammzeleigenschaften der PDEZ in einer entzündlichen Lebermikroumgebung werden nicht durch die Suppression der G6PD-Expression gemindert

Um zu klären, ob die Suppression der G6PD-Expression einen Einfluss auf Krebsstammzeleigenschaften der PDEZ in einer entzündlichen Lebermikroumgebung hat, erfolgte eine Expressionsanalyse der Krebsstammzellmarker Nanog, Nestin, SOX-2 und ABCG2 mittels RT-qPCR (s. Abschnitt 2.2.7). Mithilfe des CFA wurde das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ auf funktioneller Ebene analysiert (s. Abschnitt 2.2.3).

Die HMF-kokultivierten Panc1-Zellen der G6PD-KD-Gruppe zeigten im Vergleich zur control-Gruppe eine auf das im Median 0,62-fache erniedrigte Expression des Transkriptionsfaktors Nanog. Die Expression des Transkriptionsfaktors SOX-2 verblieb unverändert. Der Krebsstammzellmarker Nestin wurde von den Panc1-Zellen der G6PD-KD-Gruppe leichtgradig vermehrt exprimiert. So betrug die Expression von Nestin bei den Panc1-Zellen in der G6PD-KD-Gruppe im Median das 1,27-fache der Expression von Nestin bei den Panc1-

Zellen in der control-Gruppe. Der G6PD-KD führte zu einer deutlich verminderten Expression von ABCG2 in den Panc1-Zellen. So betrug die Expression von ABCG2 G6PD-defizienter Panc1-Zellen das 0,45-fache im Vergleich zur control-Gruppe (Abbildung 3-8 A). Die G6PD-supprimierten kRas-Zellen zeigten im Vergleich zur control-Gruppe eine auf das 1,37-fache erhöhte Nanog-Expression. Der KD der G6PD-Expression führte in den kRas-Zellen hingegen zu einer signifikant verminderten Expression des Transkriptionsfaktors SOX-2 ($p=0,004$). So betrug die Expression der G6PD-defizienten kRas-Zellen im Vergleich zu denen in der control-Gruppe im Median das 0,125-fache. Der KD der G6PD-Expression zeigte keine Auswirkung auf die Expression von Nestin bei den kRas-Zellen. Die Expression von ABCG2 G6PD-supprimierter kRas war im Vergleich zur control-Gruppe auf das 1,75-fache im Median erhöht (Abbildung 3-8 B).

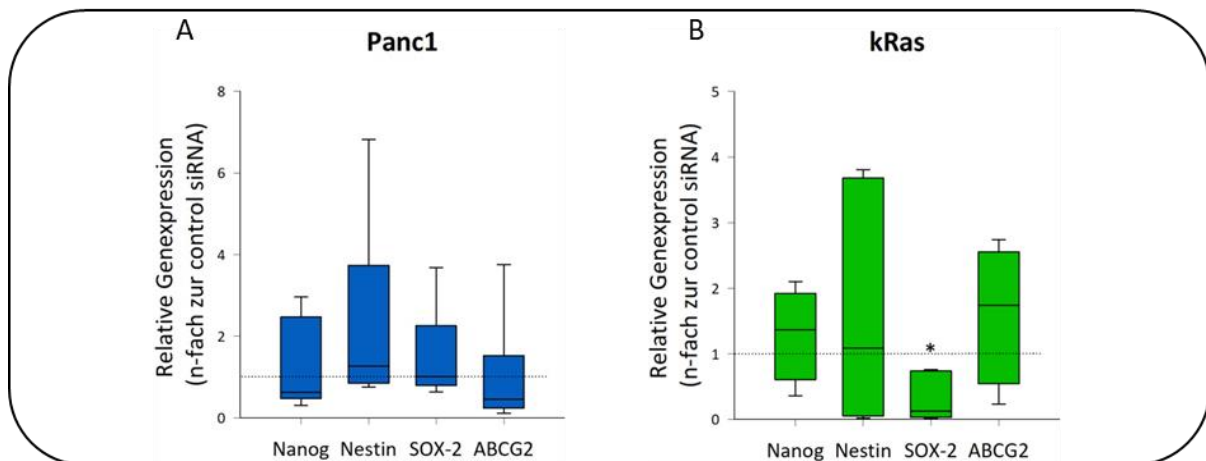


Abbildung 3-8 Expressionsanalyse von Krebsstammzellmarkern in HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression

Die Expressionsanalyse der Krebsstammzellmarker Nanog, Nestin, *sex determining region Y-box 2* (SRY-2 bzw. SOX-2) und *ATP-binding cassette super-family G member 2* (ABCG2) erfolgten an Kontroll-siRNA (control)- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-siRNA (G6PD KD)-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Myofibroblasten (HMF). Die RT-qPCR-basierte Quantifizierung der Genexpression in Panc1- (A) und kRas-Zellen (B) erfolgte als Quotient aus den C_T -Werten des Zielgens und des Referenzgens GAPDH (s. Abschnitt 2.2.7). Hiernach wurden die Werte der PDEZ aus der G6PD-KD-Gruppe auf die Werte der PDEZ aus der control-Gruppe normalisiert und als n-faches dargestellt. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus sechs unabhängigen Experimenten bei Panc1-Zellen (A) und vier bzw. fünf unabhängigen Experimenten bei kRas-Zellen (B). Zur statistischen Testung wurde ein Mann-Whitney-U-Test verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus der G6PD-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem * für das entsprechende Gen markiert.

Im CFA wiesen sowohl die Panc1- als auch die kRas-Zellen ein leicht erhöhtes Koloniebildungspotenzial bei Suppression der G6PD-Expression auf. So betragen die durchschnittlichen Gesamtkolonienzahlen bei den Panc1-Zellen in der control-Gruppe 197 und in der G6PD-KD-Gruppe 239. In der control-Gruppe bildeten die kRas-Zellen durchschnittlich 85 Kolonien und in der G6PD-KD-Gruppe 114 Kolonien aus (Abbildung 3-9 A und B). Bei den Panc1-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 73,2% in der control- und 69,7% in der G6PD-KD-Gruppe, der Meroklone 24,5% in der control- und 28% in der G6PD-KD-Gruppe, sowie der Holoklone 1,6% in der control- und 0,6% in der G6PD-KD-Gruppe. Bei den kRas-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Median 96,6% in der control- und 96,9 % in der G6PD-KD-Gruppe, der Meroklone 3,4% in der control- und 3,1% in der G6PD-KD-Gruppe. Holoklone konnten bei den kRas-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3-9 C und D). In der Zusammenschau lassen sich durch die G6PD-Suppression keine wesentlichen Veränderungen auf die Koloniebildung beider Zelllinien beobachten.

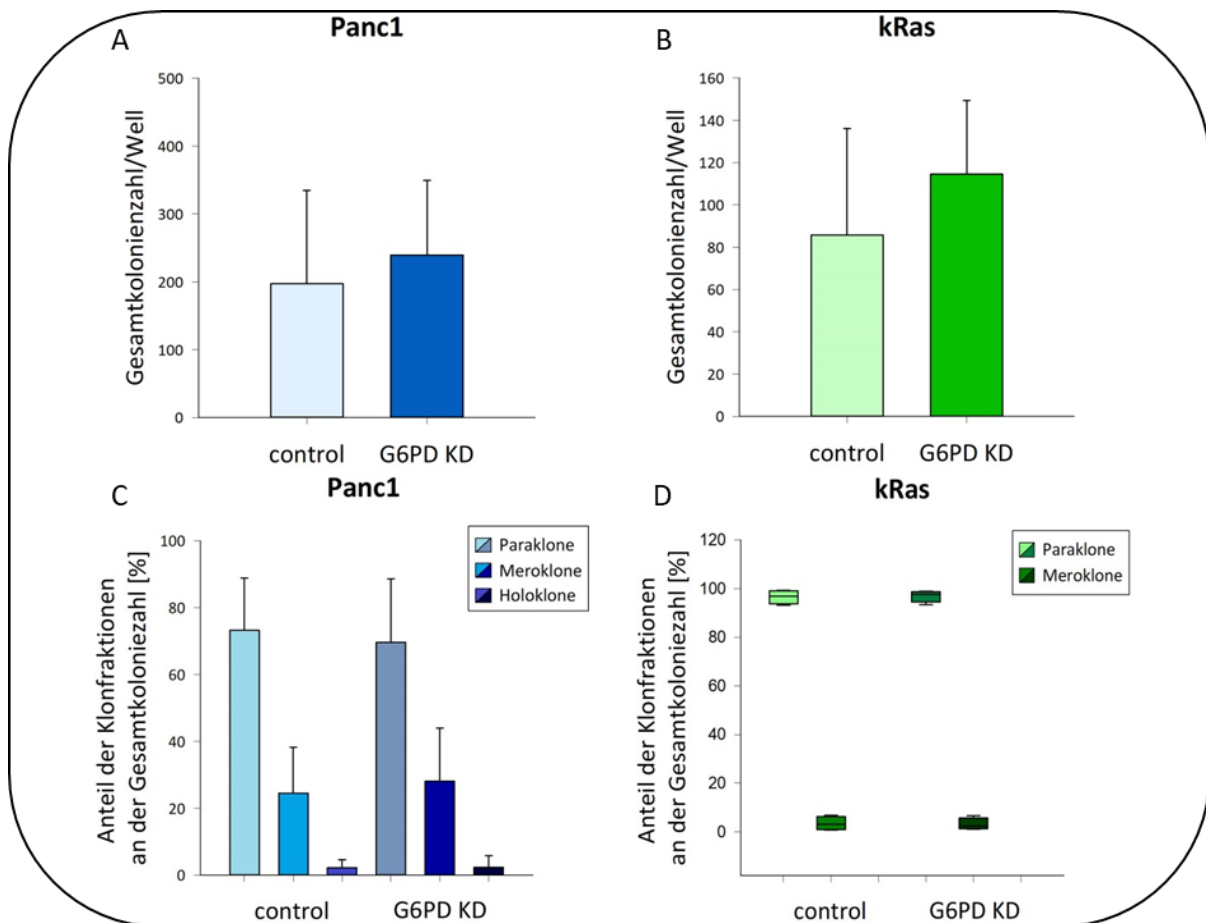


Abbildung 3-9 Selbsterneuerungspotenzial und Koloniebildungsfähigkeit von HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression

Nach 7-tägiger Kokultur von Kontroll-siRNA (control)- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-siRNA (G6PD-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen mit hepatischen Myofibroblasten (HMF) erfolgte die Wiederaussaat zur Koloniebildung für weitere 7-14 Tage. Hiernach wurden die PDEZ gezählt und den einzelnen Koloniephänotypika zugeordnet (Holo-, Mero- und Paraklone). Die Darstellung der Gesamtkolonienzahl/Well (A/B) erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus sechs (A) bzw. vier (B) unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test verwendet. Die Darstellung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Klonmorphologien an der Gesamtkolonienzahl (C/D) erfolgt unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus sechs unabhängigen Experimenten (C) und unter Angabe der Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus vier unabhängigen Experimenten (D). Zur statistischen Testung wurden ein Mann-Whitney-U-Test (C, D) und ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test (A, B, C) verwendet.

Die Panc1-Zellen zeigten zusammengefasst ein gemischtes Bild der Auswirkungen einer supprimierten G6PD auf ihre Krebsstammzeleigenschaften. Obgleich die Suppression der G6PD zu einer verminderten Genexpression der Krebsstammzellmarker Nanog und ABCG2 führte, exprimierten die Panc1-Zellen vermehrt Nestin und wiesen eine tendenziell erhöhte Klonogenität auf. Im Gegensatz dazu exprimierten die G6PD-defizienten kRas-Zellen vermehrt Nanog und ABCG2, aber signifikant weniger SOX-2. Auch bei den kRas-Zellen ließ sich eine erhöhte Klonogenität bei weitestgehend unveränderter Verteilung der einzelnen Klone feststellen. Somit lässt sich festhalten, dass der KD von G6PD in HMF-kokultivierten PDEZ keinen hemmenden Effekt auf die Krebsstammzeleigenschaften dieser hat.

3.3.4 Unter Suppression der G6PD-Expression zeigen Panc1-Zellen eine vermehrte SDHB-Expression

In Abschnitt 3.2.4 konnte nach Suppression der SDHB-Expression eine gesteigerte G6PD-Expression in den Panc1-Zellen beobachtet werden. Die kRas-Zellen hingegen zeigten nur eine geringe, wenn auch leicht verstärkte Expression der G6PD bei SDHB-Suppression. Um zu überprüfen, ob die Suppression der G6PD-Expression einen Einfluss auf die SDHB hat, wurden die unterschiedlich transfizierten PDEZ nach HMF-Kokultur mittels Westernblot und Immunfluoreszenz hinsichtlich der Expression von SDHB untersucht.

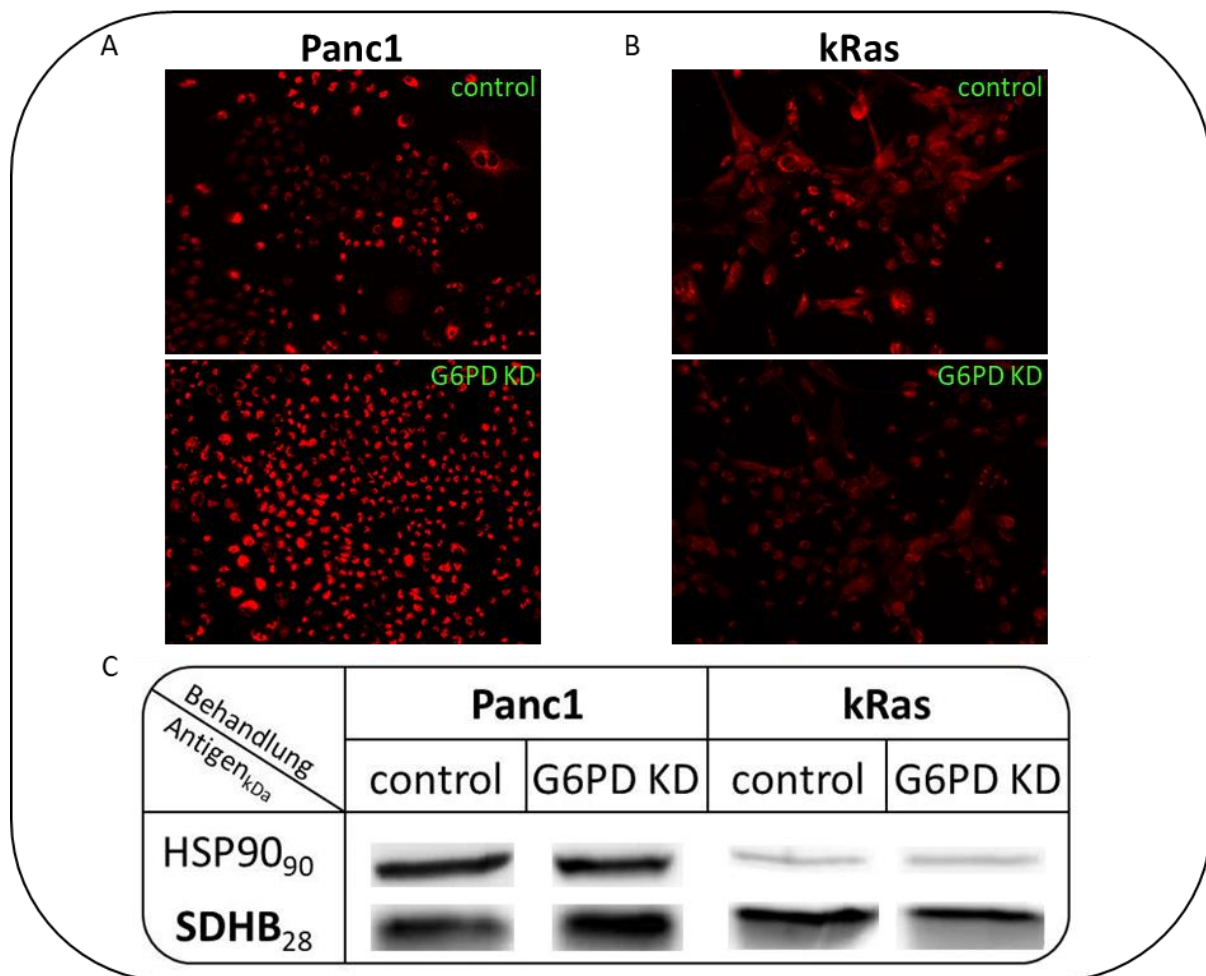


Abbildung 3-10 Expressionsanalyse der SDHB in HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression

Die Immunfluoreszenzfärbung der Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB) erfolgten an Kontroll-siRNA (control)- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-siRNA (G6PD-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Myofibroblasten (HMF). Dargestellt in A und B sind Immunfluoreszenzbilder von SDHB (rot) der Panc1- (A) und kRas-Zellen (B). Im jeweils oberen Bild sind Zellen aus der control-Gruppe, im jeweils unteren Bild Zellen aus der G6PD-KD-Gruppe dargestellt. (C) SDHB und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA- (control) und andererseits G6PD-siRNA-transfizierten (G6PD-KD) Panc1- oder kRas-Zellen detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf Versuchen bei den Panc1-Zellen und drei Versuchen bei den kRas-Zellen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-1 d).

Wie auch in 3.2.4 ließ sich eine negative Korrelation zwischen der G6PD- und der SDHB-Expression bei den Panc1-Zellen feststellen. Im Westernblot konnte eine verstärkte Expression der SDHB bei Inhibition der G6PD-Expression in HMF-kokultivierten Panc1-Zellen beobachtet werden. Bei den kRas-Zellen zeigte die Suppression der G6PD-Expression nur geringe Auswirkungen auf die Expression der SDHB. So ließ sich im Westernblot eine

unveränderte oder etwas geringere Expression der SDHB bei Inhibition der G6PD-Expression beobachten (Abbildung 3-10 C). Korrespondierend hierzu sind Immunfluoreszenzaufnahmen der SDHB-Expression von Panc1- und kRas-Zellen aus der control- und G6PD-KD-Gruppe gezeigt (Abbildung 3-10 A und B).

3.4 Der Einfluss von Nanog auf PDEZ in einer physiologischen oder entzündlichen Lebermikroumgebung

Da gezeigt werden konnte, dass der Krebsstammzellmarker Nanog in PDEZ stromaabhängig moduliert wird, sollte als nächstes untersucht werden, wie sich eine siRNA-vermittelte Suppression der Nanog-Expression auf PDEZ in Kokultur mit HSC bzw. HMF auswirkt (Knaack et al. 2018). Analog zu den vorhergegangenen Versuchen wurden dabei die Auswirkungen auf das Zellwachstum und das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ untersucht. Ferner wurde die Expression Metabolismus-assoziiertes Proteine wie SDHB, G6PD, Transaldolase (TALDO) und Transketolase (TKT) untersucht, um zu prüfen, ob dieser Krebsstammzellmarker Einfluss auf den Metabolismus in prämaligen und malignen PDEZ haben könnte (s. Abschnitt 1.5).

3.4.1 Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der Nanog-Expression

Die Kontrolle des KD von Nanog erfolgte an HSC- oder HMF-kokultivierten PDEZ auf Genexpressionsebene mittels RT-qPCR.

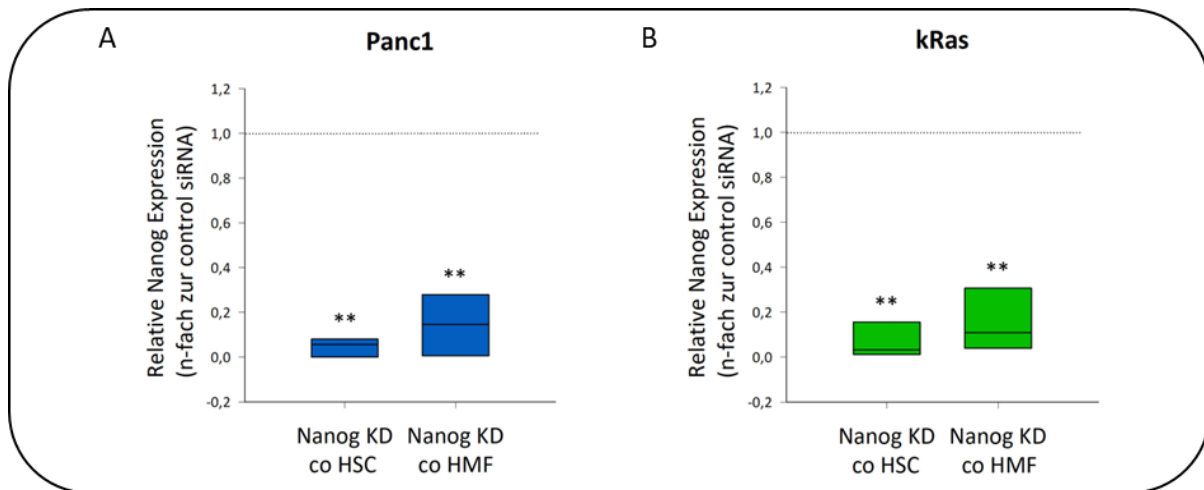


Abbildung 3-11 RT-qPCR-basierte Expressionsanalyse von Nanog zur Knockdown-Kontrolle

Die Expressionsanalyse des Krebsstammzellmarker Nanog erfolgte an Kontroll-siRNA (control)- und Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) und hepatischen Myofibroblasten (HMF). Die RT-qPCR-basierte Quantifizierung der Genexpression in Panc1- (A) und kRas-Zellen (B) erfolgte als Quotient aus den C_T -Werten des Zielgens und des Referenzgens GAPDH (s. Abschnitt 2.2.7). Hiernach wurden die Werte der PDEZ aus der Nanog-KD-Gruppe auf die Ergebnisse der PDEZ aus der control-Gruppe normalisiert und als n-faches dargestellt. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus der Nanog-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,01$ mit einem ** markiert.

Die Aufarbeitung der RNA-Isolate zeigte eine signifikante Verminderung der Nanog-Expression in den PDEZ. Bei den Panc1-Zellen betrug dabei die mediane Nanog-Expression in der Nanog-KD-Gruppe das 0,06-fache in Kokultur mit HSC und das 0,15-fache in Kokultur mit HMF im Vergleich zur control-Gruppe ($p < 0,001$) (Abbildung 3-11 A). Bei den kRas-Zellen betrug die mediane Nanog-Expression in der Nanog-KD-Gruppe das 0,03-fache in Kokultur mit HSC und das 0,11-fache in Kokultur mit HMF im Vergleich zur control-Gruppe ($p = < 0,001$) (Abbildung 3-11 B).

