

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

**Charakterisierung von Pankreaskarzinomzellen mit
unterschiedlichen Stammzeleigenschaften in metastasierungs-
assoziierten Prozessen**

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

vorgelegt von
Umut-Ulas Yesilyurt
aus Kiel

Kiel 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens
Institut für Experimentelle Tumorforschung
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Röcken
Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2025
Zum Druck genehmigt, Kiel: 22.09.2025

gez. Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

„Wir werden immer weniger wissen, was ein Mensch ist.“

José Saramago

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das duktales Pankreasadenokarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Symptome, Diagnostik und Therapie.....	3
1.2	Metastasierung.....	5
1.2.1	Migration und Adhäsion.....	7
1.2.2	Epithelial-Mesenchymale Transition	8
1.2.3	Krebsstammzellen	12
1.3	Zielsetzung.....	15
2	MATERIALIEN UND METHODEN	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.1.1	Zentrifugen.....	17
2.1.1.2	Inkubatoren	17
2.1.1.3	Messgeräte	17
2.1.1.4	Mikroskope.....	18
2.1.1.5	Pipetten	18
2.1.1.6	Sterilwerkbänke.....	18
2.1.1.7	Waagen.....	18
2.1.1.8	Weitere Geräte.....	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.4	Zellkultur.....	20
2.1.4.1	Zelllinien	20
2.1.4.2	Zellkulturreagenzien.....	21
2.1.4.3	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	21
2.1.5	Antikörper	21
2.1.6	Software	22

2.2	Methoden	23
2.2.1	Zellkultur.....	23
2.2.1.1	Kultivierung von PDAC-Zellen und humanen Lungenendothelzellen	23
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
2.2.1.3	Generierung von konditionierten Medien	24
2.2.1.4	Zellmarkierungen mit dem CellTracker™ Green CMFDA und DeepRed.....	24
2.2.2	Migrationsassay	25
2.2.2.1	Migrationsassay mit konditionierten PDAC-Zellvarianten.....	26
2.2.2.2	Migrationsassay mit Fluoreszenz-markierten PDAC- Zellvarianten	26
2.2.3	Adhäsionsassay	27
2.2.3.1	Adhäsionsassay mit konditionierten Lungenendothelzellen	29
2.2.4	Färbungen	29
2.2.4.1	Immunzytochemische Färbungen	30
2.2.4.2	Immunfluoreszenzfärbungen.....	31
2.2.5	Statistik.....	32
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	Migrationsverhalten.....	33
3.1.1	Panc1-Zellvarianten migrieren signifikant langsamer als Panc89- Zellvarianten.....	33
3.1.2	Immunzytochemische Darstellung der Expression von EMT- und CSC-Markern in migrierenden Panc89-Zellen.....	38
3.1.3	Immunfluoreszenzdoppelfärbung von E-Cadherin und Sox2 in migrierenden Panc89-Zellen	40
3.1.4	Keine parakrine Beeinflussung der Migration von Panc89- Holoklon- und Panc89-Paraklonzellen.....	43
3.1.5	Keine Beeinflussung des Migrationsverhaltens der Panc89- Holoklonzellen und Panc89-Paraklonzellen durch parallele Aussaat im Migrationsassay.....	44

3.1.6	Ein höherer Anteil an Panc89-Holoklonzellen an der Gesamtzellpopulation geht mit einer schnelleren Migrationsfähigkeit einher.....	46
3.2	Adhäsionsverhalten.....	48
3.2.1	Panc1-Zellvarianten adhärieren geringer an Lungenendothelzellen als Panc89-Zellvarianten	48
3.2.2	Keine Beeinflussung der Adhäsionsfähigkeit der Panc1- und Panc89-Zellvarianten an Lungenendothelzellen nach Stimulation der Lungenendothelzellen mit konditionierten Medien	50
4	DISKUSSION.....	54
4.1	Migrationsverhalten der PDAC-Zellvarianten	54
4.1.1	Migrationsverhalten von PDAC-Zellvarianten in Abhängigkeit ihres EMT- und CSC-Status	54
4.1.2	Panc89-Zellvarianten beeinflussen sich nicht gegenseitig über lösliche Faktoren in ihrem Migrationsverhalten	59
4.1.3	Die Panc89-Holoklonzellen sind der Treiber des ausgeprägten Migrationsverhaltens der Panc89-Zellvarianten	59
4.1.4	Unterscheidung von Proliferation und Migration im Migrationsassay	61
4.2	Adhäsionsverhalten der PDAC-Zellen an Lungenendothelzellen.....	62
4.2.1	Adhäsion an Lungenendothelzellen von PDAC-Zellvarianten in Abhängigkeit ihres EMT- und CSC-Status	62
4.2.2	Die Adhäsion an Lungenendothelzellen wird nicht durch lösliche Faktoren in den konditionierten Medien beeinflusst	63
4.3	Ausblick.....	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	87
7.1	Tagungsbeitrag	87
7.2	Publikationen.....	87

8	DANKSAGUNG	88
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	90

Auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit in dieser Arbeit verzichtet. In der Regel wird die männliche Sprachweise verwendet. Diese gilt auch für Menschen mit weiblichem Geschlecht oder anderer Geschlechtszuordnung.

I. Abkürzungsverzeichnis

ABCG2	<i>ATP-binding-cassette-G2</i>
AT	<i>Austria</i>
ATCC	<i>American Typ Culture Collection</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CH	<i>Confoederatio Helvetica</i>
CMFDA	Chloromethylfluorescein
CSC	<i>Cancer stem cell</i>
CTC	<i>Circulating tumor cell</i>
CXCR4	C-X-C-Chemokin-Rezeptor Typ 4
DE	Deutschland
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Cadherin	<i>Epithelial Cadherin/Cadherin-1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
EMT-TF	EMT-assoziiierter Transkriptionsfaktor
Ep-CAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
E/M	Hybride oder partielle EMT
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FOLFIRINOX	Folinsäure/5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin
FR	Frankreich
GCO	<i>Global Cancer Observatory</i>
h	Stunde (n)
HuLEC-5a	<i>Human lung endothelial cell-5a</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-6	Interleukin-6
IPMN	<i>Intraductal papillary mucinous neoplasm</i>
JPN	Japan
KD	<i>Knockdown</i>

KM	Konditioniertes Medium
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
MCDB	<i>Modified Coon's Dulbecco's Basal</i>
MCN	<i>Mucinous-cystic neoplasm</i>
MDCT	Multidetektor-Computertomographie
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
mFOLFIRINOX	Modifiziertes FOLFIRINOX
MMP	Matrixmetalloprotease
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC-1	Mucin-1
nab	<i>Nanoparticle albumine-bound</i>
NALIRIFOX	Leucovorin, liposomales Irinotecan, 5-FU, Oxaliplatin
N-Cadherin	<i>Neural Cadherin</i>
ncRNA	<i>Non-coding RNA</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NL	Niederlande
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
one-way ANOVA	<i>One-way-analysis of variance</i>
OVOL1/2	<i>OVO-like-1/OVO-like-2</i>
PanIN	<i>Pancreatic intraepithelial neoplasm</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDEZ	Pankreatische duktale Epithelzellen
PFA	Paraformaldehyd
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SMAD4	<i>Mothers against Decapentaplegia homolog 4</i>
Sox2	<i>Sex determining region Y (SRY)-box</i>
TAE	Tumor-assoziiertes Endothel
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>

TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
UK	<i>United Kingdom</i>
US	<i>United States</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht pro Volumen (mg/100ml)
ZEB1/2	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox (ZEB)-Familie 1 und 2</i>
α -SMA	<i>Alpha Smooth-Muscle-Actin</i>
5-FU	5-Fluorouracil

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Progression eines PDAC.	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade beim PDAC... ..	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der EMT-MET-Achse sowie einiger charakteristischer Eigenschaften der unterschiedlichen Phänotypen.	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Migrationsassays nach Aussaat der PDAC-Zellen in die Kavitäten der Ibidi®-Zellkultureinsätze.....	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Adhäsionsassays an Lungenendothelzellen.....	29
Abbildung 6: In allen untersuchten Zellvarianten lässt sich eine Zunahme der Zellkonfluenz im Spalt beobachten.....	35
Abbildung 7: Panc1-Zellvarianten migrieren signifikant langsamer als Panc89- Zellvarianten.....	38
Abbildung 8: Migrierende Zellverbände enthalten E-Cadherin-exprimierende Zellen, sind aber nicht exklusiv Sox2-exprimierend.....	40
Abbildung 9: Co-Expression von E-Cadherin und Sox2 sowohl an der Migrationsfront als auch zentral im Zellrasen der parentalen Panc89-Zellen und Panc89-Holoklonzellen.....	42
Abbildung 10: Das Migrationsverhalten der Panc89-Zellvarianten wird nicht durch sezernierte lösliche Faktoren der anderen Zellpopulation beeinflusst.	43
Abbildung 11: Das Migrationsverhalten der Panc89-Holo- und Paraklonzellen wird nicht durch parakrine Faktoren beeinflusst.....	45
Abbildung 12: Panc89-Holoklonzellen beeinflussen das Migrationsverhalten der Panc89-Paraklonzellen durch direkte Interaktion.	48
Abbildung 13: Panc1-Zellvarianten adhärieren signifikant weniger an Lungenendothelzellen als Panc89-Zellvarianten.....	50
Abbildung 14: Die Vorkonditionierung der Lungenendothelzellen durch konditioniertes Medium der PDAC-Zellvarianten hat keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit.	51

Abbildung 15: Parakrine Faktoren in konditionierten Medien haben keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der CSC- bzw. Nicht-CSC-Populationen der PDAC-Zellvarianten.	52
---	----

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreasadenokarzinom

Das duktales Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) zeichnet sich durch aggressives Wachstum, frühe Metastasierung und eine ungünstige Prognose aus. Die Mehrzahl der PDAC entsteht im Pankreaskopf, während nur 20-30 % im Pankreaskorpus oder -schwanz lokalisiert sind (Mizrahi et al. 2020). Aufgrund der retroperitonealen Lage des Organs bleiben die Patienten oft symptomlos oder entwickeln erst spät im Krankheitsverlauf Symptome. Die Diagnostik, die hauptsächlich auf bildgebenden Verfahren basiert, kann Raumforderungen im Pankreas oft erst bei fortgeschrittener Tumorgroße erkennen. Zum Zeitpunkt der Erstvorstellung ist der Tumor daher häufig metastasiert bzw. lokal fortgeschritten, so dass eine kurative Therapie bei den meisten Erkrankten nicht mehr möglich ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das PDAC ist weltweit die siebthäufigste krebserkrankte Todesursache. Es gibt deutliche geografische Unterschiede in der Inzidenz, wobei Regionen mit hohem Einkommen wie Nordamerika, Europa und Australien aufgrund demografischer Faktoren höhere Inzidenzraten aufweisen als Regionen mit niedrigem Einkommen (Sung et al. 2021). Deutschland hat eine der höchsten Neuerkrankungsraten in Europa. Basierend auf den Daten des *Global Cancer Observatory* (GCO) für das Jahr 2022 beträgt die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate für Deutschland 9,9 pro 100.000 Männer und 7,6 pro 100.000 Frauen. Die altersstandardisierte Sterberate für das Jahr 2022 beträgt für Deutschland 9,6 pro 100.000 Männer und 6,9 pro 100.000 Frauen (Ferlay et al. 2024). Mit nahezu identischen Inzidenz- und Mortalitätsraten sowie einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 12 % ist das PDAC somit eine der tödlichsten Krebserkrankungen (Siegel et al. 2023). Die meisten Betroffenen sind bei Erstdiagnose über 70 Jahre alt (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Die genaue Ätiologie des PDAC ist weitgehend unbekannt (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). In großen prospektiven Kohortenstudien konnten jedoch mehrere Risikofaktoren identifiziert werden, die das Risiko für die Entwicklung eines PDAC erhöhen. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehören das Rauchen, regelmäßiger Alkoholkonsum, Übergewicht, geringe körperliche Aktivität und das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ 2 (Batabyal et al. 2014; Iodice et al. 2008; Lucenteforte et al. 2012; Michaud 2001). Weitere nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind eine akute oder chronische Pankreatitis in der Anamnese,