3.4.2 Das Zellwachstum der PDEZ wird bei Suppression der Nanog-Expression gehemmt

Um der Frage nachzugehen, ob der Nanog-KD ein verändertes Wachstumsverhalten prämaligner oder maligner PDEZ in unterschiedlichen Lebermikroumgebungen zur Folge hat, erfolgten Lebendzellzahlbestimmungen Nanog-defizienter und –suffizienter PDEZ nach Kokultur mit HSC oder HMF.

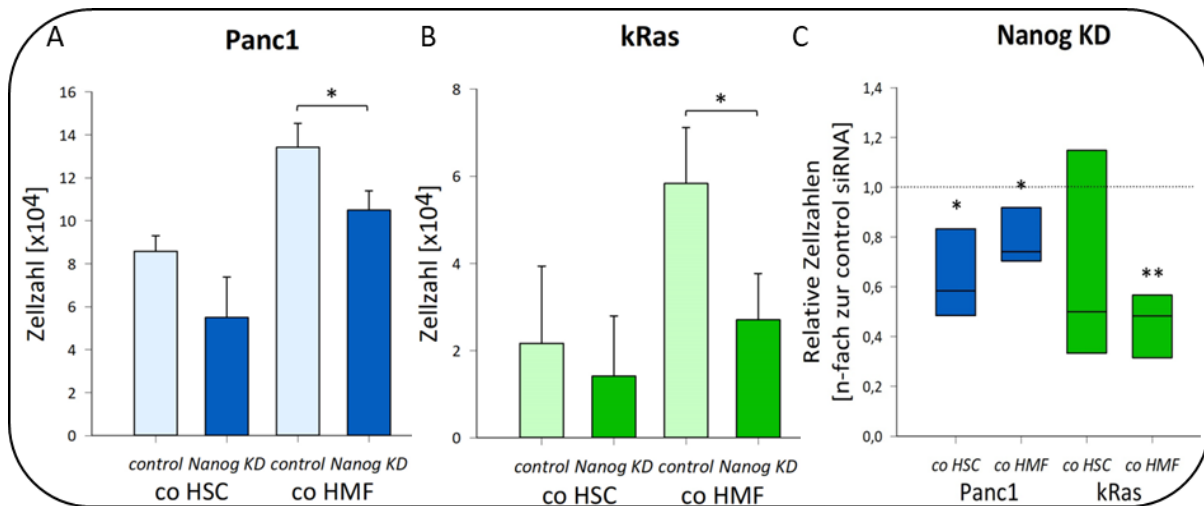


Abbildung 3-12 Lebendzellzahlen der HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression

Die Zählung der Kontroll-siRNA (control)- und Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen erfolgte nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF). Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der Panc1- (A) und der kRas-Zellen (B) erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Darstellung der relativen Zellzahlen (C) wurden die Zellzahlergebnisse der Nanog-KD-Gruppe auf die control-Gruppe der gleichen Kokulturbedingungen normalisiert und als n-faches angegeben. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurden ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test (A und B) und ein Mann-Whitney-U-Test (D) verwendet. Signifikante Unterschiede aus der Nanog-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem *, bei einem $p < 0,01$ mit einem ** markiert.

Die Suppression von Nanog führte zu einer deutlich erniedrigten Lebendzellzahl sowohl der prämaligen kRas- als auch malignen Panc1-Zellen unabhängig von den Stromabedingungen (s. Abschnitt 3.2 und 3.3). Im Mittel betragen die Lebendzellzahlen der HSC-kokultivierten Panc1-Zellen in der control-Gruppe $8,58 \times 10^4$ und der Nanog-supprimierten Panc1-Zellen $5,5 \times 10^4$. In Kokultur mit den HMF betragen die Lebendzellzahlen der Panc1-Zellen in der control-Gruppe $13,42 \times 10^4$, wohingegen die der Nanog-KD-Gruppe mit $10,5 \times 10^4$ signifikant niedriger waren ($p = 0,025$) (Abbildung 3-12 A). Wie bereits beobachtet, waren die Lebendzellzahlen der kRas-Zellen insgesamt niedriger als die der Panc1-Zellen, aber auch hier war der gleiche Trend wie bei den Panc1-Zellen zu verzeichnen. In Kokultur mit den HSC betragen diese in der control-Gruppe im Mittel $2,17 \times 10^4$ und bei den Nanog-supprimierten kRas-Zellen im Mittel $1,42 \times 10^4$. In Kokultur mit den HMF wiesen die kRas-Zellen in der control-Gruppe Lebendzellzahlen von im Mittel $5,83 \times 10^4$ auf. In der Nanog-KD-Gruppe waren die Lebendzellzahlen der HMF-kokultivierten kRas-Zellen mit im Mittel $2,71 \times 10^4$

signifikant niedriger ($p=0,031$) (Abbildung 3-12 B). Damit sank die mediane Lebendzellzahl der Nanog-supprimierten Panc1-Zellen signifikant auf das 0,64-fache in Kokultur mit den HSC ($p=0,024$) und auf das 0,79-fache in Kokultur mit den HMF ($p=0,033$). Bei den kRas-Zellen führte die Suppression der Nanog-Expression zu einer Erniedrigung der medianen Lebendzellzahl auf das 0,66-fache in Kokultur mit den HSC und auf das 0,46-fache in Kokultur mit den HMF. In Letzterem ließ sich dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen nachweisen ($p=0,002$).

3.4.3 Die Suppression der Nanog-Expression vermindert das Selbsterneuerungspotenzial maligner PDEZ

Welche funktionelle Relevanz Nanog für das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ im Kontext unterschiedlicher Leberstromabedingungen hat, wurde mittels CFA-Analysen untersucht. Diese wurden mit Nanog-supprimierten bzw. Kontroll-siRNA-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach Kokultur mit HSC oder HMF durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.3).

Bei Betrachtung der Gesamtkolonienzahlen wurde kein eindeutiger Einfluss durch die Suppression der Nanog-Expression sichtbar. Die Panc1-Zellen bildeten nach Kokultur mit HSC im Durchschnitt 299 Kolonien aus, nach siRNA-vermitteltem KD konnten 385 Kolonien gezählt werden. Nach Kokultur mit HMF bildeten die Panc1-Zellen im Durchschnitt 267 Kolonien und damit etwas weniger als in Kokultur mit den HSC aus, nach Nanog-KD betrug die Gesamtkolonienzahl 270 im Durchschnitt (Abbildung 3-13 A). Die kRas-Zellen wiesen hierzu ein konträres Bild bei deutlich niedrigeren Kolonienzahlen auf. Nach Kokultur mit HSC entstanden aus der Aussaat Nanog-suffizienter kRas-Zellen im Durchschnitt 46 Kolonien, wohingegen Nanog-supprimierte kRas-Zellen mit 19 Kolonien signifikant weniger Kolonien ausbildeten ($p=0,038$). Nach Kokultur mit HMF bildeten kRas-Zellen in der control-Gruppe im Durchschnitt 36 Kolonien aus, bei Suppression der Nanog-Expression durchschnittlich 46 Kolonien (Abbildung 3-13 B).

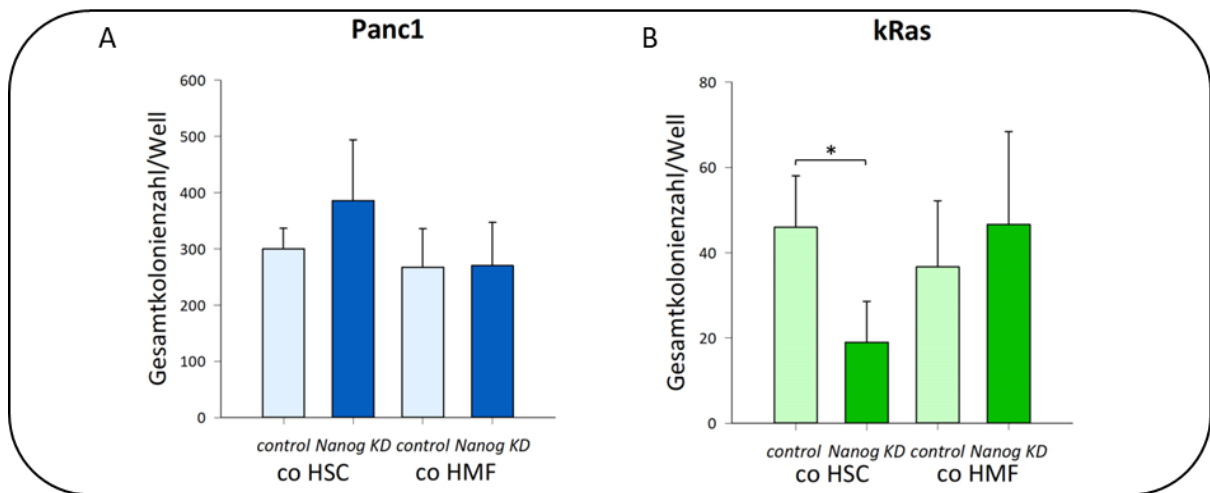


Abbildung 3-13 Koloniebildungsfähigkeit von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression

Nach 7-tägiger Kokultur von Kontroll-siRNA (control)- und Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) erfolgte die Wiederaussaat zur Koloniebildung für weitere 7-14 Tage. Hiernach wurden die ausgebildeten Kolonien der PDEZ gezählt. Die Darstellung der Gesamtkolonienzahl/Well erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus der Nanog-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem * markiert.

Bei Betrachtung der Anteile der verschiedenen Klonmorphologien Nanog-suffizienter und -defizienter Panc1-Zellen lässt sich ein eindeutiger Einfluss von Nanog auf das Selbsterneuerungspotenzial dieser Zellen beobachten. Bei Suppression der Nanog-Expression bildeten die Panc1-Zellen in Kokultur sowohl mit HSC als auch mit HMF deutlich mehr Paraklone, aber weniger Mero- sowie Holoklone aus. Bei den HSC-kokultivierten Panc1-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 51,8% in der control- und 72% in der Nanog-KD-Gruppe, der Meroklone 45,2% in der control- und 26,4% in der Nanog-KD-Gruppe, der Holoklone 3% in der control- und 1,6% in der Nanog-KD-Gruppe. Bei den HMF-kokultivierten Panc1-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 53,1% in der control- und mit 75,9% signifikant mehr in der Nanog-KD-Gruppe ($p=0,002$), der Meroklone 40,9% in der control- und mit 22,6% signifikant weniger in der Nanog-KD-Gruppe ($p=0,004$), der Holoklone 6% in der control- und mit 1,5% signifikant weniger in der Nanog-KD-Gruppe ($p=0,008$) (Abbildung 3-14 A und B). Die kRas-Zellen reagierten im Vergleich zu den Panc1-Zellen unterschiedlich auf die Suppression der Nanog-Expression abhängig von den Kokulturbedingungen. Im Vergleich zur control-Gruppe bildeten Nanog-defiziente kRas-

Zellen in Kokultur mit HSC weniger Para- und mehr Meroklone, in Kokultur mit HMF hingegen umgekehrt mehr Para- und weniger Meroklone aus. Bei den HSC-kokultivierten kRas-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 94,2% in der control- und 91,1% in der Nanog-KD-Gruppe, der Meroklone 5,8% in der control- und 8,9% in der Nanog-KD-Gruppe. Bei den HMF-kokultivierten kRas-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 84,5% in der control- und 87,7% in der Nanog-KD-Gruppe, der Meroklone 15,5% in der control- und 12,3% in der Nanog-KD-Gruppe. Holoklone konnten wie zuvor bei den kRas-Zellen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3-14 C und D).

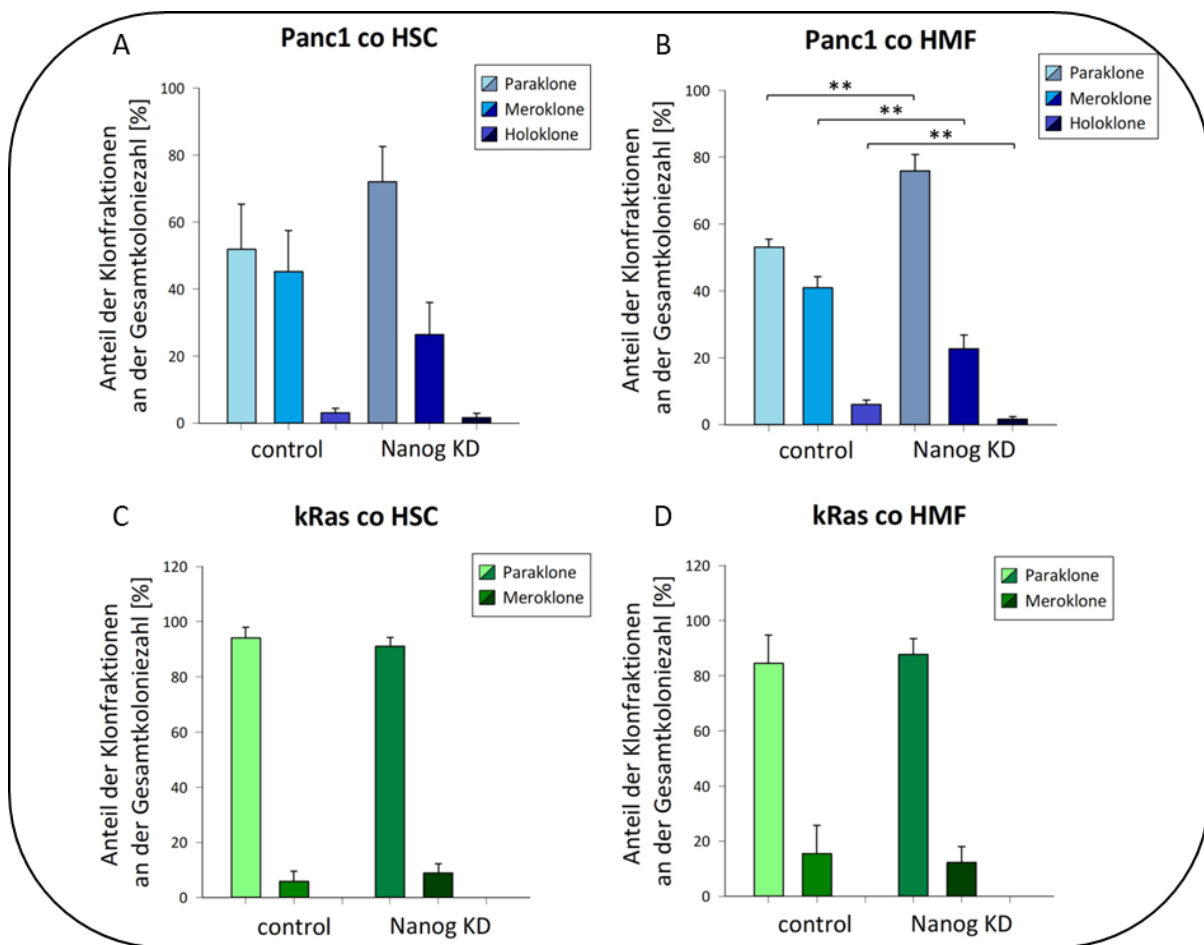


Abbildung 3-14 Selbsterneuerungspotenzial und Koloniebildungsfähigkeit von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression

Nach 7-tägiger Kokultur von Kontroll-siRNA (control)- und Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) erfolgte die Wiederaussaat zur Koloniebildung für weitere 7-14 Tage. Hiernach wurden die PDEZ gezählt und den einzelnen Koloniephänotypika zugeordnet (Holo-, Mero- und Paraklone). Die Darstellung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Klonmorphologien an der Gesamtkoloniezahl für die Panc1- (A/B) und kRas-Zellen (C/D) erfolgt unter Angabe des

Mittelwertes mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede aus der Nanog-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem *, bei einem $p < 0,01$ mit einem ** markiert.

Zusammenfassend lässt sich aus den Befunden schließen, dass die Suppression der Nanog-Expression einen Einfluss auf das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ hat. Bei den Panc1-Zellen führte der KD von Nanog zu einer Verminderung der Krebsstammzeleigenschaften und besonders die Panc1-Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung waren hiervon betroffen. So bildeten Nanog-defiziente Panc1-Zellen mehr Paraklone, die mit wenig Krebsstammzeleigenschaften assoziiert sind, und deutlich weniger Mero- sowie Holoklone, die mit höheren Krebsstammzeleigenschaften assoziiert sind, aus. Bei den kRas-Zellen konnte dieser Effekt auf die Koloniebildung nicht in diesem Maße beobachtet werden. Weiterhin divergierte der Einfluss der Suppression der Nanog-Expression auf das Selbsterneuerungspotenzial der kRas-Zellen in Abhängigkeit ihrer Stromabedingungen. Während die HMF-kokultivierten kRas-Zellen ähnlich wie die Panc1-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression vermehrt Paraklone ausbildeten, bildeten die HSC-kokultivierten kRas-Zellen mehr Meroklone und hingegen weniger Paraklone aus. Bei diesen kRas-Zellen hatte der KD der Nanog-Expression einen deutlicheren Effekt auf deren Koloniebildungspotenzial. So bildeten die HSC-kokultivierten kRas-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression insgesamt signifikant weniger Kolonien aus. Die HMF-kokultivierten kRas-Zellen hingegen bildeten ähnlich wie die Panc1-Zellen gleich viel oder mehr Kolonien aus.

3.4.4 Maligne PDEZ exprimieren vermehrt SDHB bei Suppression von Nanog

Zur Untersuchung, welche Auswirkungen der KD der Nanog-Expression auf die Expression der SDHB und der G6PD hat, erfolgten Westernblot-basierte Expressionsanalysen dieser beiden Proteine. Unter Beachtung der hohen Adaptationsfähigkeit des PPW wurde zudem die Expression der beiden Epimerasen TALDO und TKT im Westernblotverfahren untersucht (s. Abschnitt 1.3).

Die Nanog-defizienten Panc1-Zellen wiesen unabhängig von ihren Stromabedingungen eine höhere Expression der SDHB im Vergleich zu den control-transfizierten Zellen auf. Zudem exprimierten die Panc1-Zellen in Kokultur mit HSC weniger G6PD unter dem Nanog-KD, in Kokultur mit den HMF ließ sich dieser Effekt etwas verminderter darstellen. Während die Expression der TALDO unbeeinflusst blieb, führte der KD von Nanog in den Panc1-Zellen zu einer verminderten Expression der TKT (Abbildung 3-15). Die Ergebnisse des Westernblot-Verfahrens deuten damit an, dass die Nanog-supprimierten Panc1-Zellen eine verminderte Aktivität des oxidativen und reduktiven Anteils des PPW aufweisen.

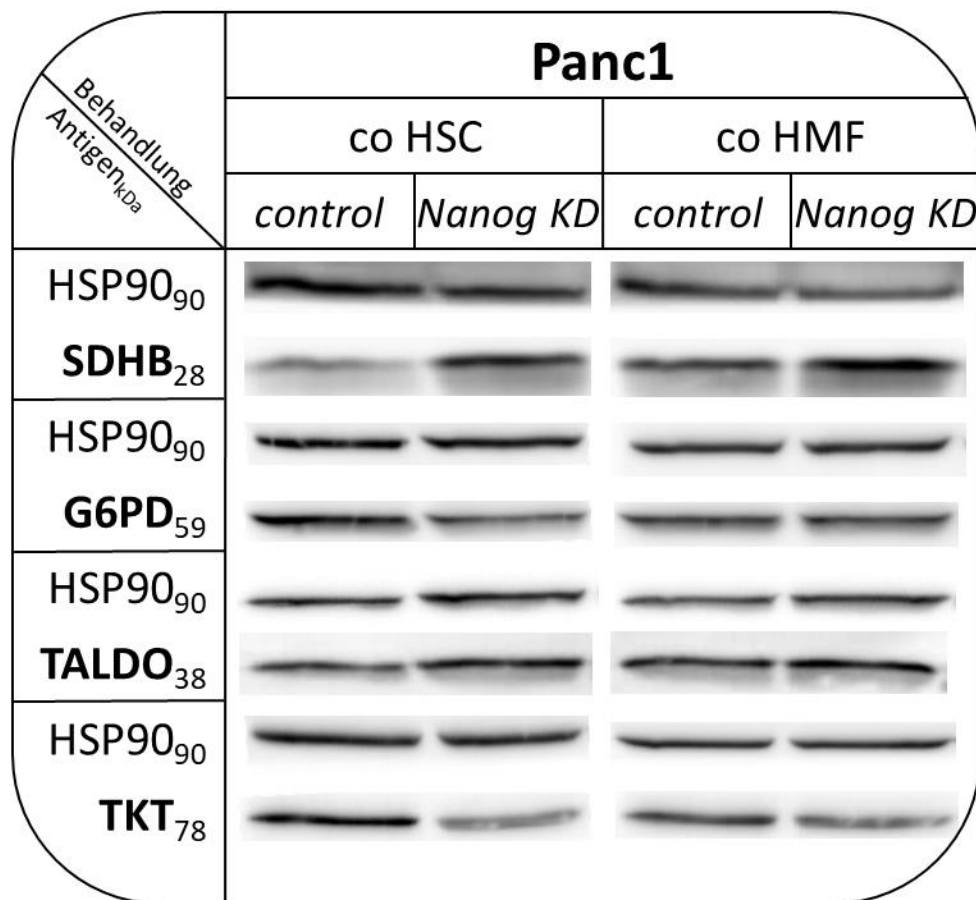


Abbildung 3-15 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter Panc1-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von Kontroll-siRNA (control)- und Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-2 a-d).

Bei den kRas-Zellen ließen sich unter beiden Stromabedingungen nur unwesentliche Unterschiede in der Expression metabolischer Enzyme nach siRNA-vermitteltem KD der Nanog-Expression feststellen. Die Nanog-supprimierten kRas-Zellen zeigten allenfalls eine dezent geringere Expression der SDHB im Vergleich zur control-Gruppe in Kokultur mit HSC. Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht konsistent über die Experimente hinweg darstellen. Die Expression der G6PD, TALDO und TKT in den kRas-Zellen blieb ebenfalls unbeeinflusst durch den KD der Nanog-Expression (Abbildung 3-16).

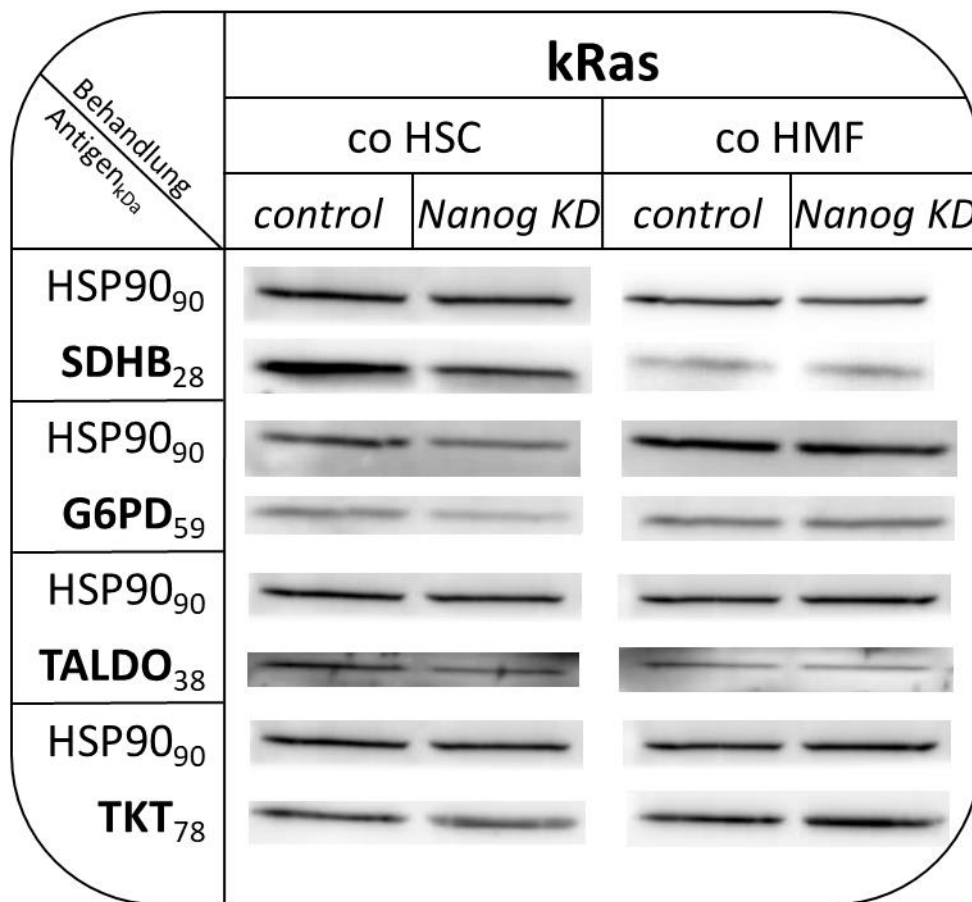


Abbildung 3-16 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter Panc1-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von Kontroll-siRNA (control)- und Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-2 e-h).

3.5 Der Einfluss von Nestin auf PDEZ in einer physiologischen oder entzündlichen Lebermikroumgebung

In den bisherigen Abschnitten ließ sich bislang nur ein geringer Einfluss von SDHB oder G6PD auf die Expression des Krebsstammzellmarkers Nestin in den prämaligen kRas- und malignen Panc1-Zellen im Kontext einer entzündlichen oder physiologischen Lebermikroumgebung herleiten. Dieser Abschnitt befasst sich nun umgekehrt mit den Untersuchungen über den Einfluss von Nestin auf Zellwachstum, Krebsstammzeleigenschaften und Metabolismus der PDEZ im Kontext einer entzündlichen oder physiologischen Lebermikroumgebung. Analog zu Abschnitt 3.4 erfolgten Lebendzellzahlbestimmungen, Expressionsanalysen metabolischer Enzyme und Untersuchungen des Selbsterneuerungspotenziales an control- oder Nestin-siRNA-transfizierten kRas- oder Panc1-Zellen, die mit HSC oder HMF kultiviert wurden.

3.5.1 Kontrolle der siRNA-vermittelten Suppression der Nestin-Expression

Die Kontrolle des siRNA-basierten KD von Nestin in den HSC- oder HMF-kokultivierten PDEZ wurde wie bei Nanog mittels RT-qPCR durchgeführt.

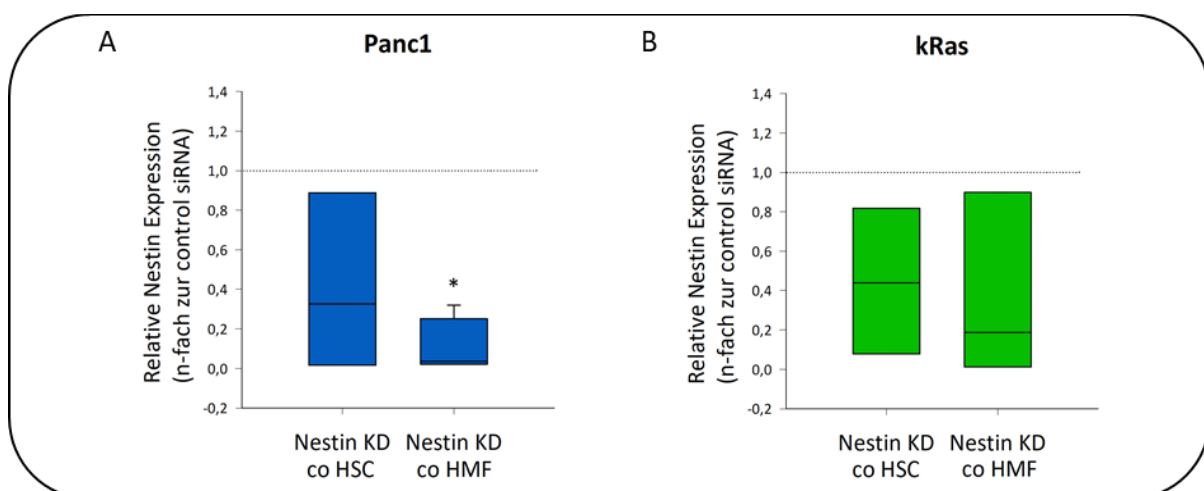


Abbildung 3-17 RT-qPCR-basierte Expressionsanalyse von Nestin zur Knockdown-Kontrolle

Die Expressionsanalyse des Krebsstammzellmarkers Nestin erfolgte an Kontroll-siRNA (control)- und Nestin-siRNA (Nestin-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger

Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) und hepatischen Myofibroblasten (HMF). Die RT-qPCR-basierte Quantifizierung der Genexpression in Panc1- (A) und kRas-Zellen (B) erfolgte als Quotient aus den C_T -Werten des Zielgens und des Referenzgens GAPDH (s. Abschnitt 2.2.7). Hiernach wurden die Werte der PDEZ aus der Nestin-KD-Gruppe auf die Ergebnisse der PDEZ aus der control-Gruppe normalisiert und als n-faches dargestellt. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurden ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test (B) und ein Mann-Whitney-U-Test (A) verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus der Nestin-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem * markiert.

Die RT-qPCR-basierte Expressionsanalyse von Nestin zeigte eine deutliche Inhibition der Genexpression von Nestin in beiden PDEZ-Linien nach siRNA-vermitteltem KD. Bei den Nestin-siRNA-transfizierten Panc1-Zellen sank die Nestin-Expression im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten Panc1-Zellen auf das 0,33-fache im Median in Kokultur mit HSC und signifikant auf das 0,04-fache im Median in Kokultur mit HMF ($p=0,029$) (Abbildung 3-17 A). Bei den Nestin-siRNA-transfizierten kRas-Zellen sank die Nestin-Expression im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-transfizierten kRas-Zellen auf das 0,44-fache im Median in Kokultur mit HSC und auf das 0,19-fache im Median in Kokultur mit HMF ($p=0,029$) (Abbildung 3-17 B).

3.5.2 Der Knockdown der Nestin-Expression wirkt sich negativ auf das Wachstumsverhalten der PDEZ unter den verschiedenen Stromabedingungen aus

Analog zu den vorherigen Versuchsreihen wurde das Wachstumsverhalten der Nestin-defizienten PDEZ mit der Lebendzellzahlbestimmung analysiert und mit der von Kontroll-siRNA-transfizierten PDEZ verglichen. Beide Versuchsansätze wurden an PDEZ durchgeführt, die entweder mit HSC oder mit HMF kultiviert wurden.

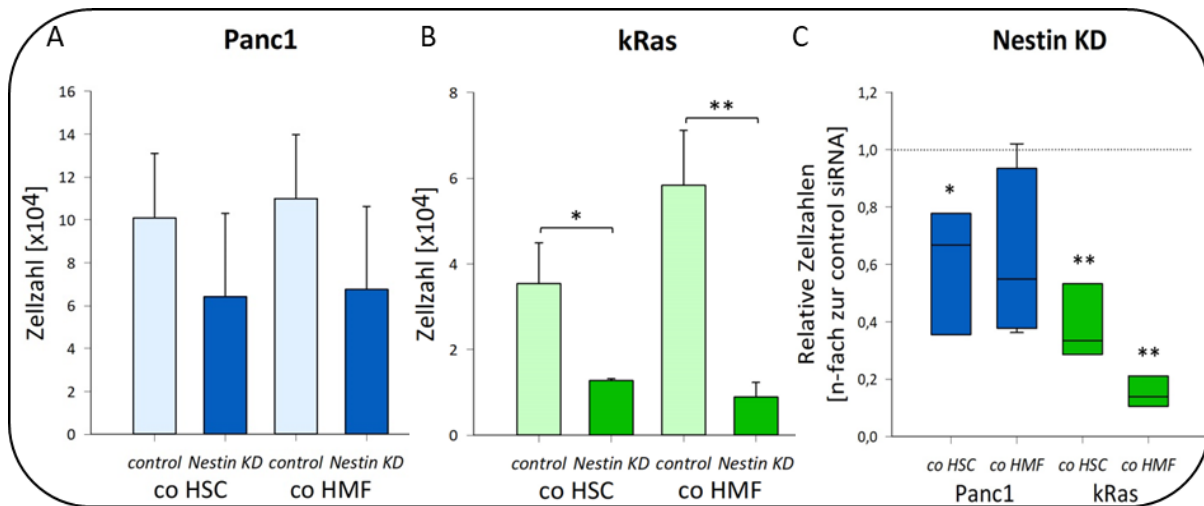


Abbildung 3-18 Lebendzellzahlen der HSC- oder HMF- kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression

Die Zählung der Kontroll-siRNA (control)- und Nestin-siRNA (Nestin-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen erfolgte nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF). Die Darstellung der absoluten Zellzahlen der Panc1- (A) und der kRas-Zellen (B) erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. Zur Darstellung der relativen Zellzahlen der Panc1- und kRas-Zellen (C) wurden die Zellzahlen der Nestin-KD-Gruppe auf die der control-Gruppe der gleichen Kokulturbedingungen normalisiert und als n-faches angegeben. Gezeigt sind die Mediane mit 25%- und 75%-Quartilen aus vier bzw. drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurden ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test (A, B) und ein Mann-Whitney-U-Test (C) verwendet. Signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus der Nestin-KD-Gruppe zu denen aus der control-Gruppe wurden bei einem $p < 0,05$ mit einem *, bei einem $p < 0,01$ mit einem ** markiert.

Die Suppression der Nestin-Expression ging mit einer deutlichen Reduktion der Lebendzellzahlen sowohl der Panc1- als auch der kRas-Zellen einher. Dieser Einfluss konnte unabhängig von den Stromabedingungen festgestellt werden. Im Mittel betragen die Lebendzellzahlen in der control-Gruppe bei den Panc1-Zellen in Kokultur mit HSC $10,1 \times 10^4$ und in Kokultur mit HMF 11×10^4 . Die Suppression der Nestin-Expression ging unter HSC-Kokultur mit einer signifikanten Reduktion der mittleren Lebendzellzahl der Panc1-Zellen auf das 0,67-fache mit $6,42 \times 10^4$ Zellen einher ($p = 0,034$). In Kokultur mit den HMF führte der KD der Nestin-Expression zu einer Reduktion der mittleren Lebendzellzahl der Panc1-Zellen auf das 0,55-fache im Vergleich zur control-Gruppe mit $6,75 \times 10^4$ (Abbildung 3-18 A und C). In der control-Gruppe HSC-kokultivierter kRas-Zellen betrug die mittlere Lebendzellzahl $3,54 \times 10^4$. HMF-kokultivierte, control-transfizierte kRas-Zellen wiesen eine Lebendzellzahl von $5,83 \times 10^4$ im Mittel auf. In der Nestin-KD-Gruppe betrug die mittlere Lebendzellzahl der HSC-kokultivierten kRas-Zellen $1,28 \times 10^4$ und der HMF-kokultivierten kRas-Zellen $0,89 \times 10^4$.

Dies entspricht einer signifikanten Reduktion der Lebendzellzahl auf das 0,33-fache bei den HSC-kokultivierten kRas-Zellen und auf das 0,14-fache bei den HMF-kokultivierten kRas-Zellen ($p=0,001$) (Abbildung 3-18 B und C).

3.5.3 Die Suppression der Nestin-Expression hat nur einen geringen Effekt auf das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ

Im Folgenden sollte mittels CFA untersucht werden, wie sich der siRNA-vermittelte KD der Nestin-Expression auf das Selbsterneuerungspotenzial und die Koloniebildungsfähigkeit von PDEZ im Kontext verschiedener Lebermikroumgebungen auswirkt (s. Abschnitt 2.2.3).

In Bezug auf die Gesamtzahl gebildeter Kolonien wiesen die Panc1-Zellen nach KD der Nestin-Expression nahezu ähnliche Ergebnisse auf wie nach dem KD der Nanog-Expression (Abbildung 3-13 A). Die Panc1-Zellen bildeten im Durchschnitt 299 Kolonien in Kokultur mit HSC und 279 Kolonien in Kokultur mit HMF aus. In der Nestin-KD-Gruppe stieg die durchschnittliche Kolonienzahl HSC-kokultivierter Panc1-Zellen auf 346, in der Nestin-KD-Gruppe HMF-kokultivierter Panc1-Zellen sank sie hingegen auf 270 (Abbildung 3-19 A). Bei den kRas-Zellen betrug die durchschnittliche Kolonienzahl in Kokultur mit HSC lediglich 46 und in Kokultur mit HMF 36. Bei Suppression der Nestin-Expression sank die durchschnittliche Kolonienzahl HSC-kokultivierter kRas-Zellen auf 42. In Kokultur mit HMF bildeten die Nestin-defizienten kRas-Zellen im Durchschnitt 30 und damit ebenfalls weniger Kolonien aus (Abbildung 3-19 B).

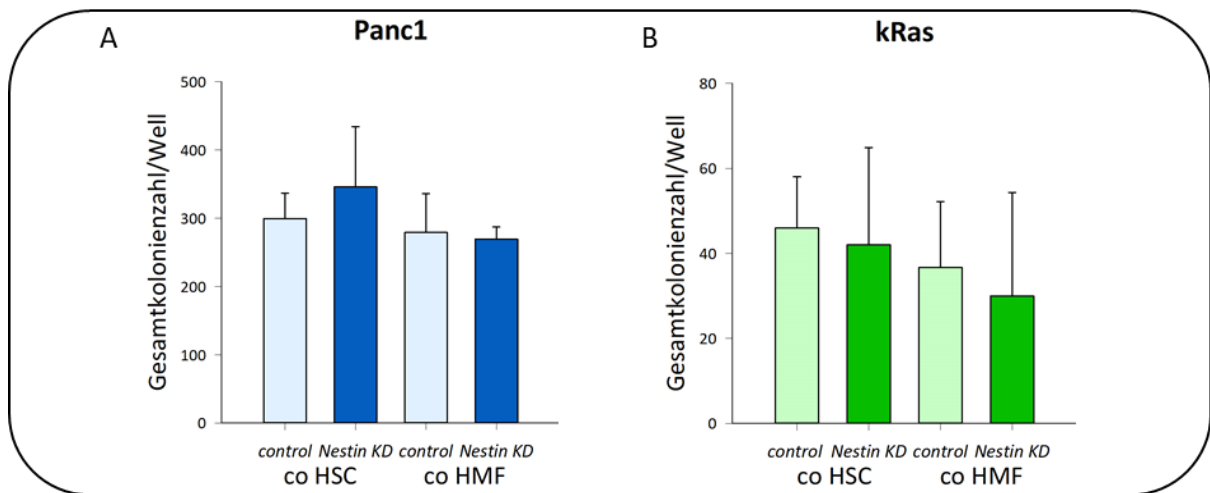


Abbildung 3-19 Koloniebildungsfähigkeit von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression

Nach 7-tägiger Kokultur von Kontroll-siRNA (control)- und Nestin-siRNA (Nestin-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) erfolgte die Wiederaussaat zur Koloniebildung für weitere 7-14 Tage. Hiernach wurden die ausgebildeten Kolonien der PDEZ gezählt. Die Darstellung der Gesamtkolonienzahl/Well erfolgte unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein zweiseitiger, ungepaarter t-Test verwendet.

Der KD der Nestin-Expression hatte einen weitestgehend ähnlichen, milden Effekt auf die Verteilung der einzelnen Klonmorphologien der PDEZ unter den unterschiedlichen Stromabedingungen. So bildeten die PDEZ beim KD der Nestin-Expression vermehrt Meroklone aus. Eine Ausnahme hiervon stellten die Nestin-supprimierten, HSC-kokultivierten Panc1-Zellen dar, die vermehrt Paraklone ausbildeten. Bei den HSC-kokultivierten Panc1-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 51,8% in der control- und 58,7% in der Nestin-KD-Gruppe, der Meroklone 45,2% in der control- und 38,8% in der Nestin-KD-Gruppe, der Holoklone 3% in der control- und 2,5% in der Nestin-KD-Gruppe. Bei den HMF-kokultivierten Panc1-Zellen betragen die Anteile der Paraklone im Mittel 62,1% in der control- und 61,5% in der Nestin-KD-Gruppe, der Meroklone 33,4% in der control- und 36,5% in der Nestin-KD-Gruppe, der Holoklone 4,5% in der control- und 2% in der Nestin-KD-Gruppe (Abbildung 3-20 A und B). Mit HSC-kokultivierte kRas-Zellen bildeten 94,2% Paraklone in der control- und 89,9% Paraklone in der Nestin-KD-Gruppe aus. Der Anteil der Meroklone betrug bei den HSC-kokultivierten kRas-Zellen im Mittel 5,8% in der control- und 10,2% in der Nestin-KD-Gruppe. Die HMF-kokultivierten kRas-Zellen bildeten

84,5% Paraklone in der control- und 81,2% Paraklone in der Nestin-KD-Gruppe aus. Unter Suppression der Nestin-Expression stieg der Anteil der Meroklone leicht von 15,5% in der control- auf 18,8% in der Nestin-KD-Gruppe. Holoklone konnten bei den kRas-Zellen wie zuvor nicht detektiert werden (Abbildung 3-20 C und D).

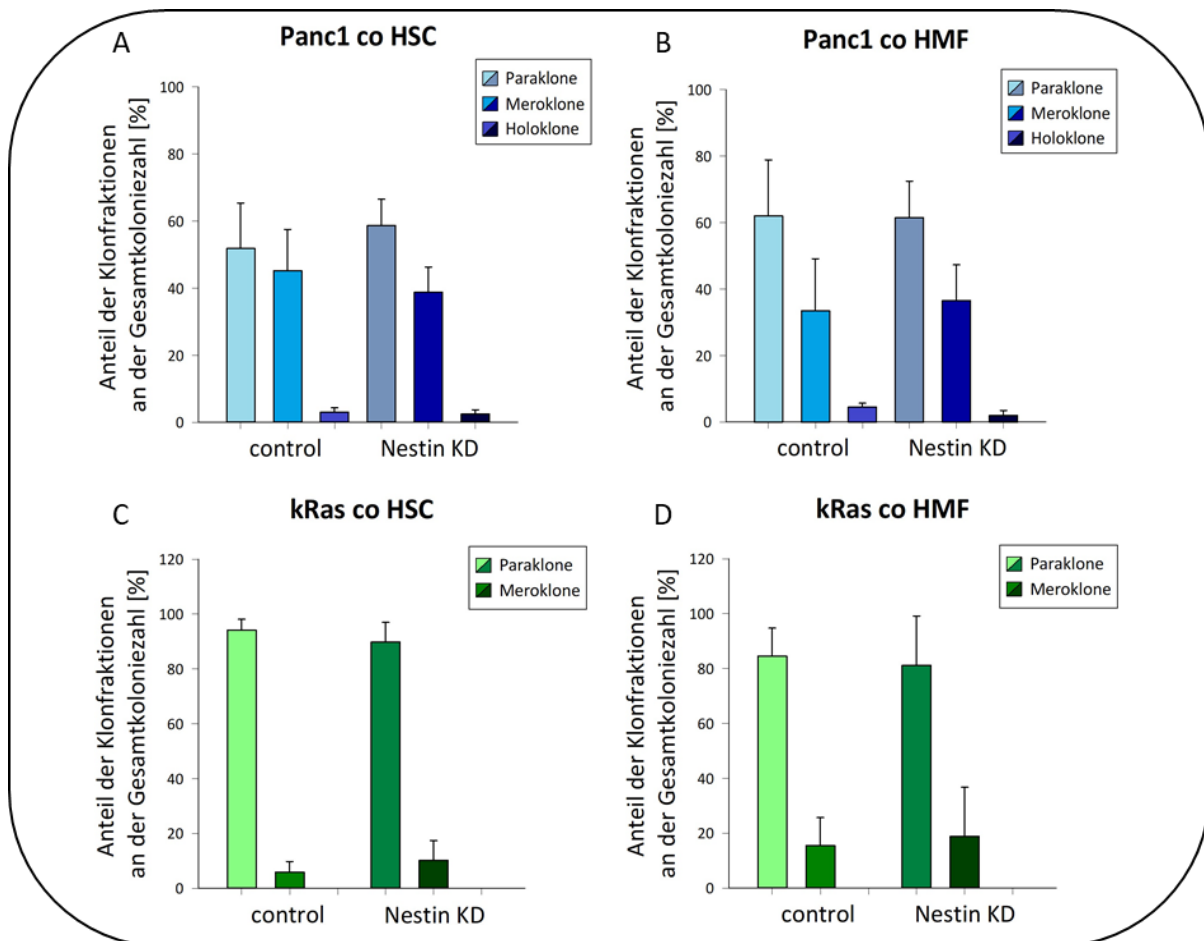


Abbildung 3-20 Koloniebildungsfähigkeit und Selbsterneuerungspotenzial von HSC- oder HMF-kokultivierten Panc1- und kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression

Nach 7-tägiger Kokultur von Kontroll-siRNA (control)- und Nestin-siRNA (Nestin-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) erfolgte die Wiederaussaat zur Koloniebildung für weitere 7-14 Tage. Hiernach wurden die PDEZ gezählt und den einzelnen Koloniephänotypika zugeordnet (Holo-, Mero- und Paraklone). Die Darstellung der prozentualen Anteile der unterschiedlichen Klonmorphologien an der Gesamtkoloniezahl für die Panc1- (A/B) und kRas-Zellen (C/D) erfolgt unter Angabe des Mittelwertes mit der Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Testung wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test verwendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der KD der Nestin-Expression nur einen geringen Effekt auf das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ hatte. Mit Ausnahme der HSC-kokultivierten Panc1-Zellen war die Koloniebildungsfähigkeit der PDEZ leichtgradig

gemindert bei Suppression der Nestin-Expression. Diese Beobachtung ging mit einer leichtgradig verminderten Ausbildung von Para- und einer vermehrten Ausbildung von Meroklonen einher. Dieser geringgradig ausgeprägte Effekt ließ sich stromaunabhängig bei den kRas-Zellen nachweisen. Die HSC-kokultivierten, Nestin-defizienten Panc1-Zellen hingegen wiesen ähnlich wie nach dem KD der Nanog-Expression eine vermehrte Koloniebildungsfähigkeit auf. Sie bildeten ebenfalls leichtgradig vermehrt Para- und vermindert Meroklone aus. Anders als nach KD der Nanog-Expression ließ sich dieser Effekt jedoch nicht stromaunabhängig beobachten.