eine positive Familienanamnese und bestimmte hereditäre Genmutationen (Abe et al. 2021; Permuth-Wey und Egan 2009; Yadav und Lowenfels 2013).

Aufgrund des demographischen Wandels und der Zunahme ungesunder Lebensweisen wird erwartet, dass das PDAC bis 2040 die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in den USA sein wird (Rahib et al. 2021).

1.1.2 Pathogenese

Das PDAC stellt die häufigste Form des Pankreaskarzinoms dar und macht über 95 % aller bösartigen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse aus. Es geht von den exokrinen Zellen des Pankreas, insbesondere von den pankreatischen dukталen Epithelzellen (PDEZ), aus. Im Vergleich dazu sind zystische Adenokarzinome, Tumoren, die von den sekretproduzierenden Parenchymzellen der Azini ausgehen, sowie endokrine Tumoren seltener (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Die Pathogenese des PDAC ist multifaktoriell und umfasst ein komplexes Zusammenspiel genetischer, epigenetischer, zellulärer und das Tumormikromilieu beeinflussender Veränderungen. Diese vielfältigen Veränderungen interagieren miteinander und tragen dazu bei, dass sich nicht-invasive präkanzeröse Vorstufen, wie pankreatische intraepitheliale Neoplasien (*pancreatic intraepithelial neoplasms*, PanIN), intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (*intraductal papillary mucinous neoplasms*, IPMN) oder muzinös-zystische Neoplasien (*mucinous-cystic neoplasms*, MCN), im Laufe der Zeit zu invasiven Karzinomen entwickeln können (Abbildung 1) (Vincent et al. 2011).

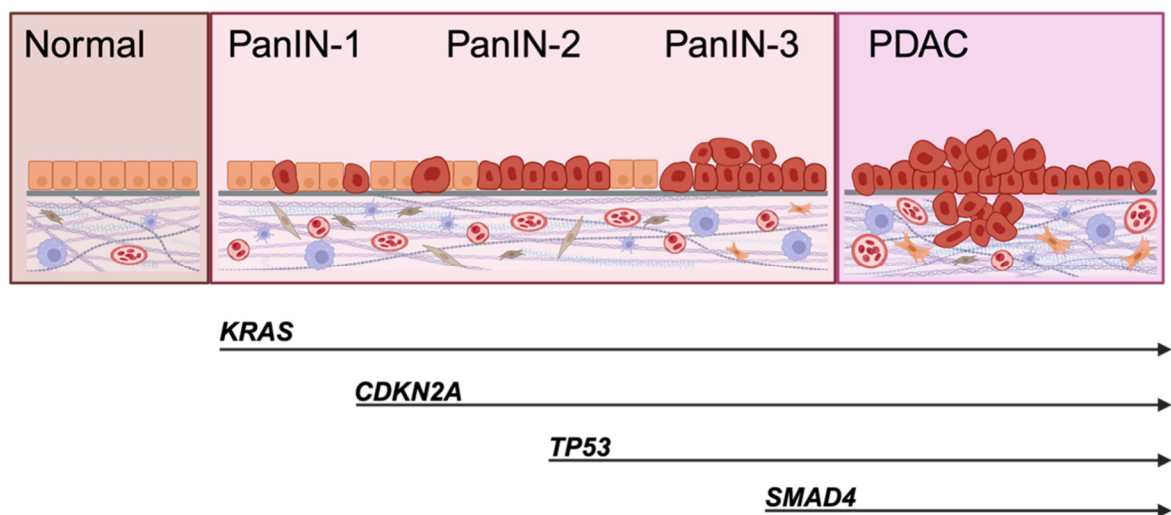


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Progression eines PDAC. Aus einem normalen Pankreasepithel entsteht über pankreatische Vorläuferläsionen ein invasives duktales Pankreasadenokarzinom (PDAC). Dargestellt sind die im Laufe der Zeit erworbenen genetischen Aberrationen und die Progression von PanIN1 bis PanIN3, sodass letztendlich ein invasives PDAC entsteht. Hergestellt mit Biorender®.

Die Progression nicht-invasiver Vorläuferläsionen zu einem PDAC wird maßgeblich durch genetische Veränderungen beeinflusst, wobei eine Beteiligung mehrerer Gene nachgewiesen wurde. Aktivierende Mutationen im *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* (KRAS) stellen das Hauptmerkmal des PDAC dar und treten in über 90 % der Fälle auf (Cancer Genome Atlas Research Network 2017). Auch Mutationen in Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise dem *tumor protein 53* (TP53), dem *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A) und dem *Mothers against Decapentaplegia homolog 4* (SMAD4), werden häufig nachgewiesen (Bailey et al. 2016). Diese Mutationen führen nicht nur zur Progression eines PDAC aus Vorläuferläsionen, sondern fördern auch die Metastasierung (Aguirre et al. 2003; Bardeesy et al. 2006; Hingorani et al. 2005; Qiu et al. 2011). In der Konsequenz tragen sie zum Fortschreiten der Tumorerkrankung und der ungünstigen Prognose bei.