3.5.4 In einer physiologischen Lebermikroumgebung exprimieren prämaligne PDEZ weniger SDHB bei Suppression der Nestin-Expression

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich der siRNA-vermittelte KD der Nestin-Expression auf die Expression metabolischer Enzyme auswirkt. Dies wurde analog zu der vorherigen Versuchsreihe mittels Westernblot-basierter Expressionsanalysen der SDHB, G6PD, TALDO und TKT untersucht.

Mit Ausnahme der vermehrten Expression von TALDO in HSC-kokultivierten, Nestin-defizienten Panc1-Zellen ließen sich im Westernblot-Verfahren keine eindeutigen Expressionsunterschiede metabolischer Enzyme in den Panc1-Zellen bei siRNA-vermitteltem KD der Nestin-Expression erkennen. Bei der Expression der SDHB ließ sich allenfalls in den HMF-kokultivierten Panc1-Zellen eine geringe Minderexpression beim KD der Nestin-Expression feststellen. Die Expression der G6PD blieb unbeeinflusst vom KD der Nestin-Expression in den Panc1-Zellen unter beiden Stromabedingungen. Die HSC-kokultivierten, Nestin-defizienten Panc1-Zellen wiesen eine stabile Mehrexpression der TALDO bei einer geringgradigen Minderexpression der TKT auf. Bei den HMF-kokultivierten Panc1-Zellen ließen sich keine Auswirkungen des KD der Nestin-Expression auf die Expression der TALDO und TKT nachweisen (Abbildung 3-21).

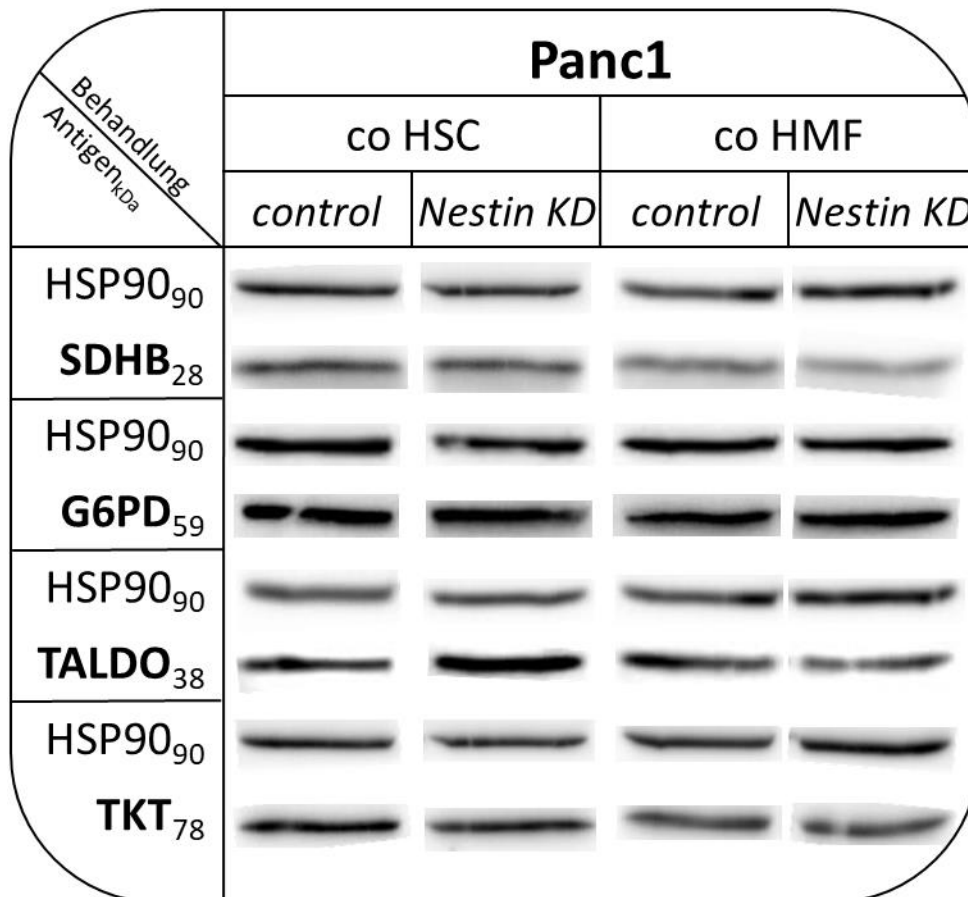


Abbildung 3-21 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter Panc1-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von Kontroll-siRNA (control)- und Nestin-siRNA (Nestin-Knockdown (KD))-transfizierten Panc1-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-3 a-d).

Bei den kRas-Zellen ließ sich nach siRNA-vermitteltem KD der Nestin-Expression im Westernblot eine konsistente Minderexpression der SDHB in Kokultur mit HSC nachweisen. HMF-kokultivierte, Nestin-defiziente kRas-Zellen wiesen diesen Effekt hingegen nicht auf. Die Expression der G6PD, TALDO und TKT blieb bei Suppression der Nestin-Expression unter beiden Stromabedingungen unverändert (Abbildung 3-22).

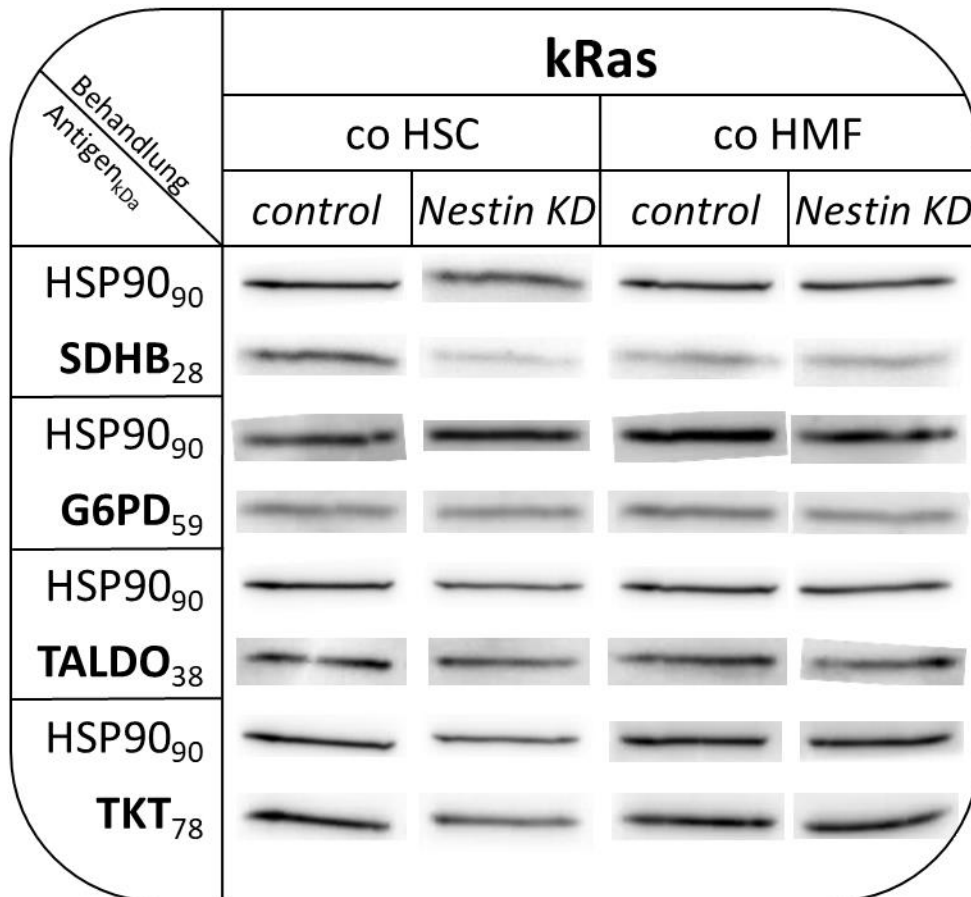


Abbildung 3-22 Westernblot-basierte Expressionsanalyse metabolischer Enzyme HSC- oder HMF-kokultivierter kRas-Zellen bei Suppression der Nestin-Expression

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von Kontroll-siRNA (control)- und Nestin-siRNA (Nestin-Knockdown (KD))-transfizierten kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) mittels Westernblot detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. Die originalen Westernblots, aus denen die dargestellten Ausschnitte entnommen wurden, sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-3 e-h).

Zusammenfassend führte der KD von Nestin zu keinen wesentlichen Expressionsunterschieden der analysierten metabolischen Enzyme bei den PDEZ. Eine Ausnahme hiervon stellte bei den Panc1-Zellen die dem Anschein nach unabhängig von TKT stehende, vermehrte Expression von TALDO in Kokultur mit HSC dar. Die kRas-Zellen wiesen beim Knockdown von Nestin ausschließlich eine konsistente Minderepression von SDHB in Kokultur mit HSC auf.

4 Diskussion

Das PDAC geht aus prämaligen Vorläuferläsionen der PDEZ hervor (Pelosi et al. 2017). Diese Entwicklung ist gekennzeichnet durch sequenzielle Veränderungen im Erbmateriale der PDEZ, beginnend mit der Aktivierung von Onkogenen wie kRAS, in späteren Phasen mit Ausfall der Tumorsuppressorgene TP53, CDKN2a/p16 und SMAD4 (Grant et al. 2016, Pelosi et al. 2017). Das PDAC bildet hämatogene Fernmetastasen fast immer primär in der Leber (>70%) (Hiddemann et al. 2004). Das Auftreten von Lebermetastasen beim PDAC limitiert therapeutische Optionen und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013, Pelosi et al. 2017). Die pathogenetischen Grundlagen und Mechanismen der Metastasierung des PDAC in die Leber sind komplex und kaum verstanden, es gibt jedoch Hinweise, dass dieser Prozess nicht erst ein später Schritt in der Karzinogenese des PDAC darstellt, sondern auch bereits im Stadium der prämaligen PanIn erfolgt (Brodthorn 2016, Fidler 2003, Hanahan und Weinberg 2011, Klein 2009, Rhim et al. 2012). Eine entzündliche Lebermikroumgebung kann die Metastasierung des PDAC in die Leber begünstigen und wird durch den Primarius zur Schaffung einer prometastatischen Nische aktiv induziert (Grünwald et al. 2016, Nielsen et al. 2016). Hierbei nimmt die Transdifferenzierung von HSC in HMF eine wichtige Rolle ein (s. Abschnitt 1.2.3).

Im Kontext dessen wurde in der Arbeitsgruppe bereits das Wachstumsverhalten prämaliger kRas-Zellen und maligner Panc1-Zellen in einer HSC-dominierten (=physiologischen) und HMF-dominierten (=entzündlichen) Lebermikroumgebung untersucht (Lenk et al. 2017). Weiterhin wurden Stoffwechselcharakteristika und metabolische Anpassungen der PDEZ in diesen unterschiedlichen Stromabedingungen analysiert. Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass das PDAC, wie auch andere Tumorentitäten, einen dysregulierten Metabolismus hin zur anaeroben Glykolyse trotz ausreichendem Sauerstoffangebot aufweist, zeigten auch die malignen Panc1-Zellen einen vermehrt durch die Glykolyse charakterisierten Metabolismus (Fabian 2019, Guillaumond et al. 2014). Die prämaligen kRas-Zellen hingegen tendierten vermehrt zur oxidativen Phosphorylierung. In einer entzündlichen Lebermikroumgebung nahm die glykolytische Aktivität der PDEZ zu (s.

Abschnitt 1.5) (Fabian 2019). Zur weiteren Charakterisierung wurden die PDEZ auch hinsichtlich ihrer Krebsstammzeleigenschaften untersucht. Beide PDEZ-Zelllinien wiesen in einer physiologischen Lebermikroumgebung ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial auf. Zellklone mit erhöhten Krebsstammzeleigenschaften exprimierten bei den Panc1-Zellen vermehrt die Krebsstammzellmarker ABCG2, Nanog und Nestin und bei den kRas-Zellen Nanog (Knaack et al. 2018). Basierend auf diesen Befunden war das Ziel dieser Doktorarbeit die Untersuchung des kausalen Zusammenhanges zwischen Schlüsselenzymen des Glukosemetabolismus und Krebsstammzeleigenschaften von PDEZ im Kontext der hepatischen Mikroumgebung.

4.1 Eine effiziente Glykolyse fördert das Wachstum von PDEZ in unterschiedlichen Lebermikroumgebungen

Die prämaligen kRas- und malignen Panc1-Zellen zeigten im Kontext einer physiologischen Lebermikroumgebung einen vermehrt durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus, was sich auch in einer vermehrten Expression der SDHB zeigte (Fabian 2019). Bei siRNA-vermittelter Suppression der SDHB-Expression nahmen Panc1-Zellen wieder einen vermehrt glykolytischen Phänotyp an, gekennzeichnet durch eine stärkere Expression der G6PD (s. Abschnitt 3.2.4). Dies war vergesellschaftet mit einem vermehrten Zellwachstum der Panc1-Zellen (s. Abschnitt 3.2.2). Auch die prämaligen kRas-Zellen zeigten ein vermehrtes Zellwachstum bei Suppression der SDHB-Expression im Kontext einer physiologischen Lebermikroumgebung, dies ging jedoch nicht mit einer vermehrten Expression der G6PD einher (s. Abschnitt 3.2.2 und 3.2.4). Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den vorherigen Erkenntnissen der Arbeitsgruppe, dass eine vermehrte Expression der SDHB in einem physiologischen Lebermikromilieu zu einem verminderten Zellwachstum ruhender PDEZ führt (Fabian 2019). Dass das vermehrte Zellwachstum der SDHB-supprimierten PDEZ dabei allein auf eine vermehrte G6PD-Expression zurückzuführen ist, lässt sich anhand der Daten von den kRas-Zellen für die PDEZ im Allgemeinen nicht bestätigen. Mit einer vermehrten Aktivität des PPW über eine erhöhte Expression der G6PD ergibt sich jedoch für die malignen Panc1-Zellen hierbei die Möglichkeit zur Synthese der für die Zellteilung notwendigen zellulären Bestandteile, die damit das Zellwachstum der Panc1-Zellen begünstigen (Vander Heiden et al. 2009). Bei der Expression der

Krebsstammzellmarker Nanog, Nestin, SOX-2 und ABCG2 zeigten die SDHB-supprimierten PDEZ insgesamt keine signifikanten Unterschiede im Kontext eines physiologischen Lebermikromilieus. Die zumindest erkennbar deutlichsten Expressionsunterschiede wiesen Panc1-Zellen bei einer vermehrten Nanog-, und kRas-Zellen bei einer vermehrten Nestin-Expression auf. Die Koloniebildungsfähigkeit, die ein indirektes Maß für das Selbsterneuerungspotenzial darstellt, blieb bei den Panc1-Zellen unbeeinflusst von der Suppression der SDHB-Expression. Im Gegensatz dazu wiesen kRas-Zellen eine deutlich erhöhte Koloniebildungsfähigkeit bei Suppression der SDHB im Kontext eines physiologischen Lebermikromilieus auf (s. Abschnitt 3.2.3).

Im Vergleich zur aktuellen Studienlage stimmen die angeführten Daten darin überein, dass eine verminderte Expression der SDHB mit einem stärkeren Wachstum maligner Zellen unterschiedlicher Entitäten assoziiert ist. So wurde beispielsweise ein vermehrtes Zellwachstum bei Suppression der SDHB beim hepatozellulären Karzinom (HCC) und beim Ovarialkarzinom festgestellt (Aspuria et al. 2014, Tseng et al. 2018). Tumorzellen verschiedener Entitäten zeichnen sich durch eine verminderte Expression der SDHB im Vergleich zu physiologischen Geweben gleichen Ursprunges aus. Desweiteren konnte im kolorektalen Karzinom (CRC) eine abnehmende SDHB-Expression mit einem niedrigen Differenzierungsgrad der Tumorzellen assoziiert werden (Zhang et al. 2013). Im klinisch-pathologischen Kontext geht eine verminderte SDHB-Expression mit einer schlechteren Prognose einher (Aspuria et al. 2014, Tseng et al. 2018, Zhang et al. 2013). Wie bereits erwähnt, weisen Tumoren - wie auch das PDAC - häufig einen dominierend glykolytischen Metabolismus auf, der im Gegensatz zu physiologischen Geweben unabhängig von den lokalen Sauerstoffbedingungen auftritt (Guillaumond et al. 2014). Für dieses als „Warburg-Effekt“ genannte Phänomen wurden bereits mehrere Erklärungsansätze geliefert, u.a. auch daraufhin ausgerichtet, inwieweit dieser Metabotyp Tumorentstehung, -wachstum und -erhalt fördert (s. Abschnitt 1.3.1). Hierin inbegriffen konnten auch Belege für Mechanismen erbracht werden, wie eine verminderte Aktivität oder Expression der SDHB die Entwicklung dieses Metabotypen und die Tumorprogression unterstützt. Beispielsweise akkumuliert bei Inhibition der SDH dessen Substrat Succinat. Dieses inhibiert wiederum in höherer Konzentration *hypoxic-induced-factor-1-alpha* (HIF1- α) Prolylhydroxylasen, was zu einer

verminderten Inaktivierung des Transkriptionsfaktorkomplexes HIF1- α führt (Bardella et al. 2011). Der Transkriptionsfaktorkomplex *hypoxic-induced-factor-1* (HIF1) konvertiert in seine aktive Form HIF1- α , wenn die Zelle unter hypoxischen Bedingungen steht. HIF1- α induziert dann u.a. eine vermehrte Expression von Glukosetransportern, Enzymen der Glykolyse und Enzymen zur Laktatverstoffwechslung. Eine dauerhafte Stabilisierung des HIF1- α führt damit zu einer dauerhaften Ausbildung eines glykolytischen Metabolismus – selbst unter normoxischen Bedingungen (Bardella et al. 2011, DeBerardinis et al. 2008). Neben dem Vorhandensein diverser Makromoleküle für die Proliferation von Tumorzellen fördert ein glykolytischer Metabolismus die Resistenz der Tumorzellen gegenüber hypoxischen, nährstoffarmen und azidotischen Bedingungen, die im Inneren von expandierendem Tumorgewebe vorherrschen können (King et al. 2006, Robertson-Tessi et al. 2015). Auch für das PDAC konnte eine Hochregulation von HIF1- α nachgewiesen werden (Valle et al. 2018). Als weiterer, das Tumorstadium fördernder Mechanismus einer verminderten SDHB-Aktivität wird die damit einhergehende, verminderte Mitochondrienfunktion angeführt. Mitochondrien sind in vielen, proapoptotischen Signalkaskaden involviert. Aus diesem Grund kann eine mitochondriale Defizienz zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führen (King et al. 2006). Bezüglich der mit der mitochondrialen Aktivität assoziierten Bildung von ROS ist die Studienlage uneinheitlich. Einige Quellen assoziieren mit einer verminderten Aktivität der SDH eine vermehrte Bildung von ROS und betonen ihre Bedeutung auf die Karzinogenese bedingt durch die ROS-induzierte, genomische Instabilität der Tumorzellen (Bardella et al. 2011, Zhao et al. 2017b). Andere Studien weisen darauf hin, dass eine verminderte mitochondriale Aktivität auch zu einer geringeren Ausbildung von ROS führt und die Tumorzellen damit besser vor den zellschädigenden Einwirkungen der ROS geschützt sind (King et al. 2006).