Epigenetische Veränderungen, einschließlich der DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und Dysregulation nicht-kodierender RNA (*non-coding* RNA, ncRNA) führen zu weiteren Veränderungen in Genen, welche die Progression des PDAC beeinflussen. Dies umfasst sowohl Veränderungen der malignen Tumorzellen selbst als auch des Tumorstromas (Pandey et al. 2023).

Das Tumorstroma beim PDAC ist durch seine dichte und bindegewebsreiche Struktur gekennzeichnet. Diese Gewebsvermehrung wird als desmoplastische Reaktion bezeichnet und macht teilweise 80 % des Primärtumors aus (Erkan et al. 2012). Das dichte Tumorstroma ist nicht nur eine passive strukturelle Komponente, sondern trägt aktiv zum malignen Verhalten des Tumors bei. Es fördert das Überleben, die Proliferation und die Metastasierung von Tumorzellen, während es die Infiltration von Immunzellen hemmt und eine physische Barriere bildet, die die Wirksamkeit von Chemotherapeutika mindert (Edwards et al. 2021).

Die aufgezeigten Veränderungen bedingen letztlich die aggressive Natur des PDAC sowie die Unwirksamkeit vieler Therapiestrategien.

1.1.3 Symptome, Diagnostik und Therapie

Das PDAC stellt aufgrund der oftmals späten Diagnosestellung, des aggressiven Verhaltens und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten eine große Herausforderung für die Medizin dar (Ryan et al. 2014).

In vielen Fällen treten Symptome erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auf, wodurch eine frühzeitige Diagnose erschwert wird. Bei Auftreten von Beschwerden wiederum sind diese äußerst unspezifisch für das Vorliegen eines PDAC und zudem abhängig von der Lokalisation des Primarius (Mizrahi et al. 2020; Porta et al. 2005; Walter et al. 2016).

Zu diesen unspezifischen Beschwerden gehört die Entwicklung einer Gelbsucht, wenn der Tumor aufgrund seines Wachstums und seiner Lage – vor allem im Pankreaskopf – den Gallengang verlegt (Schmidt-Hansen et al. 2016).

Gürtelförmig ausstrahlende Bauch- und Rückenschmerzen treten in der Regel früh auf. Neben der Kompression benachbarter Strukturen mit konsekutiver Reizung der sensiblen Afferenzen können maligne Tumorzellen durch direkte Invasion in peripankreatische Nervenplexus Schmerzen verursachen (Bapat et al. 2011).

Begleitsymptome einer konsumierenden Erkrankung wie Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit und Fieber treten auch beim PDAC auf. Neben dem konsumierenden Charakter des Malignoms ist der eingeschränkte Allgemein- und Ernährungszustand auf die verminderte Fähigkeit des Körpers zurückzuführen, Nährstoffe zu verdauen, da der Tumor die exokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse beeinträchtigt. Dies kann zu Übelkeit, Erbrechen, Durchfall und Fettstühlen führen (Schmidt-Hansen et al. 2016; Vujasinovic et al. 2017). In einigen Fällen kann sogar eine abnorme Nüchternglukosetoleranz oder ein neu aufgetretener Diabetes mellitus mit einem PDAC assoziiert sein, bevor der Primarius bildmorphologisch detektierbar ist (Pannala et al. 2009).

Die Präsentation eines PDAC ist somit unspezifisch und nur die Kombination verschiedener Symptome weist auf eine maligne Grunderkrankung hin. Daher kann keine allgemeingültige Empfehlung ausgesprochen werden, wann der Verdacht auf ein PDAC geäußert und weitere diagnostische Schritte eingeleitet werden sollten.

Die neueste S3-Leitlinie aus dem Jahr 2024 empfiehlt unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise bei Personen über 50 Jahren mit neu aufgetretenen starken Oberbauch- oder Rückenschmerzen zunächst eine transabdominale Ultraschalluntersuchung durchzuführen. Bei persistierendem Verdacht auf eine maligne Raumforderung im Pankreas werden weitere bildgebende Verfahren wie die Multidetektor-Computertomographie (MDCT) oder die Magnetresonanztomographie (MRT) in Kombination mit der Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) zur Detektion des Primärtumors sowie zur Ausbreitungsdiagnostik empfohlen. Je nach Verfügbarkeit kann eine Endosonographie ergänzt werden, die in Abhängigkeit von der Erfahrung des Untersuchers die höchste Sensitivität zur Erkennung eines PDAC bietet (Costache et al. 2017; Leitlinienprogramm Onkologie 2024). Eine Biopsie der Tumormasse zur Diagnosesicherung sollte nur in Ausnahmefällen oder vor Einleitung einer palliativen Therapie durchgeführt werden. Bei operablen, jedoch unklaren Pankreasveränderungen muss die Resektion unabhängig von der möglichen Dignität der Läsion zeitnah angestrebt werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Die chirurgische R0-Resektion des Tumors in Kombination mit einer sechsmonatigen adjuvanten Chemotherapie stellt derzeit die einzige kurative Therapie dar. Die Resektabilität

wird nicht nur durch anatomische Faktoren definiert, sondern auch durch tumorbiologische und patientenabhängige Kriterien (Isaji et al. 2018). Allerdings ist zum Zeitpunkt der Diagnose lediglich ein geringer Anteil der Patienten für eine Operation geeignet. Neoadjuvante Therapien gewinnen daher zunehmend an Bedeutung, da sie das Wachstum von Tumorzellen reduzieren, die Resektionsraten erhöhen und das Langzeitüberleben verlängern können (van Dam et al. 2022; Janssen et al. 2019).