Diese Erkenntnisse zugrunde liegend, lässt sich folgender Erklärungsansatz postulieren: Mit einer verminderten Expression der SDHB nehmen die PDEZ einen vermehrt glykolytischen Metabolismus an. Über eine vermehrte Bereitstellung aus der Glykolyse abgeleiteter Makromoleküle für die Zellteilung, einer erhöhten Anpassung gegenüber hypoxischen oder nährstoffarmen Umgebungsbedingungen in proliferierendem Gewebe und einer erhöhten Resistenz gegenüber proapoptotischen Signalkaskaden zeigen die PDEZ ein vermehrtes

Zellwachstum, welches sich in einer höheren Lebendzellzahl niederschlägt (s. Abschnitt 3.2.2). Dass die Panc1-, nicht aber die kRas-Zellen, hierbei eine vermehrte Expression der G6PD aufweisen, lässt sich u.a. durch die Einwirkungen von TP53 erklären. Dieser bindet direkt an die G6PD und inhibiert dessen Funktion (Ying et al. 2012). Die TP53-mutierten Panc1-Zellen können die vermehrt anfallenden Intermediate der Glykolyse über den oxidativen Teil des PPW mit einer vermehrten, unregulierten G6PD-Expression und -Aktivität verstoffwechseln und darüber Nukleotide für die Zellteilung generieren. Die kRas-Zellen hingegen, die keine TP53-Mutation aufweisen, unterstützen die Zellteilung auch über eine vermehrte PPW-Aktivität, verstoffwechseln die Glykolyse-Intermediate jedoch vor allem über den reduktiven Teil des PPW. In einer massenspektrometrischen Analyse über die Glukoseverstoffwechslung von Tumorzellen in einem kRas-mutierten PDAC-Mausmodell konnten Ying et al. eine KRAS-induzierte Aktivitätssteigerung des reduktiven Anteils des PPW feststellen, die unabhängig von der Generierung von NADPH abläuft (Ying et al. 2012). Eine vermehrte Expression und Aktivität der G6PD wird bei den prämaligen kRas-Zellen durch TP53 daher vermutlich inhibiert. Bei der qRT-PCR-basierten Messung der Krebsstammzellmarkerexpression konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede bei den SDHB-supprimierten PDEZ im Vergleich zu den control-Zellen nachgewiesen werden. Die jedoch erkennbar vermehrte Nanog-Expression bei den SDHB-supprimierten Panc1-Zellen fügt sich in das Bild einer negativ-korrelierenden Beziehung zwischen SDHB und Nanog, welche in Abschnitt 4.3 detaillierter diskutiert wird. Tseng et al. beobachteten beim HCC, dass die Suppression der SDHB-Expression mit einem erhöhten Koloniebildungspotenzial *in vitro* vergesellschaftet ist (Tseng et al. 2018). Übereinstimmend damit bildeten auch die kRas-Zellen in dieser Arbeit vermehrt Kolonien aus. Die Panc1-Zellen wiesen dieses vermehrte Koloniebildungspotenzial bei Suppression der SDHB in einer physiologischen Lebermikroumgebung hingegen nicht auf. Des Weiteren exprimierten die prämaligen kRas-Zellen unter diesen Bedingungen vermehrt Nestin im Gegensatz zu den Panc1-Zellen. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied zwischen den prämaligen kRas- und den malignen Panc1-Zellen könnte ein unterschiedlich ausgeprägter hypoxischer Reiz bei Suppression der SDHB-Expression darstellen. Wie bereits mehrfach erwähnt, weisen die prämaligen kRas-Zellen einen vordergründig durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus, die malignen Panc1-Zellen hingegen vordergründig einen

glykolytischen Metabolismus auf (s. Abschnitt 1.5) (Fabian 2019). Es wäre daher anzunehmen, dass es bei den kRas-Zellen bei Suppression der SDHB zu einer im Vergleich zu den Panc1-Zellen verstärkten Akkumulation von Succinat und einer weitaus reduzierteren Inaktivierung von HIF1- α kommt. Bezogen auf die Vorerkenntnisse der Gruppe, dass sowohl Panc1- als auch kRas-Zellen in einer physiologischen Lebermikroumgebung ein erhöhtes Koloniebildungspotenzial aufweisen, deuten die Daten dieser Studie für die Panc1-Zellen an, dass dies nicht von der Expression der SDHB abhängt. Die kRas-Zellen hingegen nehmen bei Suppression der SDHB-Expression im Kontext einer physiologischen Lebermikroumgebung einen vermehrt glykolytischen Metabolismus wie die Panc1-Zellen an und erwerben ein erhöhtes Koloniebildungspotenzial (Fabian 2019, Knaack et al. 2018).

Im Kontext einer entzündlichen Lebermikroumgebung zeigten die prämaligen kRas- und die malignen Panc1-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression ein signifikant gesteigertes Zellwachstum. Die Panc1-Zellen exprimierten unter diesen Bedingungen verstärkt die SDHB, die kRas-Zellen hingegen nicht. Bei der Expression von Krebsstammzellmarkern wiesen lediglich die kRas-Zellen eine signifikant erniedrigte Expression des Transkriptionsfaktors SOX-2, aber eine tendenziell vermehrte Expression von Nanog und ABCG2 auf, wohingegen die Panc1-Zellen eine allenfalls geringgradig verminderte Expression von Nanog und ABCG2 zeigten. Ähnlich wie beim Zellwachstum bildeten die PDEZ bei Suppression der G6PD-Expression in einer entzündlichen Lebermikroumgebung vermehrt Kolonien aus, was auf ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial hindeutet. Bei den Panc1-Zellen ließen sich bei Suppression der G6PD-Expression zudem leicht vermehrt Klone mit erhöhtem Stammzellpotenzial nachweisen.

Die aktuelle Studienlage zum Einfluss der G6PD auf die Tumorbilogie ist heterogen und zwischen unterschiedlichen Tumorentitäten divergent. So wiesen beispielsweise Lucarelli et al. eine Überexpression der G6PD im klarzelligen Nierenzellkarzinom (CCRCC) nach. Bei Inhibition der G6PD-Expression kam es in solchen Tumorzellen zu einer deutlichen Reduktion der Lebendzellzahlen *in vitro*, einer signifikanten Reduktion der NADPH-Level gefolgt von einem Anstieg von ROS. Sie schlossen daraus, dass die G6PD eine entscheidende Rolle in der Redoxhomöostase im CCRCC einnimmt und diese daher als potenzielle therapeutische Zielstruktur anzusehen ist (Lucarelli et al. 2015). Auch beim HCC konnte eine Korrelation

zwischen der Überexpression von G6PD und einem geringeren Tumordifferenzierungsgrad, einer vermehrten Metastasierung und einer schlechteren Prognose gezeigt werden (Kowalik et al. 2016). Pu et al. stellten die Bedeutung der G6PD als prognostischen Marker im Kontext der Metastasierung von Brustkrebs heraus und wiesen eine G6PD-Überexpression in Primariusresektaten solcher Patienten nach, bei denen es in der Folge zu einer Rekurrenz der Erkrankung durch das Auftreten von Metastasen oder eines Lokalrezidivs kam (Pu et al. 2015). Ghergurovich et al. konnten für die G6PD keine Rolle in der Metastasierung verschiedener Tumoren zeigen. Bei Xenotransplantation G6PD-defizienter, kRas- und TP53-mutierter Tumorzellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) konnten sie keine durch die G6PD-Inhibition bedingten Einschränkungen auf die Ausbildung von Metastasen nachweisen. Auch G6PD-defiziente, kRas- und TP53-mutierte Brustkrebszellen sowie Tumorzellen aus dem CRC bildeten bei orthotoper Xenotransplantation in Mäuse erfolgreich Metastasen aus und proliferierten (Ghergurovich et al. 2020). Wie bereits erwähnt, wiesen Ying et al. beim PDAC eine präferenzielle Glukoseverstoffwechselung über den reduktiven Teil des PPW nach, die unabhängig von der NADPH-Generierung abläuft. Sie schätzten die Rolle der durch KRAS-Mutation induzierten und durch TP53 regulierten Expression der G6PD daher als nachrangig für die Biosynthese von Ribonukleotiden ein (Ying et al. 2012).

Vor allem die letztgenannten Erkenntnisse über die Rolle der G6PD im PDAC von Ying et al. könnten einen Erklärungsansatz dafür liefern, warum die Suppression der G6PD-Expression nicht zu einer deutlichen Reduktion der Lebendzellzahlen der kRas- und Panc1-Zellen führte. Die Daten deuten darauf hin, dass die Panc1- und kRas-Zellen die zur Zellteilung notwendigen Ribonucleotide aus anderen Stoffwechselwegen als dem oxidativen PPW beziehen und die Redoxhomöostase der Zellen nicht maßgeblich von der Funktionalität der G6PD wie im CCRCC abhängt (Lucarelli et al. 2015). Vander Heiden et al. postulierten, dass diejenigen Tumorzellen am schnellsten proliferieren, die am effizientesten Glutaminolyse und Glykolyse betreiben. Aus beiden anabolen Stoffwechselwegen leiten sich die für die Zellproliferation essenziellen Bausteine ab, wie beispielsweise glykolytische Metabolite für die Aminosäuresynthese, Acetyl-CoA für die Lipidsynthese und Ribose für die Nukleotidsynthese (Vander Heiden et al. 2009). Ein möglicher Erklärungsansatz, warum die kRas- und Panc1-Zellen bei Suppression der G6PD-Expression sogar stärker proliferierten,

könnte daher sein, dass es durch die Inhibition der G6PD zu einer effizienteren Einschleusung des Substrates Glucose-6-phosphat in die Glykolyse via Glucose-6-phosphat-Isomerase und Phosphofruktokinase-1 kommt. Hierüber werden glykolytische Metaboliten effizienter der Aminosäuresynthese und dem von Panc1- und kRas-Zellen präferierten reduktiven Teil des PPW für die Ribonukleotidsynthese zugeführt. Die G6PD-supprimierten Panc1-Zellen exprimierten vermehrt SDHB. Ob dies durch eine erhöhte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung zur Deckung des ATP-Bedarfs bedingt ist oder ob die vermehrte SDHB-Expression letztlich Ausdruck einer vermehrten Glutaminolyse zur Deckung anaboler Bedürfnisse stärker proliferierender Zellen ist, wurde in dieser Studie nicht geklärt. Die G6PD-supprimierten kRas-Zellen hingegen zeigten keine Veränderung der SDHB-Expression. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die prämaligen kRas-Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung vermehrt G6PD exprimieren und sich dem glykolytischen Metabotypen der malignen Panc1-Zellen annähern (Fabian 2019). Die Daten aus dieser Arbeit stützen die Aussage, dass die Suppression der G6PD-Expression den Metabolismus der prämaligen PDEZ nicht wesentlich beeinflusst. Knaack et al. zeigten auf, dass die kRas- und Panc1-Zellen in einer entzündlichen Lebermikroumgebung weniger Kolonien im Vergleich zur physiologischen Lebermikroumgebung ausbildeten. Die Verteilung der Anteile der unterschiedlichen Klonformen blieb dabei unbeeinflusst von den stromalen Bedingungen (Knaack et al. 2018). In dieser Promotionsarbeit ging die Suppression der G6PD-Expression mit einem erhöhten Koloniebildungspotenzial einher (s. Abschnitt 3.3.3). Folmes et al. schlussfolgerten in ihrer Abhandlung über den Metabolismus von Stammzellen sowohl im physiologischen als auch im tumorösen Kontext, dass dieser plastisch sei und in Abhängigkeit des umgebenden Milieus, der Homöostase und des Differenzierungsgrades der Zellen stehe. Glykolytische Stoffwechselprozesse dienen dem Anabolismus dedifferenzierter, proliferierender Stammzellen mit hohem Selbsterneuerungspotenzial (Folmes et al. 2012). Dies zugrunde legend lässt sich daher postulieren, dass eine effizientere Glykolyse bei Suppression der G6PD-Expression die anabole Grundlage für ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ darstellt und damit das Koloniebildungspotenzial der PDEZ fördert. Diese These wird durch eine anteilig höhere Ausbildung von Meroklonen bei den Panc1-Zellen unterstützt (s. Abschnitt 3.3.3). Auf die Expression der Krebsstammzellmarker hat die Suppression der G6PD-Expression keinen eindeutigen Effekt

in beiden PDEZ-Zelllinien. Die verminderte Expression von SOX-2 steht zwar nicht im Einklang mit der vermehrten Koloniebildung, könnte dabei aber Ausdruck einer von der Konzentration diverser Metaboliten (wie beispielsweise Glukose, ATP) abhängigen, epigenetischen Regulation sein. Beispielweise sei hier die *O-linked-N-acetylglucosamine* (O-GlcNac)-vermittelte posttranslationale Modifikation genannt (Jang et al. 2012).

4.2 Die Krebsstammzellmarker Nanog und Nestin können das Wachstum der PDEZ und die Expression metabolischer Enzyme in den PDEZ beeinflussen

Die Suppression der Nanog-Expression in den prämaligen kRas- und malignen Panc1-Zellen führte unabhängig von den stromalen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Lebendzellzahlen (s. Abschnitt 3.4.2). Hierbei konnten kaum Auswirkungen auf die Expression metabolischer Enzyme in den prämaligen kRas-Zellen beobachtet werden. Die malignen Panc1-Zellen hingegen exprimierten bei Suppression der Nanog-Expression konsistent vermehrt eines der Schlüsselenzyme der oxidativen Phosphorylierung, die SDHB, und vermindert G6PD und TKT, Enzyme des oxidativen und reduktiven Teils des PPW. Unter dem Einfluss einer entzündlichen Lebermikroumgebung exprimierten die Panc1-Zellen dabei jedoch ähnlich viel G6PD (s. Abschnitt 3.4.4). Die Einflüsse auf das Koloniebildungspotenzial der PDEZ durch die Suppression der Nanog-Expression divergierten in Abhängigkeit von der getesteten Zellreihe und den Stromabedingungen. Die Panc1-Zellen bildeten gleich viele oder sogar mehr Kolonien bei Suppression der Nanog-Expression aus, zeigten jedoch auch eine signifikante Mehrausbildung von Paraklonen. In einer physiologischen Lebermikroumgebung bildeten die kRas-Zellen signifikant weniger Kolonien bei Suppression der Nanog-Expression aus. Allerdings bildeten sie dabei anteilig mehr Kolonien mit vermehrtem Stammzellpotenzial. In einer entzündlichen Lebermikroumgebung tendierten die kRas-Zellen wie die Panc1-Zellen zu einer vermehrten Ausbildung von Paraklonen (s. Abschnitt 3.4.3).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Zellzahlbestimmungen wiesen auch Deng et al. an Eca-109-Zellen beim Ösophaguskarzinom und Pitrone et al. an humanen, mesenchymalen Stammzellen ein vermindertes Zellwachstum *in vitro* bei Suppression der

Nanog-Expression nach (Deng et al. 2021, Pitrone et al. 2019). Pitrone et al. beobachteten in Nanog-supprimierten, aus humanem Fettgewebe generierten mesenchymalen Stammzellen einen deutlich höheren Anteil an Zellen in der G0/G1-Phase und eine stärkere Expression Zellzyklus-regulierender Proteine wie CCDN1, p21/CDKN1A und p27/CDKN1B. Sie sahen die verminderte Proliferation der Nanog-supprimierten Stammzellen durch einen TP53- und PREF1-vermittelten Zellzyklusarrest der Zellen begründet (Pitrone et al. 2019). Da in dieser Arbeit gleichermaßen die prämaligen, funktionell kompromittierten TP53-Wildtyp kRas-Zellen wie auch die TP53-mutierten Panc1-Zellen signifikant weniger proliferierten, lässt sich vermuten, dass noch weitere Mechanismen hierin involviert sind (Thomas et al. 1999). Die signifikant geringeren Lebendzellzahlen der PDEZ bei Suppression der Nanog-Expression weisen auf eine wichtige Rolle von Nanog im Tumorwachstum und -erhalt des PDAC hin. Anders als die prämaligen kRas-Zellen, bei denen der KD der Nanog-Expression zu keiner konsistent veränderten Expression der untersuchten metabolischen Enzyme führte, wiesen die Panc1-Zellen eine konsistente Mehrexpression der SDHB unter unterschiedlichen Stromabedingungen auf. Hierbei wird erneut die negative Korrelation zwischen der Expression der SDHB und Nanog sichtbar, die in Abschnitt 4.3 detaillierter diskutiert wird. Da die Panc1-Zellen zudem auch eine verminderte Expression der G6PD und TKT aufwiesen, lässt sich spekulieren, dass die Panc1-Zellen bei Suppression der Nanog-Expression einen vermehrt durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus annehmen und eine verminderte Aktivität des PPW aufweisen. Dies könnte Ausdruck eines verminderten Bedarfs an Ribonukleotiden für die Zellteilung der geringer proliferierenden, Nanog-defizienten Panc1-Zellen sein. Die vermehrte Einschleusung von Glukose in die oxidative Phosphorylierung mit vermehrter SDHB-Expression könnte weiterhin Ausdruck einer effizienteren Energiegewinnung von differenzierten Paraklonzellen sein, welche vermehrt im CFA bei Nanog-supprimierten Panc1-Zellen nachgewiesen wurden. Die Daten weisen auf einen metabolischen Wandel der Nanog-supprimierten Panc1-Zellen hin, und zwar weg von der Glykolyse zur Deckung anaboler Bedürfnisse stark proliferierender, dedifferenzierter Zellen hin zur oxidativen Phosphorylierung zur effizienteren Deckung kataboler Bedürfnisse minderproliferierender, differenzierter Zellen. Diese Aussage würde mit den Erkenntnissen von Folmes et al. über die Proliferation und die hierfür erforderliche metabolische Grundlage von CSC übereinstimmen (Folmes et al. 2012). Anders als es diese Aussage implizieren würde

und entgegen den Beobachtungen von Deng et al. an Eca-109-Zellen beim Ösophaguskarzinom sowie Zhou et al. an HepG2-Zellen beim HCC bildeten die Panc1- unter beiden Stromabedingungen sowie die HMF-kokultivierten kRas-Zellen beim KD der Nanog-Expression mehr Kolonien im Vergleich zu den control-Zellen aus (s. Abschnitt 3.4.3) (Deng et al. 2021, Zhou et al. 2014). Wie bereits erwähnt, bildeten die Panc1- und die HMF-kokultivierten kRas-Zellen dabei signifikant vermehrt Paraklone, die sich durch eine geringe Proliferation auszeichnen, in serieller Neuaussaat nach Isolation keine weiteren Subkolonien ausbilden und nur eine geringe Lebensspanne aufweisen (Beaver 2012). Eine Bewertung des Selbsterneuerungspotenziales der untersuchten Zellreihe im Generellen sollte daher nicht nur anhand der Anzahl der ausgebildeten Kolonien erfolgen, sondern auch die Morphologie und damit den Kolonietypus dieser miteinbeziehen. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Arbeit zu denen von Zhou et al. und Deng et al. bei den Koloniezahlen könnte beispielweise eine unterschiedliche Dauer der Stabilität des KD von Nanog sein.

Die Suppression der Nestin-Expression führte zu einer deutlichen Reduktion der Lebendzellzahlen der PDEZ, ein Effekt, der besonders in den kRas-Zellen zu beobachten war (s. Abschnitt 3.5.2). Der KD von Nestin hatte hingegen nur geringe Auswirkungen auf die Expression metabolischer Enzyme der PDEZ. Die prä-malignen kRas-Zellen exprimierten etwas weniger SDHB und die malignen Panc1-Zellen etwas mehr TALDO bei unveränderter TKT-Expression in einer physiologischen Lebermikroumgebung. Anderweitige Expressionsunterschiede bei den metabolischen Enzymen ließen sich in den PDEZ im Kontext unterschiedlicher Lebermikroumgebungen nicht feststellen. Die prä-malignen kRas-Zellen bildeten bei Suppression der Nestin-Expression unabhängig von den Stromabedingungen etwas weniger Kolonien aus, hierunter jedoch anteilig mehr Meroklone und weniger Paraklone. Die Nestin-supprimierten Panc1-Zellen bildeten im Kontext einer physiologischen Lebermikroumgebung etwas mehr Kolonien aus mit anteilig mehr Paraklonen und weniger Mero- sowie Holoklonen. Im Kontext einer entzündlichen Lebermikroumgebung bildeten die Panc1-Zellen beim KD der Nestin-Expression gleich viele Kolonien wie die control-transfizierten Zellen mit anteilig etwas mehr Meroklonen und weniger Holoklonen aus.

Die Zellzahlergebnisse aus dieser Doktorarbeit bestätigen die Ergebnisse von Matsuda et al., die ebenfalls eine deutlich verminderte Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien Panc1 und PK-45H bei siRNA-basiertem KD von Nestin nachwiesen. Sie führten die verminderten Zellzahlen beim KD von Nestin auf eine vermehrte Apoptose der PDAC-Zelllinien zurück (Matsuda et al. 2016). Eine verminderte Proliferation von Tumorzellen bei Suppression der Nestin-Expression konnte zudem auch beim NSCLC und beim CRC beobachtet werden (Chen et al. 2014, Li et al. 2015). Wang et al. stellten beim NSCLC die hohe Bedeutung von Nestin in der Redoxhomöostase von Tumorzellen heraus und wiesen eine erhöhte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber ROS beim KD von Nestin nach. In einem positiven Rückkopplungsmechanismus führte das über den Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2)-induzierte Nestin zu einem geringeren Abbau von NRF2 durch kompetitive Bindung an *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1). NRF2 gilt als „Masterregulator“ bei der Expression diverser antioxidativer Enzyme und wird bei oxidativem Stress der Zellen physiologisch vermehrt gebildet. Durch Stabilisierung der zellulären NRF2-Konzentration via Nestin können Tumorzellen eine dauerhafte Resistenz gegenüber ROS erwerben. Im physiologischen Kontext mindert NRF2 die Bildung von ROS über eine Förderung der Glykolyse durch Umleitung von Glukose und Glutamin sowie über eine direkte Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität (Wang et al. 2019). Im Tumorkontext könnte dieser Mechanismus an der dauerhaften Ausbildung der aeroben Glykolyse im Sinne des „Warburg-Effektes“ partizipieren. Dies zugrunde liegend, lassen sich die Daten dieser Arbeit wie folgt interpretieren: Die prämaligen kRas-Zellen, die einen primär durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus aufweisen, sind einhergehend mit der erhöhten mitochondrialen Aktivität deutlich vulnerabler gegenüber ROS. Konkordant mit den Ergebnissen aus dem NSCLC sind diese daher stärker von der ROS-induzierten Apoptose bei Suppression der Nestin-Expression betroffen als die glykolytischen Panc1-Zellen (s. Abschnitt 1.5). Die verbleibenden kRas-Zellen, die den KD von Nestin überstanden haben, weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber ROS durch eine verminderte mitochondriale Aktivität mit geringerer Expression der SDHB auf, und zwar im Kontext einer physiologischen Lebermikroumgebung. In einer entzündlichen Lebermikroumgebung nehmen die prämaligen kRas-Zellen vermehrt einen glykolytischen Metabotypen ähnlich den malignen Panc1-Zellen an und zeichnen sich wie diese nicht durch eine veränderte

Expression der anderen metabolischen Enzyme aus. Dass die malignen Panc1-Zellen im Kontext einer physiologischen Lebermikroumgebung eine vermehrte Expression der TALDO beim KD von Nestin aufweisen, könnte über den vermehrten Bedarf an NADPH zur Regeneration von Glutathion als Reduktionsäquivalent der ROS bei erhaltener mitochondrialer Funktion der Panc1-Zellen erklärt werden. Warum sich dies jedoch nicht in einer vermehrten Expression der TKT niederschlägt, bleibt in dieser Studie ungeklärt und bedarf weiterer Analysen. Es sei hierbei nochmal herausgestellt, dass die ROS-induzierte Apoptose als Ursache der signifikant niedrigeren Zellzahlen der PDEZ bei Suppression der Nestin-Expression ein hypothetischer Erklärungsansatz ist und in dieser Doktorarbeit nicht primär untersucht wurde. Folgeuntersuchungen im Sinne von ROS-Messungen im selben experimentellen Setting könnten beispielsweise zur Klärung dieser Hypothese beitragen. Die PDEZ wiesen bei Suppression der Nestin-Expression nur bedingt Einschränkungen ihres Selbsterneuerungspotenzials auf. So bildeten die prämaligen kRas-Zellen unabhängig von den stromalen Bedingungen zwar weniger Kolonien, dafür aber vermehrt Meroklone, die mit mehr Krebsstammzeleigenschaften assoziiert werden, aus. Wie auch beim KD von Nanog, bildeten die Nestin-defizienten Panc1-Zellen in einem physiologischen Lebermikromilieu tendenziell mehr Kolonien mit anteilig mehr Para- und weniger Meroklonen aus. In einer entzündlichen Lebermikroumgebung minderte der KD von Nestin weder das Koloniebildungspotenzial noch die Ausbildung von Klonen mit erhöhtem Stammzellpotenzial. Damit unterscheiden sich diese Daten erheblich von den Ergebnissen von Matsuda et al., die eine verminderte Sphärenausbildung der Panc1- und PK-45H-Zellen beim KD von Nestin beobachteten (Matsuda et al. 2016). Sie sind auch diskrepant zu den Ergebnissen von Li et al. und Chen et al., die ebenfalls eine verminderte *in vitro* Koloniebildung im CRC bzw. NSCLC beobachteten (Chen et al. 2014, Li et al. 2015). Wie es auch bereits beim KD von Nanog angeführt wurde, könnte die Diskrepanz der zuvor genannten Ergebnisse durch eine unterschiedliche Stabilität des KD von Nestin begründet sein. Weitere Untersuchungen, die im selben experimentellen Ansatz die Stabilität des KD am Ende des Kulturzeitraumes des CFA erneut überprüfen oder die Zellen verwenden, bei denen die Expression der genannten Gene stabil supprimiert ist, könnten hierbei zur Klärung beitragen.

4.3 Die Wechselwirkung von SDHB und Nanog – Ist die SDHB ein Tumorsuppressor?

Besonders auffällig in dieser Studie war die negative Korrelation zwischen der Expression der SDHB und Nanog in den Panc1-Zellen unabhängig von den stromalen Umgebungsbedingungen. So exprimierten Panc1-Zellen in einer physiologischen Lebermikroumgebung beim KD der SDHB vermehrt Nanog (s. Abschnitt 3.2). Beim KD der G6PD in einer entzündlichen Lebermikroumgebung, welche mit einer Erhöhung der SDHB-Expression einherging, exprimierten die Panc1-Zellen entsprechend weniger Nanog (s. Abschnitt 3.3). Beim KD von Nanog exprimierten die Panc1-Zellen wiederum unabhängig von den stromalen Bedingungen vermehrt SDHB (s. Abschnitt 3.4). Ergänzt um die Beobachtungen, dass eine verminderte SDHB-Expression mit einer deutlich höheren Zellzahl und eine verminderte Nanog-Expression mit einer signifikant niedrigeren Zellzahl sowie geringeren Anzahl an Mero- und Holoklonen im CFA assoziiert war, lässt sich hieraus eine Wechselwirkung von Krebsstammzeleigenschaften und Metabolismus in den Panc1-Zellen postulieren. Einerseits führen induzierte Veränderungen im Metabolismus der Panc1-Zellen durch transiente Inhibition der SDHB und damit der oxidativen Phosphorylierung zu einer konsekutiven Förderung der anaeroben Glykolyse und zum Erwerb von Krebsstammzeleigenschaften mit vermehrter Expression von Nanog und einem verstärkten Tumorzellwachstum. Andererseits determiniert der Krebsstammzellmarker Nanog den Metabolismus und das Wachstum der Panc1-Zellen, da bei verminderter Nanog-Expression Panc1-Zellen einen vermehrt durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus aufweisen und weniger proliferieren.

Inwieweit metabolische Alterationen die Expression von Nanog beeinflussen können, lässt sich u.a. an der Studie von Zhang et al. ableiten. Zhang et al. wiesen an Brustkrebszellen eine über HIF1- α vermittelte, hypoxisch-induzierte Mehrexpression von Nanog nach. Sie zeigten auf, dass eine über HIF1- α regulierte, vermehrte Expression der α -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylase AlkB homolog 5 (ALKBH5) eine Demethylierung der Nanog-mRNA zur Folge hatte. Durch den Wegfall dieses epigenetischen Regulationsmechanismus wiesen die Brustkrebszellen eine gesteigerte Nanog-Expression auf und bildeten einen höheren Anteil an CSC aus (Zhang et al. 2016). Übertragen auf die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.3 könnte dies

ein potenzieller Erklärungsansatz für die vermehrte Nanog-Expression der Panc1-Zellen beim KD der SDHB sein. Durch die dadurch vermittelte Akkumulation von Succinat kommt es zu einem verminderten Abbau von HIF1- α und folglich zu einer ALKBH5-vermittelten Mehrexpression von Nanog (s. Abschnitt 4.1.1). Diese (pseudo)hypoxisch-induzierte Mehrexpression des Krebsstammzellmarkers Nanog könnte ein Beispiel dafür sein, wie das PDAC mit seiner nährstoffarmen, hypoxischen Mikroumgebung den Krebsstammzellphänotyp aktiv fördern kann (Valle et al. 2018). Ein ähnlicher Mechanismus wie der zuvor beschriebene von Zhang et al. konnte vice versa für den Einfluss von Nanog auf den Metabolismus der Tumorzellen bislang noch nicht identifiziert werden. Wie jedoch bereits erwähnt, bildet Nanog zusammen mit Oct4 und SOX-2 ein Transkriptionsnetzwerk zum Erhalt von Pluripotenz und Selbsterneuerungspotenzial von Stammzellen (s. Abschnitt 1.4.2). Über die expressionsinduktive Bindung diverser Zielgene partizipiert Nanog damit an der Generierung eines pluripotenten, dedifferenzierten Zellphänotyps, der zur asymmetrischen oder symmetrischen Zellteilung befähigt ist. Das Transkriptionsnetzwerk aus Oct4, SOX-2 und Nanog weist dabei eine hohe Konvergenz seiner Zielgene mit denen von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) auf (Chen et al. 2008). STAT3 seinerseits gilt als „Masterregulator“ der Umstellung des Zellmetabolismus weg von der oxidativen Phosphorylierung hin zur Glykolyse u.a. durch Förderung der Expression von HIF1- α , c-Myc und Enzymen der Glykolyse wie Hexokinase-2 (Chun et al. 2020). Eine Modulation des Tumorzellmetabolismus im PDAC durch Nanog im Kontext dessen erscheint dahingehend wahrscheinlich. Wie bereits in Abschnitt 4.1.2 erwähnt, dient die Glykolyse den anabolen Bedürfnissen sich teilender Zellen mit hohem Selbsterneuerungspotenzial. Ausdifferenzierte Zellen haben nur geringe anabole Bedürfnisse aufgrund einer niedrigeren Zellteilungsrate und nehmen daher zur effizienten Energiegenerierung im katabolen Sinne einen durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus auf (Folmes et al. 2012).

Wie bereits mehrfach erläutert, konnte die tumorfördernde Wirkung einer SDHB-Defizienz mit nachfolgender Succinatakkumulation bereits an verschiedenen Tumorzelllinien, z.B. beim HCC, CCRCC, Magen-, Brust-, Schilddrüsen- und Speiseröhrenkrebs nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.1.1) (Cervera et al. 2008, Zhao et al. 2017b, Zhang et al. 2013).

Mutationen im SDHB-Gen prädisponieren für die Entwicklung von neuroendokrinen Tumoren, den Paragangliomen (Bardella et al. 2011, King et al. 2006). Im Kontext dessen sowie auf Basis anderer Studien zur funktionellen Rolle von SDHB wird die SDHB als Tumorsuppressor diskutiert. Zusammen mit der Arbeit von Fabian et al. untermauern die Daten dieser Arbeit ebenfalls die Rolle der SDHB als Tumorsuppressor in der Entwicklung des PDAC. Im Gegensatz zu dieser Sichtweise wiesen Viale et al. eine dormante, und im hohen Maße Krebsstammzellmarker exprimierende Tumorzellsubpopulation nach, die einen durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus aufwies. Sie zeigte ein hohes Tumorigenitätspotenzial, welches durch die Inhibition der oxidativen Phosphorylierung nahezu aufgehoben wurde (Viale et al. 2014). Diese Abhängigkeit der PDAC-CSC von der oxidativen Phosphorylierung konnte von Sancho et al. ebenfalls beobachtet werden. Sie wiesen ebenso CSC mit einem durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus nach. Aufgrund ihrer geringen metabolischen Anpassungsfähigkeit durchliefen diese CSC einen apoptotischen Zelltod bei Inhibition der oxidativen Phosphorylierung via Metformin. Weiterhin konnten Sancho et al. jedoch auch Krebsstammzellklone mit einer erhöhten metabolischen Plastizität nachweisen, die unter Annahme eines glykolytisch geprägten Phänotyps die Inhibition der oxidativen Phosphorylierung überlebten (Sancho et al. 2015). Da zusammenfassend einerseits fördernde als auch hemmende Einflüsse der oxidativen Phosphorylierung auf die Genese, den Erhalt und die Progression des PDAC nachgewiesen werden konnten, muss die Rolle der SDHB und der oxidativen Phosphorylierung als kontextabhängig und heterogen interpretiert werden. Auch diese Arbeit kann letztlich nicht beweisen, ob der Tumorzellmetabolismus, sei er nun durch die Glykolyse oder die oxidative Phosphorylierung geprägt, die Kausalität oder die Konsequenz des dazugehörigen Tumorzellphänotyps darstellt. Den Einschätzungen von Folmes et al. folgend, wird der Metabolismus der CSC sowohl durch zellphänotypische Eigenschaften wie Proliferationsgeschwindigkeit und Differenzierung als auch durch die Umgebungsbedingungen der Krebsstammzellnische determiniert (Folmes et al. 2012). Diese Aussage wird durch den Nachweis der Koexistenz von Stammzellen mit einerseits schneller als auch langsamer Teilungsraten in nahezu allen Organsystemen untermauert (Rezza et al. 2014). Somit bedarf die Rolle der oxidativen Phosphorylierung und der SDHB in der

Tumorbiologie des PDAC sowie im gesamt-onkologischen Kontext weiterer Forschungsaktivität.

Unter Einbeziehung der Ergebnisse über die Wechselwirkungen zwischen Tumorzellmetabolismus und Tumorstammzeleigenschaften aus dieser Doktorarbeit und aufbauend auf den Ergebnissen der Vorarbeiten wird folgendes Modell für die Metastasierung des PDAC in die Leber aufgestellt: Die prämaligen kRas-Zellen weisen grundsätzlich einen überwiegend von der oxidativen Phosphorylierung geprägten Metabolismus, gekennzeichnet durch eine deutliche SDHB-Expression, auf. Die Panc1-Zellen hingegen weisen einen dominierend glykolytischen Metabolismus mit vermehrter Expression der G6PD auf. Ob die genannten Metabotypen Kausalität oder Konsequenz des jeweils dazugehörigen Zellphänotyps sind, kann nicht mit letztllicher Sicherheit beantwortet werden. In einer physiologischen Lebermikroumgebung, geprägt durch eine vornehmliche Präsenz von HSC, weisen die disseminierten PDEZ einen vermehrt dormanten und weniger proliferierenden Zellphänotyp auf (Lenk et al. 2017). Die PDEZ betreiben unter diesen Bedingungen vermehrt oxidative Phosphorylierung zur effizienten Energiegewinnung angepasst an die niedrigen anabolen Bedürfnisse (Fabian 2019). Die mit der Suppression der SDHB-Expression einhergehende Succinatakkumulation induziert in den PDEZ einen (pseudo)hypoxischen Reiz und fördert die Glykolyse. Hierüber erwerben die PDEZ vermehrt Krebsstammzeleigenschaften, proliferieren unter der zunehmenden Bereitstellung von Makromolekülen schneller und werden dadurch robuster gegenüber nährstoffarmen Umgebungsbedingungen. Die PDEZ scheinen dabei von einer besonders effizient ablaufenden Glykolyse zu profitieren, in welcher der oxidative Anteil des PPW nur eine nachrangige Rolle einnimmt. Da die PDEZ ebenfalls ein gesteigertes Zellwachstum und eine verstärkte Glykolyse im Kontext einer entzündlichen Lebermikroumgebung, geprägt von der Präsenz von HMF, aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass sich die genannten (pseudo)hypoxischen Einflüsse den inflammatorischen Einflüssen auf den Stoffwechsel der Tumorzellen zumindest ähneln. Die Krebsstammzellmarker Nanog und Nestin sind dabei offenbar wichtig in der Regulation des Metabolismus der PDEZ. PDEZ, die vermehrt Nanog exprimieren, zeigen ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial und teilen sich schnell. Sie sind das Abbild der sich schnell-teilenden, „fast-cycling“ CSC im PDAC (Rezza et al. 2014). Zur

Sicherstellung der für die Zellteilung notwendigen Biomasse induziert Nanog einen stark glykolytisch geprägten Metabolismus. Nestin ist ein wichtiger Faktor für die Redoxhomöostase der PDEZ und besonders die prämaligen kRas-Zellen mit ihrem durch die oxidative Phosphoylierung geprägten Metabolismus hängen von Nestin ab. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass Tumorzellmetabolismus und Tumorstammzelleigenschaften einen wechselseitigen Einfluss aufeinander haben und darüber auch das Wachstumsverhalten von PDEZ in der Lebermikroumgebung beeinflussen.

4.4 Limitationen

Dies ist die erste Studie, die in einem komplexen *in vitro* Kokultursystem die Wechselwirkungen zwischen Schlüsselenzymen des Glukosestoffwechsels und Krebsstammzellmarkern in prämaligen und malignen PDEZ im Kontext der Lebermikroumgebung untersucht. Dieses Kokultursystem offenbart jedoch auch verschiedene Limitationen, die im Folgenden genannt werden: Da es sich hierbei um ein indirektes Kokultursystem handelt, nehmen die hepatischen Stromazellen und die PDEZ nur über parakrine Wechselwirkungen Einfluss aufeinander. Ein direkter Zellkontakt kommt dabei nicht zustande. Obgleich dies die getrennte Aufarbeitung von Tumor- und Stromazellen vereinfacht, gibt das Kokultursystem damit die *in vivo* Prozesse der Metastasierung des PDAC in die Leber nur eingeschränkt wieder. Des Weiteren sind die ausgewählten Zelllinien nur eingeschränkt repräsentativ für die heterogenen Zellpopulationen sowohl innerhalb des Leberstromas als auch innerhalb des PDAC-Tumorgewebes. In einer physiologischen oder auch entzündlichen Lebermikroumgebung interagieren nicht nur HSC bzw. HMF, sondern auch Hepatozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Lymphozyten in einem komplexen System mit der EZM (s. Abschnitt 1.2.3). Das PDAC wie auch andere Tumoren weisen eine hohe zelluläre Heterogenität auf und folgen keiner histologischen Ordnung. Durch die hohe Mutationsrate und durch asymmetrische oder symmetrische Zeillteilungsprozesse ergeben sich diverse Tumorzellphänotypen und -subpopulationen innerhalb des Tumorgewebes (s. Abschnitt 1.4). Unter Beachtung dessen erscheint die Einschätzung genereller Verhaltensweisen prämaliger und maligner PDEZ bei der Metastasierung in die Leber anhand der gewonnenen Daten von jeweils zwei Tumorzell- und Leberstromazelllinien nur eingeschränkt aussagekräftig.

Auch das verwendete KD-Verfahren weist Limitationen auf, die im Folgenden genannt werden: Die siRNA-basierte Transfektion stellt ein Verfahren dar, mit der nur eine transiente Suppression der Proteinbiosynthese des entsprechenden Zielgens erwirkt werden kann. Vom KD sind dabei nicht alle Zellen betroffen. Eine Möglichkeit, einen effizienten und vor allem stabilen Knockout in allen untersuchten Zellen zu erwirken, eröffnet das Verfahren der *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins* (CRISPR/Cas), welches seit 2012 zunehmend an Bedeutung bei der gezielten Ausschaltung von Genen gewinnt. So hat der CRISPR/Cas9-vermittelte Knockout des ALDH2-Gens in humanen Zelllinien eine signifikant stärkere Wirkung als der siRNA-basierte KD desselben Genes und stellt damit ein genaueres Verfahren zur Charakterisierung der Funktion eines entsprechenden Genes dar (Wang et al. 2018). Unter Verwendung eines CRISPR/Cas-vermittelten Knockout-Verfahrens von metabolischen Schlüssenzymen oder von Krebsstammzellmarkern in den PDEZ könnte die wechselseitige Beziehung von Krebsstammzeleigenschaften und Metabolismus im PDAC damit noch gezielter untersucht werden.

Das humane Metabolom ist sehr komplex und nur unzureichend verstanden. Gemäß der Recon-2 Studie besteht es aus fast 2000 Genen, die über 2500 metabolische Enzyme kodieren, welche über 7000 Reaktionen von knapp 2700 Metaboliten katalysieren (Thiele et al. 2013). Beeinflusst von den heterogenen Umgebungsbedingungen weisen die Zellen kontextabhängig erhebliche Unterschiede in ihrem Metabolismus auf (Vlassis et al. 2014). Unter Beachtung dessen ergibt sich die Frage, ob der metabolische Phänotyp der PDEZ über eine verminderte oder vermehrte Expression vereinzelter metabolischer Enzyme überhaupt definiert werden kann. Ob die Expressionsanalyse der metabolischen Enzyme SDHB, G6PD, TALDO und TKT dem Anspruch, den Gesamtmetabolismus der PDEZ zu definieren, gerecht wird, lässt sich innerhalb dieser Arbeit nicht abschließend beantworten. Sie bietet jedoch einen ersten, vielversprechenden Ansatz für nachfolgende Studien zur gezielten Expressionsuntersuchung weiterer, in die Glykolyse oder in die oxidative Phosphorylierung involvierter Enzyme oder zur funktionellen Untersuchung des Zellmetabotypen beispielweise via *Seahorse XFp Analyzer* (Fabian 2019).

4.5 Ausblick

Die Diagnose eines PDAC geht mit einer sehr schlechten, in der überwiegenden Mehrheit der Fälle infausten Prognose einher. Über 80% der PDAC-Patienten weisen bei Erstdiagnose bereits einen Tumor in einem lokal weit fortgeschrittenen, irresektablen oder metastasierten Zustand auf (Pelosi et al. 2017, Rahib et al. 2014). Hämatogene Fernmetastasen des PDAC finden sich dabei primär nahezu immer in der Leber (>70%) (Hiddemann et al. 2004). Solche Patienten weisen eine 1-JÜR von 24% auf. Ihnen bleibt die Möglichkeit einer palliativen Chemotherapie, welche selbst in ihrem aggressivsten Regime FOLFIRINOX die mediane Überlebenszeit auf 11,1 Monate verlängert (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 2013). Aber auch die 20% der PDAC-Patienten, die keine Metastasierung aufweisen und denen die Möglichkeit einer potenziell kurativen chirurgischen Behandlung bleibt, haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 20% und eine mediane Überlebenszeit von 20 bis 28 Monaten (Grant et al. 2016). Zusammenfassend wird hieraus ersichtlich, dass ein dringender Bedarf an der Entwicklung neuer präventiver, diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen beim PDAC besteht. Basierend auf den Erkenntnissen der Tumorgrundlagenforschung in den Bereichen Tumorzellmetabolismus und mit der Entwicklung des Konzeptes der CSC eröffnen sich weitere potenzielle Möglichkeiten in der Therapie des PDAC. Wie bereits erwähnt, zeigt ein Großteil der PDAC-Tumorzellen eine Umregulierung ihres Energiehaushaltes hin zur Glykolyse (Guillaumond et al. 2014). Dies befähigt die Tumorzellen zu einer verstärkten Proliferation und fördert ihre Resistenz gegenüber hypoxischen oder nährstoffarmen Umgebungsbedingungen. Auch diese Arbeit gibt Hinweise darauf, dass eine effizient ablaufende Glykolyse das Tumorzellwachstum des PDAC erheblich fördern kann. Sie steht ebenfalls in Kohärenz mit Vorarbeiten zu dieser Arbeit, dass ein entzündliches Leberstroma einen durch die Glykolyse geprägten Metabotypen der PDEZ induziert und somit das Tumorzellwachstum fördert (Fabian 2019). In einem physiologischen Lebermikromilieu hingegen zeigen die PDEZ einen vermehrt durch die oxidative Phosphorylierung geprägten Metabolismus mit vermehrter Expression der SDHB und einem verminderten Zellwachstum. Therapeutische Maßnahmen, die eine entzündliche Transformation der Leber durch schädigende Noxen verhindern, könnten somit

protektiv gegen die Ausbildung von Metastasen des PDAC in der Leber wirken und damit supportiv im Rahmen einer adjuvanten Therapie des PDAC nach Primariusresektion zum Tragen kommen. Zudem unterstützt diese Arbeit die Perspektive, eine antitumorale Therapie mit dem Ziel der Metabolismusmodulation in den Tumorzellen zu entwickeln. Dies ist bereits am Beispiel von Metformin und dessen Wirkung auf den Metabolismus von CSC Gegenstand der aktuellen Forschung. Sancho et al. schlagen hierbei eine Inhibition der mitochondrialen Aktivität in seneszenten CSC via Metformin als potenzielle Tumorthherapie vor (Sancho et al. 2015). Die Ergebnisse sowohl aus dieser Arbeit als auch aus der von Fabian et al. sprechen jedoch eher für die Förderung der mitochondrialen Aktivität mit vermehrter Expression der SDHB in stark proliferierenden und glykolytischen Tumorzellen des PDAC als potenzielle Tumorthherapie (Fabian 2019). Die Diskrepanz der unterschiedlichen Interpretationen macht deutlich, dass es weiterer Studien bedarf, die die komplexe und durchaus heterogene Beziehung zwischen Krebsstammzeleigenschaften und dem Krebsstammzellmetabolismus aufklären.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Das duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC) geht aus den pankreatischen, duktales Epithelzellen (PDEZ) der Ausführungsgänge des Pankreas hervor. Ein Großteil der PDAC-Tumorzellen zeigt eine als „Warburg-Effekt“ bezeichnete Umregulierung des Glukosestoffwechsels hin zur Glykolyse unabhängig vom lokalen Angebot an Sauerstoff. Innerhalb der heterogenen Zellpopulation sind Krebsstammzellen (CSC) eine exklusive Subpopulation, die sich durch asymmetrische Zellteilung und hohes Selbsterneuerungspotenzial auszeichnet. Sie gelten als äußerst chemoresistent und werden mit dem Wiederauftreten von Tumoren assoziiert. Das PDAC beginnt früh infiltrativ zu wachsen und bildet Metastasen vornehmlich in der Leber (>70%). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Leber einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und den Metabolismus der PDEZ hat.