Nach chirurgischer Resektion und ohne Vorliegen von Fernmetastasen stellt die adjuvante Chemotherapie mit einem modifizierten (Dosis-reduzierten) Regime aus Folinsäure/5-Fluorouracil (5-FU), Irinotecan und Oxaliplatin (mFOLFIRINOX), Gemcitabin als Monotherapie oder Gemcitabin in Kombination mit Capecitabin den Standard in der kurativen Therapie des PDAC dar (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Bei Vorliegen von Fernmetastasen oder einem lokal fortgeschrittenen, inoperablen Tumor kann einzig eine palliative Chemotherapie mit FOLFIRINOX, einer Kombination aus Leucovorin, liposomalem Irinotecan, 5-FU und Oxaliplatin (NALIRIFOX) oder Gemcitabin und *nanoparticle albumine-bound* (nab)-Paclitaxel das Gesamtüberleben verlängern. Falls der Allgemeinzustand des Patienten keine der genannten Therapieschemata erlaubt, kann alternativ eine Systemtherapie mit Gemcitabin als Monotherapie oder in Kombination mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Erlotinib sowie eine rein supportive Therapie angeboten werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

In den vergangenen Jahren haben sich bei zahlreichen Krebserkrankungen zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) durchgesetzt, die spezifische genetische Aberrationen und molekulare Veränderungen beeinflussen. Der Einsatz dieser Therapieform hat sich jedoch beim PDAC aufgrund der Heterogenität der Tumorzellen sowie der Komplexität des Tumorstromas nicht etablieren können. Lediglich der bereits erwähnte TKI Erlotinib, der den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) hemmt, wurde beim fortgeschrittenen, inoperablen Pankreaskarzinom zugelassen (Moore et al. 2007). Eine weitere zielgerichtete Therapie ist Sotorasib, das in ersten klinischen Studien ein vielversprechendes Ansprechen gezeigt hat. Es hemmt spezifisch die Signalübertragung bei PDAC-Patienten mit einer Mutation des KRAS-G12C, die jedoch nur bei etwa 1-2% der Erkrankten nachweisbar ist (Strickler et al. 2023).

Es ist daher von entscheidender Bedeutung, weitere molekulare Mechanismen des PDAC zu entschlüsseln, um in Zukunft effektivere Therapiestrategien entwickeln zu können.

1.2 Metastasierung

Der Begriff der Metastasierung bezeichnet den Prozess der Ausbreitung von Krebszellen vom Primärtumor in sekundäre Organe. Die Metastasierung stellt eines der charakteristischen

Merkmale einer malignen Tumorerkrankung dar und ist klinisch von großer Bedeutung, da der Nachweis von Metastasen die Hauptursache für krebisbedingte Todesfälle darstellt (Hanahan und Weinberg 2011).

Es wurde bereits früh erkannt, dass lediglich ein geringer Anteil von malignen Zellen in der Lage ist, erfolgreich Metastasen auszubilden (Fidler 1970). Die weitere Forschung hat gezeigt, dass dieser kleine Anteil an malignen metastasierungsfähigen Tumorzellen eine kleine Subpopulation innerhalb des biologisch heterogenen Primärtumors darstellt (Fidler 2003).

Im Laufe der Zeit wurde eine Abfolge verschiedener metastasierungsassoziierter Prozesse definiert, die im Rahmen der „Metastasierungskaskade“ durchlaufen werden. Initiiert wird diese Kaskade durch den Erwerb eines motilen Phänotyps und damit der Fähigkeit zur Migration und Invasion von Tumorzellen in das umliegende Gewebe. In der Folge gelangen die Zellen über Blut- und Lymphgefäße in den Körperkreislauf und adhären schließlich an Endothelzellen in den Stromgebieten sekundärer Organe. Nach dem Einwandern in das Parenchym dieser Organe und der Adaptation an die dortigen Gewebsbedingungen erfolgt die Ausbildung von Metastasen (Abbildung 2).