Zielsetzung: Basierend auf den Vorerkenntnissen der Arbeitsgruppe sollte der wechselseitige Einfluss von Metabolismus-assoziierten Schlüsselenzymen und Krebsstammzeleigenschaften in prämaligen und malignen PDEZ im Kontext einer physiologischen und entzündlichen Lebermikroumgebung untersucht werden.

Methodik: In dieser Arbeit erfolgte die indirekte Kokultivierung prämaliger H6c7eR-Kr (kRas)- und maligner PANC1 (Panc1)-PDEZ mit hepatischen Sternzellen (HSC) als Modell für eine physiologische, und mit hepatischen Myofibroblasten (HMF) als Modell für eine entzündliche Lebermikroumgebung. Mittels siRNA-Transfektion wurden in den PDEZ Schlüsselenzyme des Glukosestoffwechsels, die Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB) oder die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) sowie die Krebsstammzellmarker Nanog oder Nestin separat supprimiert. Mittels Zellzahlbestimmungen, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Westernblot-Verfahren, Immunfluoreszenzfärbungen und *colony formation assay* (CFA) wurden Wachstumsverhalten, CSC-Eigenschaften und die Expression von metabolischen Enzymen sowie CSC-Markern der PDEZ untersucht.

Ergebnisse: Beim Knockdown (KD) der SDHB-Expression in Kokultur mit HSC zeigten beide PDEZ-Zelllinien ein deutlich gesteigertes Zellwachstum. Die kRas-Zellen wiesen dabei

zusätzlich ein erhöhtes Selbsterneuerungspotenzial auf und exprimierten vermehrt Nestin. Panc1-Zellen exprimierten hingegen vermehrt das Schlüsselenzym des oxidativen Anteils des Pentose-Phosphat-Weges (PPW), die G6PD, und Nanog. Beim KD der G6PD-Expression in Kokultur mit HMF wiesen die PDEZ ein gesteigertes Zellwachstum und Selbsterneuerungspotenzial auf. Die Panc1-Zellen exprimierten dabei vermehrt ein Schlüsselenzym der oxidativen Phosphorylierung, die SDHB, und etwas vermindert Nanog. Die kRas-Zellen zeigten hingegen eine signifikant erniedrigte Expression des CSC-Markers SOX-2 bei tendenziell vermehrter Expression der CSC-Marker Nanog und ABCG2. Der KD der Nanog-Expression führte zu einem signifikant erniedrigten Zellwachstum der PDEZ unabhängig von den Stromabedingungen. Während dies bei kRas-Zellen keinen Effekt auf die Expression metabolischer Enzyme hatte, exprimierten Panc1-Zellen vermehrt SDHB und vermindert G6PD. Dies fügt sich in das Bild einer diametralen Beziehung der Expression von Nanog und SDHB bei Panc1-Zellen. Im CFA bildeten die PDEZ entweder weniger Kolonien, oder vermehrt solche mit geringeren CSC-Eigenschaften aus. Auch der KD von Nestin führte zu einem signifikant erniedrigten Zellwachstum, hatte jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Expression metabolischer Enzyme und auf das Selbsterneuerungspotenzial der PDEZ.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass (pseudo)hypoxische oder inflammatorische Reize einen glykolytischen Metabolismus in den PDEZ induzieren können. Die PDEZ erwerben hierdurch vermehrt CSC-Eigenschaften, proliferieren unter der zunehmenden Bereitstellung von Makromolekülen schneller und sind robuster gegenüber nährstoffarmen Umgebungsbedingungen. Die PDEZ profitieren dabei von einer effizient ablaufenden Glykolyse, in der der oxidative Anteil des PPW eine nachrangige Rolle einnimmt. Die CSC-Marker Nanog und Nestin können ebenfalls den Metabolismus der PDEZ beeinflussen. Nanog induziert einen glykolytischen Metabolismus und Nestin fördert u.a. über metabolische Alterationen die Resistenz der PDEZ gegenüber reaktiver oxidativer Spezies (ROS). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit und der Vorarbeiten untermauern die Rolle der SDHB als Tumorsuppressor in der Entwicklung des PDAC und weisen auf einen therapeutischen Nutzen durch Induktion der oxidativen Phosphorylierung mit vermehrter Expression der SDHB in den vornehmlich glykolytischen Tumorzellen des PDAC hin.

6 Literatur

- Adan A, Kiraz Y und Baran Y (2016). Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. CPB 17: 1213–1221
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ und Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 3983–3988
- Andersen DK, Korc M, Petersen GM, Eibl G, Li D, Rickels MR, Chari ST und Abbruzzese JL (2017). Diabetes, Pancreatogenic Diabetes, and Pancreatic Cancer. Diabetes 66: 1103–1110
- Andriani F, Bertolini G, Facchinetti F, Baldoli E, Moro M, Casalini P, Caserini R, Milione M, Leone G, Pelosi G, Pastorino U, Sozzi G und Roz L (2016). Conversion to stem-cell state in response to microenvironmental cues is regulated by balance between epithelial and mesenchymal features in lung cancer cells. Mol Oncol 10: 253–271
- Aponte PM und Caicedo A (2017). Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. Stem Cells Int 2017: 5619472
- Arastéh K, Zeuzem S und Rösch W (2013). Innere Medizin. Stuttgart: Thieme
- Aspuria P-JP, Lunt SY, Våremo L, Vergnes L, Gozo M, Beach JA, Salumbides B, Reue K, Wiedemeyer WR, Nielsen J, Karlan BY und Orsulic S (2014). Succinate dehydrogenase inhibition leads to epithelial-mesenchymal transition and reprogrammed carbon metabolism. Cancer Metab 2: 21
- Bainbridge DR und Macey MM (1983). Hoechst 33258: A fluorescent nuclear counterstain suitable for double-labelling immunofluorescence. Journal of Immunological Methods 62: 193–195
- Bardella C, Pollard PJ und Tomlinson I (2011). SDH mutations in cancer. Biochim Biophys Acta 1807: 1432–1443
- Batlle E und Clevers H (2017). Cancer stem cells revisited. Nat Med 23: 1124–1134
- Beaver CM (2012). The effect of culture conditions on colony morphology and proliferative capacity in human prostate cancer cell lines. Cell Biol Toxicol 28: 291–301
- Beaver CM, Ahmed A und Masters JR (2014). Clonogenicity: Holoclones and meroclones contain stem cells
- Becker AE, Hernandez YG, Frucht H und Lucas AL (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Risk factors, screening, and early detection. World J Gastroenterol 20: 11182–11198
- Bonnet D und Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3: 730–737
- Borkhardt A (2003). Biochemie und Molekularbiologie 2002: RNA-Interferenz. Nachrichten aus der Chemie: 316–319
- Brayton CF (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): A review. Cornell Vet 76: 61–90

- Brodt P (2016). Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: From Pre- to Prometastatic Niches. *Clin Cancer Res* 22: 5971–5982
- Cannon A, Thompson C, Hall BR, Jain M, Kumar S und Batra SK (2018). Desmoplasia in pancreatic ductal adenocarcinoma: Insight into pathological function and therapeutic potential. *Genes Cancer* 9: 78–86
- Cervera AM, Apostolova N, Crespo FL, Mata M und McCreath KJ (2008). Cells silenced for SDHB expression display characteristic features of the tumor phenotype. *Cancer Res* 68: 4058–4067
- Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, D'Alessio AC, Young RA und Weinberg RA (2013). Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* 154: 61–74
- Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh Y-H, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung W-K, Clarke ND, Wei C-L und Ng H-H (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133: 1106–1117
- Chen Z, Wang J, Cai L, Zhong B, Luo H, Hao Y, Yu W, Wang B, Su C, Lei Y, Bella AE, Xiang AP und Wang T (2014). Role of the stem cell-associated intermediate filament nestin in malignant proliferation of non-small cell lung cancer. *PLoS One* 9: e85584
- Chun K-S, Jang J-H und Kim D-H (2020). Perspectives Regarding the Intersections between STAT3 and Oxidative Metabolism in Cancer. *Cells* 9
- Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK, Becker A, Hoshino A, Mark MT, Molina H, Xiang J, Zhang T, Theilen T-M, García-Santos G, Williams C, Ararso Y, Huang Y, Rodrigues G, Shen T-L, Labori KJ, Lothe IMB, Kure EH, Hernandez J, Doussot A, Ebbesen SH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Schwartz RE, Matei I, Peinado H, Stanger BZ, Bromberg J und Lyden D (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol* 17: 816–826
- Cubilla AL und Fitzgerald PJ (1985). Cancer of the exocrine pancreas: The pathologic aspects. *CA Cancer J Clin* 35: 2–18
- Dalerba P und Clarke MF (2007). Cancer stem cells and tumor metastasis: First steps into uncharted territory. *Cell Stem Cell* 1: 241–242
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G und Thompson CB (2008). The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7: 11–20
- Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA und Mulvihill SJ (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39: 425–435
- Deng L, Zhang X, Xiang X, Xiong R, Xiao D, Chen Z, Liu K und Feng G (2021). NANOG Promotes Cell Proliferation, Invasion, and Stemness via IL-6/STAT3 Signaling in Esophageal Squamous Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 20: 15330338211038492

- Fabian A (2019). Metastasierung des duktaalen Pankreasadenokarzinoms – Der Entzündungszustand der Lebermikroumgebung determiniert den Metabolismus und dadurch das Wachstumsverhalten von Pankreasduktusepithelzellen. Dissertation: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3: 453–458
- Folmes CDL, Dzeja PP, Nelson TJ und Terzic A (2012). Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell* 11: 596–606
- Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J und van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1: 2315–2319
- Fulawka L, Donizy P und Halon A (2014). Cancer stem cells--the current status of an old concept: Literature review and clinical approaches. *Biol Res* 47: 66
- Gawlik-Rzemieniewska N und Bednarek I (2016). The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther* 17: 1–10
- Ghergurovich JM, Esposito M, Chen Z, Wang JZ, Bhatt V, Lan T, White E, Kang Y, Guo JY und Rabinowitz JD (2020). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Is Not Essential for K-Ras-Driven Tumor Growth or Metastasis. *Cancer Res* 80: 3820–3829
- Gong S, Li Q, Jeter CR, Fan Q, Tang DG und Liu B (2015). Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog* 54: 679–687
- Gonzalez CD, Alvarez S, Ropolo A, Rosenzvit C, Bagnes MFG und Vaccaro MI (2014). Autophagy, Warburg, and Warburg reverse effects in human cancer. *Biomed Res Int* 2014: 926729
- Grant TJ, Hua K und Singh A (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 144: 1-29 (241–275)
- Grünwald B, Harant V, Schaten S, Frühschütz M, Spallek R, Höchst B, Stutzer K, Berchtold S, Erkan M, Prokopchuk O, Martignoni M, Esposito I, Heikenwalder M, Gupta A, Siveke J, Saftig P, Knolle P, Wohlleber D und Krüger A (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.e7
- Guillaumond F, Iovanna JL und Vasseur S (2014). Pancreatic tumor cell metabolism: Focus on glycolysis and its connected metabolic pathways. *Arch Biochem Biophys* 545: 69–73
- Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z und Sun X (2013). Cancer stem cells: Therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 3: 65–75
- Hanahan D und Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674
- Hauk A (2013). Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biol. Unserer Zeit*: 278
- Heinrich P, Müller M und Graeve L (Hg.) 2014. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ und 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 DD und Zhang J-S (2014). Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20: 2247–2254
- Hiddemann W, Huber H und Bartram CR (2004). *Die Onkologie*. Berlin: Springer
- Higashi T, Friedman SL und Hoshida Y (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 121: 27–42
- Hnasko TS und Hnasko RM (2015). The Western Blot. *Methods Mol Biol* 1318: 87–96
- Holzapfel B und Wickert L (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete*. *Biol. Unserer Zeit* 37: 120–126
- Hruban RH, Maitra A, Kern SE und Goggins M (2007). Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 36: 831-49, vi
- Ilic M und Ilic I (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 22: 9694–9705
- Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi S-Y, Kang T-W, Kim S-Y, Kwon Y-W, Cho E-J und Youn H-D (2012). O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 11: 62–74
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold, Katrin, Penzkofer, Andrea, Tremel K, Weg-Remers S, Wittenberg K, Barnes B, Bertz J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A und Wolf U (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014*
- Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K, Uchida E, Korc M, Naito Z und Tajiri T (2009). Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Hum Pathol* 40: 189–198
- King A, Selak MA und Gottlieb E (2006). Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: Linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25: 4675–4682
- Klein CA (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* 9: 302–312
- Knaack H, Lenk L, Philipp L-M, Miarka L, Rahn S, Viol F, Hauser C, Egberts J-H, Gundlach J-P, Will O, Tiwari S, Mikulits W, Schumacher U, Hengstler JG und Sebens S (2018). Liver metastasis of pancreatic cancer: The hepatic microenvironment impacts differentiation and self-renewal capacity of pancreatic ductal epithelial cells. *Oncotarget* 9: 31771–31786
- Kowalik MA, Guzzo G, Morandi A, Perra A, Menegon S, Masgras I, Trevisan E, Angioni MM, Fornari F, Quagliata L, Ledda-Columbano GM, Gramantieri L, Terracciano L, Giordano S, Chiarugi P, Rasola A und Columbano A (2016). Metabolic reprogramming identifies the most aggressive lesions at early phases of hepatic carcinogenesis. *Oncotarget* 7: 32375–32393

- Krams M, Frahm SO, Kellner U und Mawrin C (2013). *Kurzlehrbuch Pathologie: ... 126 Tab.* Stuttgart: Thieme
- Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, Boettcher M, Mougiakakos D, Reichardt W, Bronsert P, Brunton VG, Pilarsky C, Winkler TH, Brabletz S, Stemmler MP und Brabletz T (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol* 19: 518–529
- Krupkova O, Loja T, Zambo I und Veselska R (2010). Nestin expression in human tumors and tumor cell lines. *Neoplasma* 57: 291–298
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (Hg.) 2013. S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom
- Lenk L, Pein M, Will O, Gomez B, Viol F, Hauser C, Egberts J-H, Gundlach J-P, Helm O, Tiwari S, Weiskirchen R, Rose-John S, Röcken C, Mikulits W, Wenzel P, Schneider G, Saur D, Schäfer H und Sebens S (2017). The hepatic microenvironment essentially determines tumor cell dormancy and metastatic outgrowth of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 7: e1368603
- Lenz J, Karasek P, Jarkovsky J, Muckova K, Dite P, Kala Z, Veselska R und Hermanova M (2011). Clinicopathological correlations of nestin expression in surgically resectable pancreatic cancer including an analysis of perineural invasion. *J Gastrointest Liver Dis* 20: 389–396
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF und Simeone DM (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67: 1030–1037
- Li J, Wang R, Yang L, Wu Q, Wang Q, Nie Z, Yu Y, Ma J und Pan Q (2015). Knockdown of Nestin inhibits proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 6377–6386
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M und Todaro G (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer*: 741–747
- Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM und Pienta KJ (2007). The lethal phenotype of cancer: The molecular basis of death due to malignancy. *CA Cancer J Clin* 57: 225–241
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*: 265–275
- Lucarelli G, Galleggiante V, Rutigliano M, Sanguedolce F, Cagiano S, Bufo P, Lastilla G, Maiorano E, Ribatti D, Giglio A, Serino G, Vavallo A, Bettocchi C, Selvaggi FP, Battaglia M und Ditunno P (2015). Metabolomic profile of glycolysis and the pentose phosphate pathway identifies the central role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in clear cell-renal cell carcinoma. *Oncotarget* 6: 13371–13386
- Lüllmann-Rauch R (2012). *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen.* Stuttgart: Thieme
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF und Groom AC (1998). Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *The American Journal of Pathology* 153: 865–873

- Mahmood T und Yang P-C (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4: 429–434
- Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T und Arai T (2016). Systemic Administration of Small Interfering RNA Targeting Human Nestin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Pancreas* 45: 93–100
- Menendez JA, Joven J, Cufí S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferraros C, Cuyàs E, Martin-Castillo B, López-Bonet E, Alarcón T und Vazquez-Martin A (2013). The Warburg effect version 2.0: Metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle* 12: 1166–1179
- Müller-Esterl W (2018). *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Najafi M, Mortezaee K und Ahadi R (2019). Cancer stem cell (a)symmetry & plasticity: Tumorigenesis and therapy relevance. *Life Sci* 231: 116520
- Neesse A, Algül H, Tuveson DA und Gress TM (2015). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: A changing paradigm. *Gut* 64: 1476–1484
- Neradil J und Veselska R (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* 106: 803–811
- Nielsen SR, Quaranta V, Linford A, Emeagi P, Rainer C, Santos A, Ireland L, Sakai T, Sakai K, Kim Y-S, Engle D, Campbell F, Palmer D, Ko JH, Tuveson DA, Hirsch E, Mielgo A und Schmid MC (2016). Macrophage-secreted granulins support pancreatic cancer metastasis by inducing liver fibrosis. *Nat Cell Biol* 18: 549–560
- Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, Reilly JG, Chandra D, Zhou J, Claypool K, Coghlan L und Tang DG (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25: 1696–1708
- Pavlidis S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F und Lisanti MP (2009). The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8: 3984–4001
- Pelosi E, Castelli G und Testa U (2017). Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicine* 5
- Peterson GL (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*: 201–220
- Pitrone M, Pizzolanti G, Coppola A, Tomasello L, Martorana S, Pantuso G und Giordano C (2019). Knockdown of NANOG Reduces Cell Proliferation and Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest in Human Adipose Stem Cells. *Int J Mol Sci* 20

- Portugal J und Waring MJ (1988). Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 949: 158–168
- Proell V, Mikula M, Fuchs E und Mikulits W (2005). The plasticity of p19 ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim Biophys Acta* 1744: 76–87
- Pu H, Zhang Q, Zhao C, Shi L, Wang Y, Wang J und Zhang M (2015). Overexpression of G6PD is associated with high risks of recurrent metastasis and poor progression-free survival in primary breast carcinoma. *World J Surg Oncol* 13: 323
- Qian J, Niu J, Li M, Chiao PJ und 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 Res* 65: 5045–5053
- Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM und Matrisian LM (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74: 2913–2921
- Rassow J, Hauser K, Netzker R und Deutzmann R (2016). *Biochemie: 855 Abbildungen*. Stuttgart: Thieme
- Rezza A, Sennett R und Rendl M (2014). Adult stem cell niches: Cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol* 107: 333–372
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD und Stanger BZ (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 148: 349–361
- Robertson-Tessi M, Gillies RJ, Gatenby RA und Anderson ARA (2015). Impact of metabolic heterogeneity on tumor growth, invasion, and treatment outcomes. *Cancer Res* 75: 1567–1579
- Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, Barneda D, Sellers K, Campos-Olivas R, Graña O, Viera CR, Yuneva M, Sainz B und Heeschen C (2015). MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab* 22: 590–605
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M und Wesker K (2009). *Innere Organe: 118 Tabellen*. Stuttgart: Thieme
- Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, Canli O, Heijmans J, Huels DJ, Moreaux G, Rupec RA, Gerhard M, Schmid R, Barker N, Clevers H, Lang R, Neumann J, Kirchner T, Taketo MM, van den Brink GR, Sansom OJ, Arkan MC und Greten FR (2013). Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 152: 25–38
- Siegel RL, Miller KD und Jemal A (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68: 7–30
- Siewert JR (Hg.) 2010. *Praxis der Viszeralchirurgie*. Berlin [u.a.]: Springer

- Strachan T und Read AP (2005). *Molekulare Humangenetik*. Heidelberg: Elsevier Spektrum Akad. Verl.
- Sun A-X, Liu C-J, Sun Z-Q und Wei Z (2014). NANOG: A promising target for digestive malignant tumors. *World J Gastroenterol* 20: 13071–13078
- Talmadge JE und Fidler IJ (2010). AACR centennial series: The biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 70: 5649–5669
- Tam WL und Ng HH (2014). Sox2: Masterminding the root of cancer. *Cancer Cell* 26: 3–5
- Tan L, Sui X, Deng H und 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
- Tempero MA, Malafa MP, Al-Hawary M, Asbun H, Bain A, Behrman SW, Benson AB, Binder E, Cardin DB, Cha C, Chiorean EG, Chung V, Czito B, Dillhoff M, Dotan E, Ferrone CR, Hardacre J, Hawkins WG, Herman J, Ko AH, Komanduri S, Koong A, LoConte N, Lowy AM, Moravek C, Nakakura EK, O'Reilly EM, Obando J, Reddy S, Scaife C, Thayer S, Weekes CD, Wolff RA, Wolpin BM, Burns J und Darlow S (2017). Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 15: 1028–1061
- Thiele I, Swainston N, Fleming RMT, Hoppe A, Sahoo S, Aurich MK, Haraldsdottir H, Mo ML, Rolfsson O, Stobbe MD, Thorleifsson SG, Agren R, Bölling C, Bordel S, Chavali AK, Dobson P, Dunn WB, Endler L, Hala D, Hucka M, Hull D, Jameson D, Jamshidi N, Jonsson JJ, Juty N, Keating S, Nookaew I, Le Novère N, Malys N, Mazein A, Papin JA, Price ND, Selkov E, Sigurdsson MI, Simeonidis E, Sonnenschein N, Smallbone K, Sorokin A, van Beek JHGM, Weichart D, Goryanin I, Nielsen J, Westerhoff HV, Kell DB, Mendes P und Palsson BØ (2013). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat Biotechnol* 31: 419–425
- Thomas M, Pim D und Banks L (1999). The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene* 18: 7690–7700
- Tseng P-L, Wu W-H, Hu T-H, Chen C-W, Cheng H-C, Li C-F, Tsai W-H, Tsai H-J, Hsieh M-C, Chuang J-H und Chang W-T (2018). Decreased succinate dehydrogenase B in human hepatocellular carcinoma accelerates tumor malignancy by inducing the Warburg effect. *Sci Rep* 8: 3081
- Valastyan S und Weinberg RA (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147: 275–292
- Valle S, Martin-Hijano L, Alcalá S, Alonso-Nocelo M und Sainz B (2018). The Ever-Evolving Concept of the Cancer Stem Cell in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 10
- Vander Heiden MG, Cantley LC und Thompson CB (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029–1033
- Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sánchez N, Marchesini M, Carugo A, Green T, Seth S, Giuliani V, Kost-Alimova M, Muller F, Colla S, Nezi L, Genovese G, Deem AK, Kapoor A, Yao W, Brunetto E, Kang Y, Yuan M, Asara JM, Wang YA, Heffernan TP, Kimmelman AC, Wang H, Fleming JB, Cantley LC, DePinho RA und Draetta GF (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* 514: 628–632

- Vidal-Vanaclocha F (2008). The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenviron* 1: 113–129
- Viol F (2015). Mechanisms of liver metastases in pancreatic ductal adenocarcinoma: Analysis of cancer stem cell properties in pancreatic ductal epithelial cells in dependence on the hepatic microenvironment. Master's Thesis: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Vlassis N, Pacheco MP und Sauter T (2014). Fast reconstruction of compact context-specific metabolic network models. *PLoS Comput Biol* 10: e1003424
- Wang F, Guo T, Jiang H, Li R, Wang T, Zeng N, Dong G, Zeng X, Li D, Xiao Y, Hu Q, Chen W, Xing X und Wang Q (2018). A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Mol Genet Genomics* 293: 769–783
- Wang J, Lu Q, Cai J, Wang Y, Lai X, Qiu Y, Huang Y, Ke Q, Zhang Y, Guan Y, Wu H, Wang Y, Liu X, Shi Y, Zhang K, Wang M und Peng Xiang A (2019). Nestin regulates cellular redox homeostasis in lung cancer through the Keap1-Nrf2 feedback loop. *Nat Commun* 10: 5043
- Warburg O (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–314
- Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, Hostetter G, Shepard HM, Hoff DD von und Han H (2015). Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* 21: 3561–3568
- Wong OGW und Cheung ANY (2016). Stem cell transcription factor NANOG in cancers--is eternal youth a curse? *Expert Opin Ther Targets* 20: 407–417
- Yen TWf, Aardal NP, Bronner MP, Thorning DR, Savard CE, Lee SP und Bell RH (2002). Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* 131: 129–134
- Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA, Hua S, Chu GC, Fletcher-Sananikone E, Locasale JW, Son J, Zhang H, Coloff JL, Yan H, Wang W, Chen S, Viale A, Zheng H, Paik J, Lim C, Guimaraes AR, Martin ES, Chang J, Hezel AF, Perry SR, Hu J, Gan B, Xiao Y, Asara JM, Weissleder R, Wang YA, Chin L, Cantley LC und DePinho RA (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149: 656–670
- Yip D, Karapetis C, Strickland A, Steer CB und Goldstein D (2006). Chemotherapy and radiotherapy for inoperable advanced pancreatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*: CD002093
- Zhang C, Samanta D, Lu H, Bullen JW, Zhang H, Chen I, He X und Semenza GL (2016). Hypoxia induces the breast cancer stem cell phenotype by HIF-dependent and ALKBH5-mediated m⁶A-demethylation of NANOG mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E2047-56
- Zhang D, Wang W, Xiang B, Li N, Huang S, Zhou W, Sun Y, Wang X, Ma J, Li G, Li X und Shen S (2013). Reduced succinate dehydrogenase B expression is associated with growth and de-differentiation of colorectal cancer cells. *Tumour Biol* 34: 2337–2347

Zhao J, Li J, Schlößer HA, Popp F, Popp MC, Alakus H, Jauch K-W, Bruns CJ und Zhao Y (2017a). Targeting Cancer Stem Cells and Their Niche: Current Therapeutic Implications and Challenges in Pancreatic Cancer. *Stem Cells Int* 2017: 6012810

Zhao T, Mu X und You Q (2017b). Succinate: An initiator in tumorigenesis and progression. *Oncotarget* 8: 53819–53828

Zhou J-J, Deng X-G, He X-Y, Zhou Y, Yu M, Gao W-C, Zeng B, Zhou Q-B, Li Z-H und Chen R-F (2014). Knockdown of NANOG enhances chemosensitivity of liver cancer cells to doxorubicin by reducing MDR1 expression. *Int J Oncol* 44: 2034–2040

7 Anhang

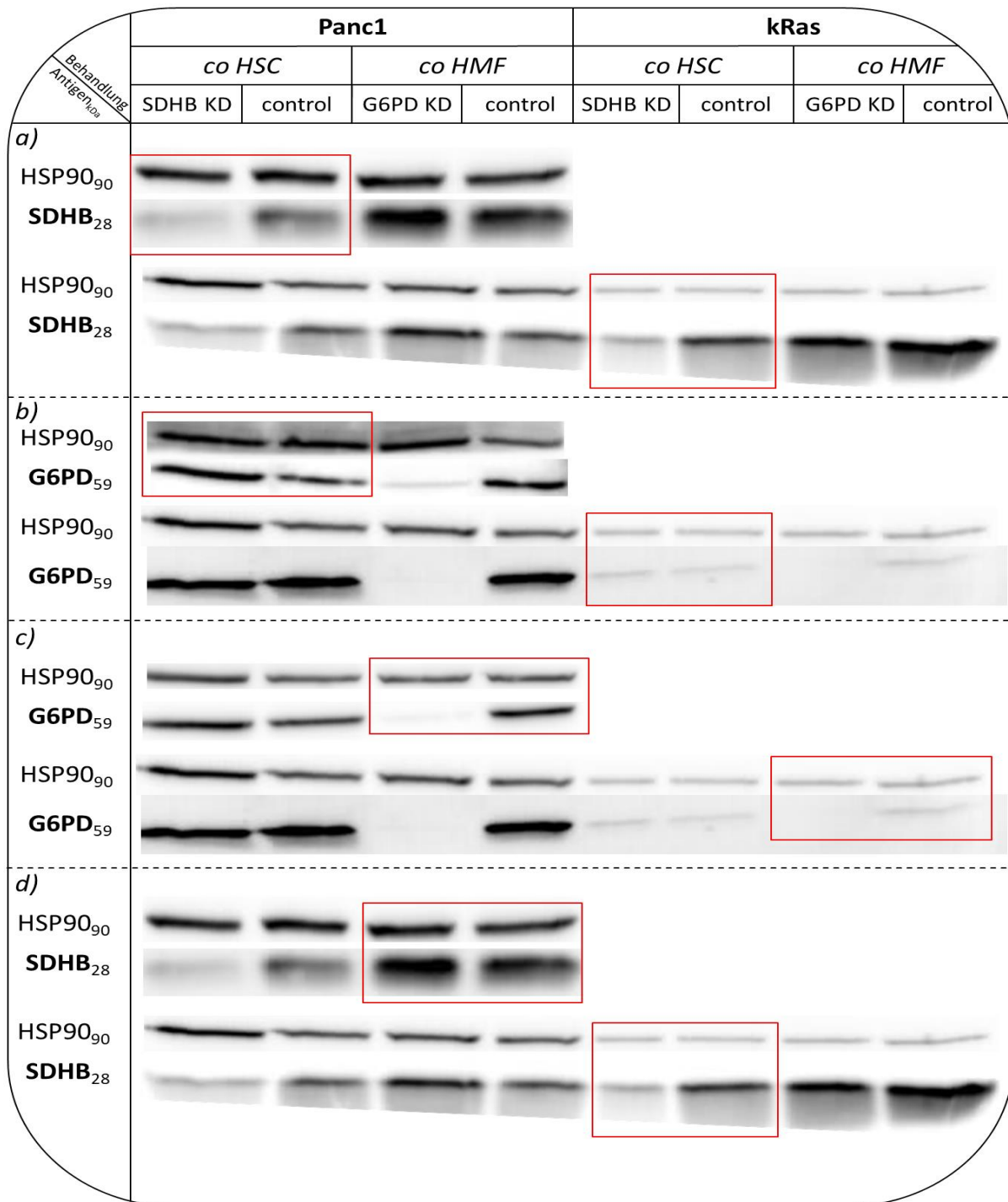


Abbildung 7-1 Originale Westernblots zur Erstellung der Abbildungen in Abschnitt 3.2 und 3.3

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA (control)- und andererseits SDHB-siRNA (SDHB-Knockdown (KD))-transfizierten oder G6PD-siRNA (G6PD-KD)-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) detektiert.

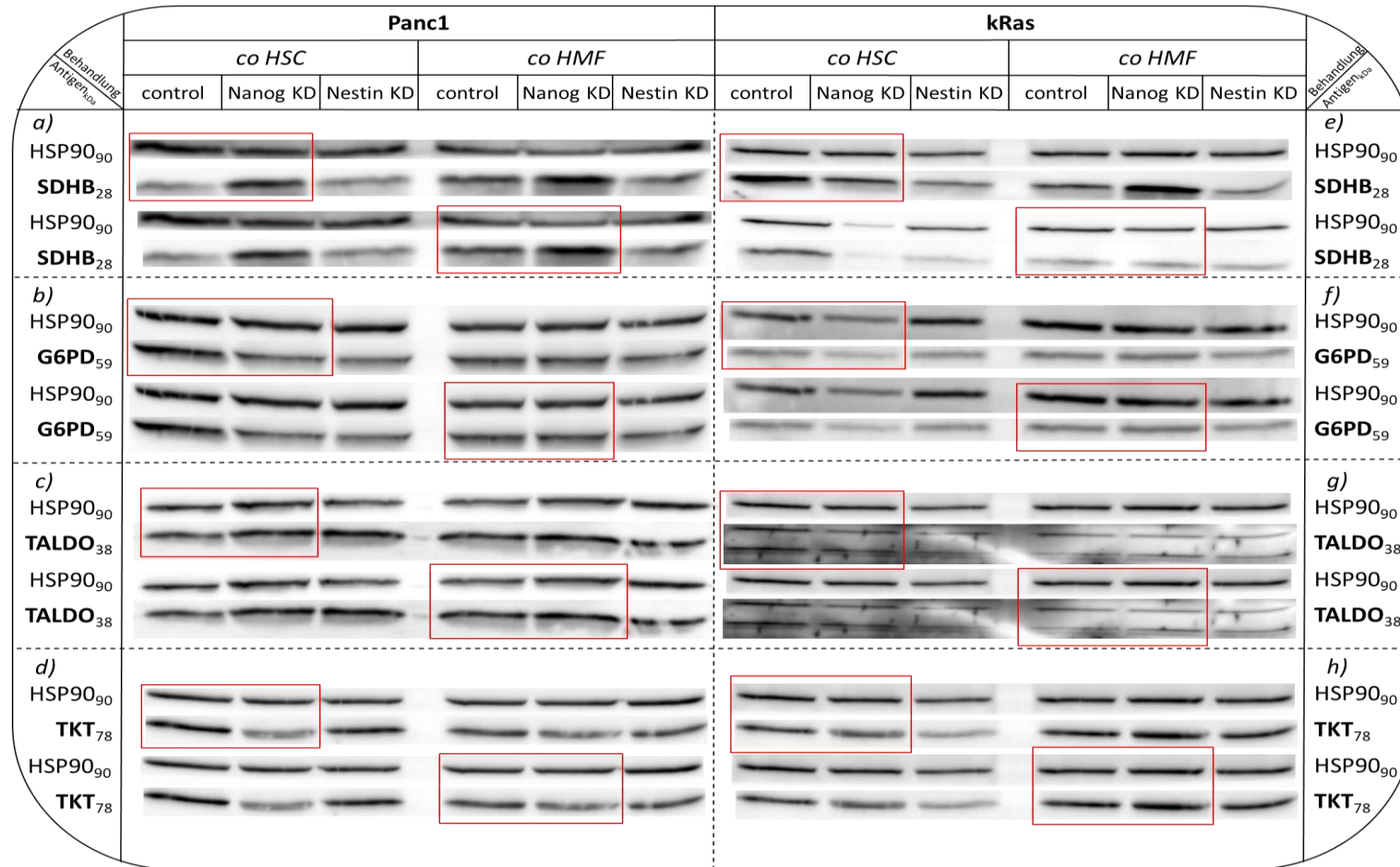


Abbildung 7-2 Originale Westernblots zur Erstellung der Abbildungen in Abschnitt 3.4

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA (control)- und andererseits Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten oder Nestin-siRNA (Nestin-KD)-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit hepatischen Sternzellen (HSC) oder hepatischen Myofibroblasten (HMF) mittels Westernblot detektiert.

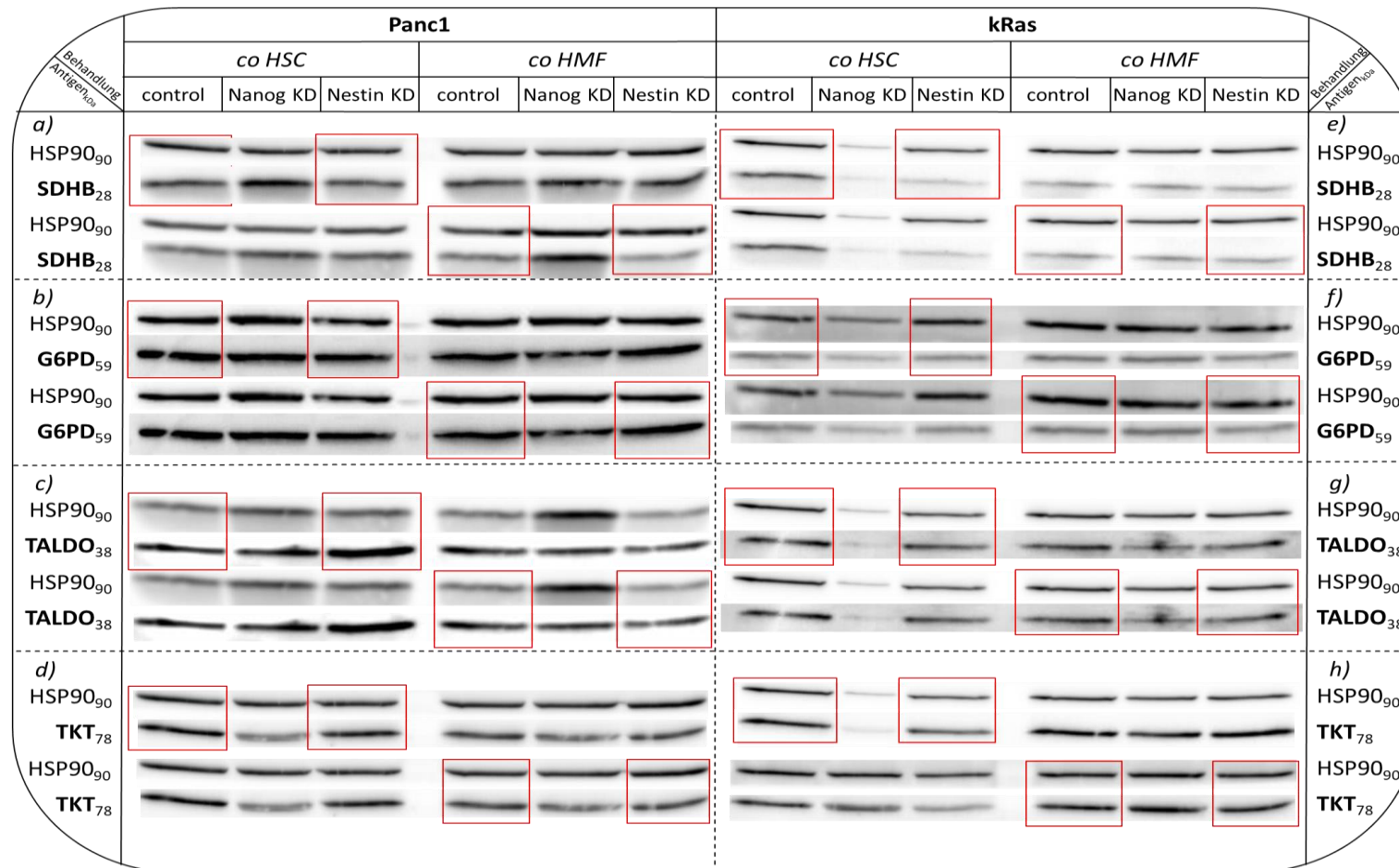


Abbildung 7-3 Originale Westernblots zur Erstellung der Abbildungen in Abschnitt 3.5

Succinatdehydrogenase Subeinheit B (SDHB), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD), Transaldolase (TALDO), Transketolase (TKT) und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) als Ladekontrolle wurden in Ganzzelllysaten von einerseits Kontroll-siRNA (control)- und andererseits Nanog-siRNA (Nanog-Knockdown (KD))-transfizierten oder Nestin-siRNA (Nestin-KD)-transfizierten Panc1- oder kRas-Zellen nach 7-tägiger Kokultur mit HSC oder HMF mittels Westernblot detektiert.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meiner Doktormutter und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Kiel, den 02.05.2022

Simon Stegner

Veröffentlichungen

Tagungsbeitrag

Postervortrag im Rahmen des 123. Jahreskongresses der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. 2017 unter dem Titel „Liver metastases of pancreatic cancer: The interplay of metabolic enzymes and cancer stem cell properties in the context of the hepatic microenvironment“

Publikation

Fabian, Alexander; Stegner, Simon; Miarka, Lauritz; Zimmermann, Johannes; Lenk, Lennart; Rahn, Sascha et al. (2019): Metastasis of pancreatic cancer. An uninflamed liver micromilieu controls cell growth and cancer stem cell properties by oxidative phosphorylation in pancreatic ductal epithelial cells. In: Cancer letters 453, S. 95–106.

Danksagung

In erster Instanz möchte ich meinen besonderen, aufrichtigen Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens aussprechen. Auf dem gesamten Weg meines Promotionsvorhabens hat sie mich mit exzellenter fachlicher Expertise und herausragendem Interesse jederzeit selbstlos, freundlich, motiviert und konstruktiv begleitet.

Für die interessanten Ergebnisse der Vorstudien und die relevante Arbeit, auf dessen Grundlage diese Promotionsarbeit entstanden ist, danke ich Frau Dr. rer. nat. Hendrike Knaack, Herrn Dr. med. Alexander Maurice Fabian und Herrn Dr. rer. nat. Lennart Lenk.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Jann Buttlar, der mich zu Beginn meines Promotionsvorhabens mit großer Hilfsbereitschaft und Motivation in die praktischen Fähigkeiten der experimentellen Laboratoriumsarbeit eingearbeitet hat. Ein besonderer Dank gilt dabei auch Frau Dagmar Leißner, die mich mit ihrer freundlichen und hilfsbereiten Art bei der Laboratoriumsarbeit unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Hendrike Knaack, Herrn Dr. rer. nat. Ole Helm, Herrn Dr. rer. nat. Lennart Lenk und Herrn Dr. rer. nat. Sascha Rahn für ihre engagierte und konstruktive Hilfe bedanken. Mit ihren fundierten biologischen Kenntnissen und ihrer wissenschaftlichen Expertise waren sie für mich jederzeit feste Ansprechpartner für die Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen und für die Lösung mit der Arbeit aufgekommener Probleme. Auf ihren guten Rat konnte ich mich jederzeit verlassen, dafür danke ich ihnen sehr.

Für die Vorbereitung auf den Postervortrag auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. 2017 danke ich meiner Doktormutter und Frau Dr. rer. nat. Hendrike Knaack. Finanziell unterstützt wurde ich für diesen Kongress durch das Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V., wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Ich danke der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Bewilligung eines Promotionsstipendiums und die damit einhergehende finanzielle Unterstützung in meinem Promotionsvorhaben. Für die Fürsprache meiner Doktormutter und den konstruktiven Rat von Herrn Dr. Lennart Lenk im Bewerbungsprozess bin ich sehr dankbar.

Zuletzt gilt mein Dank meiner wunderbaren Familie und meinen tollen Freunden, die mein Leben Tag für Tag bereichern. Besonders herausheben möchte ich dabei Frau Annika Heinius, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit mit ihrer Zusprache und ihrem Rat uneingeschränkt und liebevoll unterstützte. Sie gibt mir die Zuversicht und das Vertrauen, meinen Träumen nachzugehen und diese zu verwirklichen. Meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, danke ich von ganzem Herzen für alles, was sie mir in meinem Leben ermöglichten. Ich hoffe demütigst durch diese Arbeit meinen aufrichtigen Dank und Respekt dafür zum Ausdruck bringen zu können.