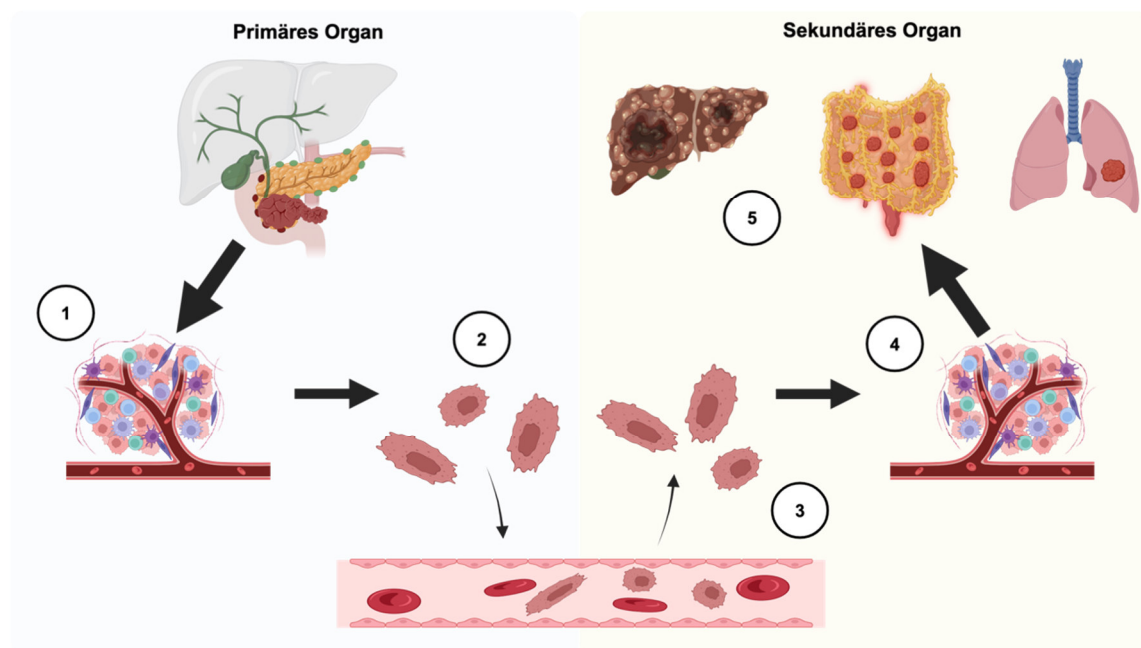


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade beim PDAC. 1. Maligne Tumorzellen finden durch Migration und Invasion in ihre unmittelbare Umgebung Anschluss an Blut- oder Lymphgefäße 2. Intravasation motiler Tumorzellen in den Blutkreislauf 3. Zirkulation der Tumorzellen im Kreislauf 4. Anheften an das Endothel von sekundären Organen und Extravasation 5. Kolonisation von sekundären Organen, z.B. Leber, Peritoneum und Lunge. Hergestellt mit Biorender®.

Auf molekularer Ebene kommt es zur Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen, die die malignen Tumorzellen zur Lösung aus dem Primärtumor befähigen. Zu diesen Veränderungen zählt auch die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT). Im Rahmen der EMT nehmen die epithelialen Zellen durch Entdifferenzierung einen mesenchymalen, motilen Phänotyp an (Fares et al. 2020). Darüber hinaus ist im Primärtumor eine Subpopulation mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Tumorinitiation vorhanden, welche als Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs) bezeichnet wird. Die Existenz von CSCs wird ebenfalls mit der Entwicklung von Metastasen in Verbindung gebracht (F. Li et al. 2007).

Der Großteil der Patienten, bei denen ein PDAC diagnostiziert wird, weist zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine metastasierte Erkrankung auf, was den aggressiven Charakter dieser Krebserkrankung unterstreicht (Mizrahi et al. 2020). Die Metastasierung des PDAC erfolgt dabei sowohl hämatogen als auch lymphogen und *per continuitatem* in die unmittelbare Umgebung. Die häufigsten Lokalisationen von Fernmetastasen sind die Leber, das Peritoneum und die Lunge (Usón et al. 2020).

1.2.1 Migration und Adhäsion

Zellmigration und Zelladhäsion sind zwei physiologisch eng miteinander verknüpfte Prozesse, die für die Embryonalentwicklung, Wundheilung, Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Immunantwort von grundlegender Bedeutung sind. Bei Krebserkrankungen kann eine pathologische Aktivierung dieser Mechanismen jedoch die Progression, Invasion und Metastasierung von Tumoren begünstigen (Pijuan et al. 2019).

Die wechselseitige Beeinflussung der malignen Zellen mit der Tumormikroumgebung (*tumor microenvironment*, TME) führt zu Veränderungen, die die Invasion und Metastasierung von malignen Tumorzellen fördern. Beispielsweise setzen verschiedene Immunzellen Matrixmetalloproteasen (MMP) und Wachstumsfaktoren frei, welche nicht nur die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) verändern und das Tumorstadium fördern, sondern auch direkt die gerichtete Motilität, Adhäsionsfähigkeit und Intravasation der malignen Tumorzellen beeinflussen. Tumor-assoziierte Fibroblasten wiederum spielen eine wichtige Rolle in der Induktion der EMT und sind aktiv an der Umgestaltung des TME beteiligt (Hanahan und Coussens 2012).

Durch diese Mechanismen werden maligne Tumorzellen befähigt, in Form einzelner Zellen oder als Zellkollektiv durch die EZM zu migrieren und Anschluss an das Gefäßsystem zu finden (Friedl und Wolf 2003).

Die mesenchymale Migration als eine Form der Einzelzellmigration wird von epithelialen Tumorzellen genutzt, die im Rahmen der EMT durch Entdifferenzierung einen mobilen

mesenchymalen Phänotyp annehmen. Dieser Prozess konnte auch bereits beim PDAC nachgewiesen werden (Rhim et al. 2012). Im Gegensatz dazu bezeichnet die kollektive Migration die Fortbewegung zusammenhängender Zellverbände, die ihre zelluläre Integrität nicht verlieren. Die Fähigkeit migrationsfähiger Zellpopulationen, sich in kollektiven Zellverbänden zu bewegen, ermöglicht die gleichzeitige Verteilung verschiedener Klone eines Primärtumors mit unterschiedlichen biologischen Fähigkeiten. Die Vorteile dieses Migrationsmodus umfassen somit die Möglichkeit, Apoptose-resistente und selbsterneuerungsfähige Subpopulationen wie die CSCs in verschiedene Gewebe zu transportieren und gleichzeitig einen Schutz vor der immunologischen Antitumorantwort im Körper zu gewährleisten (Friedl und Wolf 2003). Dieser Migrationsmodus wurde auch für das PDAC nachgewiesen (Aiello et al. 2018).

Die Adhäsion wiederum kann entweder zwischen Tumorzellen untereinander oder zwischen Tumorzellen und anderen Zellen des TME bzw. mit der EZM stattfinden (Makrilia et al. 2009). Verschiedene Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine, Cadherine, Selektine und Proteine der Immunglobulin-Superfamilie sind an diesem Prozess beteiligt. Neben ihrer Rolle bei der Aufrechterhaltung des interzellulären Kontakts und der mechanischen Bindung an die EZM sind sie direkt an der Signaltransduktion beteiligt, die das Wachstum, Überleben und die Metastasierung von Tumorzellen fördert (Janiszewska et al. 2020). Die Expression von Cadherinen und Integrinen spielt insbesondere bei der kollektiven Migration und Invasion eine wichtige Rolle, da Adhäsionsproteine die zelluläre Integrität innerhalb kollektiver Zellverbände aufrechterhalten und den Austausch mit dem Tumorstroma ermöglichen (Friedl und Mayor 2017).

Die Rolle von Selektinen und Adhäsionsproteinen aus der Superfamilie der Immunglobuline in diesem Prozess wird kontrovers diskutiert. Während die verminderte Expression dieser Moleküle auf tumorassoziiertem Endothel (TAE) einen effektiven Mechanismus darstellt, das Eindringen von Immunzellen in den Tumor zu verhindern und damit die immunvermittelte Antitumorantwort zu reduzieren, ist eine erhöhte Expression mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial und einer schlechteren Prognose assoziiert (Harjunpää et al. 2019; Nummer et al. 2007). Beispielsweise kann Mucin-1 (MUC-1) mit dem *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) auf TAE interagieren und dadurch die Anheftung von zirkulierenden Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) an die Gefäße ermöglichen, was einen wichtigen Schritt der Metastasierung darstellt (Roland et al. 2007).

1.2.2 Epithelial-Mesenchymale Transition

Die Existenz der EMT in adulten Geweben wurde erstmals Anfang der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts beschrieben (Greenburg und Hay 1982). Die EMT ist ein wichtiger biologischer

Prozess, der es ermöglicht, dass Epithelzellen einen beweglicheren und invasiveren mesenchymalen Phänotyp annehmen (Abbildung 3). Ursprünglich im Zusammenhang mit der Embryogenese entdeckt, spielt dieser Prozess physiologisch auch eine entscheidende Rolle bei der Geweberegeneration und der Fibrosierung von Organen, während seine pathologisch veränderte Aktivität die Karzinogenese und Metastasierung begünstigt (Kalluri und Weinberg 2009).

Die Initiierung der EMT wird durch bestimmte Faktoren wie den transformierenden Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor- β* , TGF- β) oder den epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) ausgelöst (Lindsey und Langhans 2015; Miettinen et al. 1994). Darüber hinaus sind Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und ein hypoxisches Milieu an der EMT-Induktion beteiligt (Chen et al. 2016; Knaack et al. 2018; Sullivan et al. 2009). Diese extrazellulären Faktoren lösen eine Kaskade intrazellulärer Signalwege aus, welche wiederum eine Reihe von Transkriptionsfaktoren (TF) aktivieren. Die wichtigsten EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs) sind Mitglieder der Snail-Familie (SNAI1/Snail und SNAI2/Slug), der *Zinc finger E-box-binding homeobox* (ZEB)-Familie (ZEB1 und ZEB2) und die TF OVO-like-1/OVO-like-2 (OVOL1/2) (Hotz et al. 2007; Krebs et al. 2017; Roca et al. 2013). Darüber hinaus wurden Signalwege, die mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, wie z.B. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B), mit der EMT in Verbindung gebracht (Maier et al. 2010).

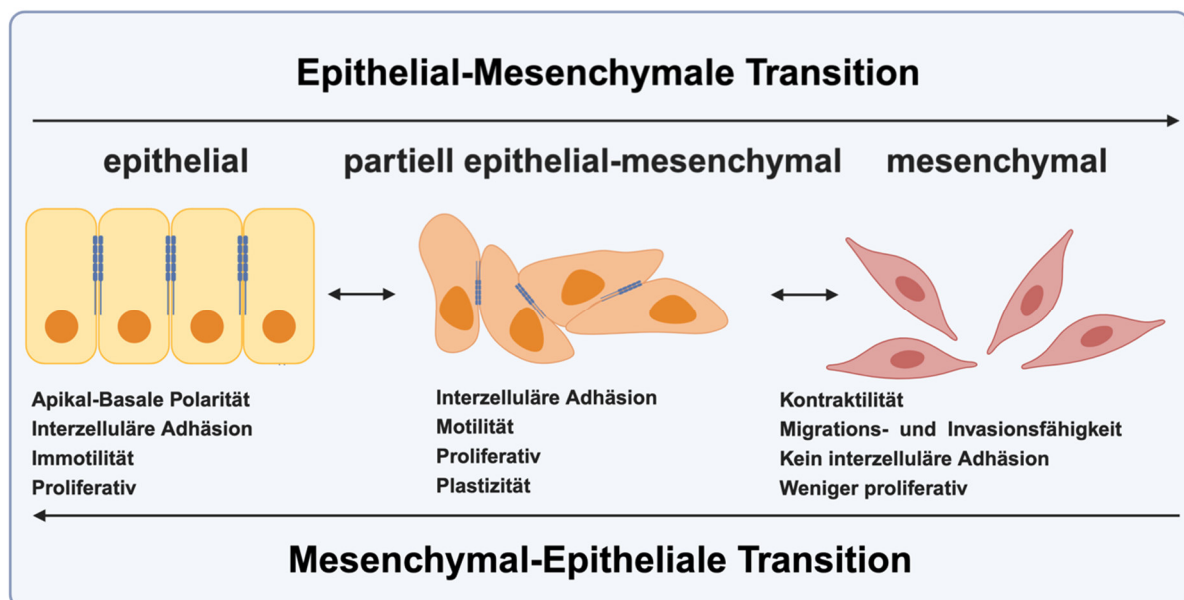


Abbildung 3: Schematische Darstellung der EMT-MET-Achse sowie einiger charakteristischer Eigenschaften der unterschiedlichen Phänotypen. Epitheliale Tumorzellen verlieren im Rahmen der Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) ihre epithelialen Eigenschaften, wie z.B. die apikal-basale Polarität, interzelluläre Zelladhäsion,

Immotilität sowie Proliferationsfähigkeit, und akkumulieren mesenchymale Charakteristika, wie z.B. eine erhöhte Kontraktilität, Migrations- und Invasionsfähigkeit, den Verlust der interzellulären Adhäsivität und eine geringere Proliferationsrate, um einen metastasierungsfähigen Phänotyp anzunehmen. Nach Dissemination in sekundäre Organe werden unter Verlust der mesenchymalen Charakteristika erneut epitheliale Eigenschaften im Sinne einer Mesenchymal-Epithelialen Transition (MET) angenommen. Darüber hinaus existieren Zwischenstufen, die sowohl epitheliale als auch mesenchymale Eigenschaften besitzen. Hergestellt mit Biorender®.

Der epitheliale Marker *epithelial* Cadherin/Cadherin-1 (E-Cadherin) bildet unter physiologischen Bedingungen homodimere Komplexe mit E-Cadherin-Molekülen benachbarter Zellen und sorgt so für die zelluläre Integrität der Epithelien. Darüber hinaus spielt dieses Zelladhäsionsmolekül eine wichtige Rolle bei der Kontaktinhibition der Zellproliferation, der Hemmung der Zellmotilität und der Etablierung der apikal-basalen Polarität, drei wichtigen Eigenschaften von Epithelgeweben (Mendonsa et al. 2018; Nelson et al. 2013). Während der EMT ist das Herunterregulieren des E-Cadherin-Gens ein charakteristisches Ereignis. Der Verlust von E-Cadherin führt zur Auflösung der dichten Epithelschichten, zu erhöhter Zellmotilität und zur Entwicklung von Metastasen (Sommariva und Gagliano 2020).

Mesenchymale Markerproteine wie *Neural-Cadherin* (N-Cadherin), Vimentin, Kollagen Typ I, *L1 cell adhesion molecule* (L1CAM) und *Alpha Smooth-Muscle-Actin* (α -SMA) werden hingegen vermehrt exprimiert (Dongre und Weinberg 2018; Kiefel et al. 2012b; Sommariva und Gagliano 2020).

N-Cadherin gehört wie auch E-Cadherin zu den klassischen Typ-I-Cadherinen, wird jedoch im Gegensatz zu E-Cadherin nicht nur in epithelialen Geweben exprimiert. Im neuronalen Gewebe spielt N-Cadherin eine wichtige Funktion im Rahmen der Embryogenese, hält die zelluläre Integrität aufrecht und reguliert die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen. Die pathologische Expression von N-Cadherin in Tumorzellen geht mit einer verstärkten Karzinogenese einher (Loh et al. 2019).

Vimentin stellt als Intermediärfilament einen Bestandteil des Zytoskeletts dar und wird während der Zellmigration reorganisiert, was Veränderungen der Zellform ermöglicht und die Beweglichkeit der Zellen erleichtert (Satelli und Li 2011).

Das Zelladhäsionsmolekül L1CAM ist ebenfalls während der Embryonalentwicklung im Nervensystem von Relevanz. Während L1CAM in neuronalen Zellen die interzelluläre Adhäsion aufrechterhält und die intrazelluläre Signaltransduktion fördert, führt die Expression von L1CAM in Malignomen zu einem aggressiven und motilen Phänotyp, welcher die Metastasierungsrate erhöht (Kiefel et al. 2012a). Beim PDAC führt die Expression von L1CAM

neben einer verstärkten Migrations- und Invasionsfähigkeit auch zur Apoptoseresistenz. Dabei lässt sich die Expression von L1CAM bereits in Vorläuferläsionen im Rahmen einer chronischen Pankreatitis nachweisen (Geismann et al. 2009). In weiterführenden Experimenten konnte zudem demonstriert werden, dass eine TME-vermittelte proinflammatorische Signalkaskade die Expression von L1CAM nicht nur in PDAC-Zellen, sondern auch in TAE steigert (Goebel et al. 2015; Issa et al. 2009; Kiefel et al. 2012b). Diese Beobachtungen erklären möglicherweise die frühe Dissemination der malignen PDAC-Zellen in den Kreislauf und die hohe Metastasierungsrate des PDAC.

Hinweise für die Existenz der EMT beim PDAC wurden bereits früh beschrieben. In einer Studie aus dem Jahr 2004 konnte in Lebermetastasen eines PDAC die Erniedrigung der Expression von E-Cadherin sowie eine Erhöhung der Expression der mesenchymalen Proteine N-Cadherin und Vimentin nachgewiesen werden (Nakajima et al. 2004). In einer weiteren Studie konnte die Arbeitsgruppe um Bergmann et al. zeigen, dass die Expression des mesenchymalen Markers L1CAM nicht nur in Gewebeproben von Patienten mit einem PDAC, sondern auch bereits in Vorläuferläsionen gesteigert ist. Gleichzeitig verzeichneten alle untersuchten Lebermetastasen eine Expression von L1CAM, was ebenfalls auf die Existenz einer EMT beim metastasierten PDAC hinweist (Bergmann et al. 2010).

In Anbetracht der Tatsache, dass jedoch auch epitheliale Tumorzellen zur Metastasierung fähig sind und zudem die Proliferationsrate von beweglichen Zellphänotypen typischerweise geringer ist, konnte die EMT nicht als alleinige Erklärung für die Formation von Metastasen angesehen werden (Joshi et al. 2023). Im Rahmen der Krebsforschung wurde daher der Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) postuliert, bei dem die mesenchymalen Eigenschaften in Sekundärorganen wieder verloren gehen und epitheliale Charakteristika wiedererlangt werden. Dies erlaubt in späteren Tumorstadien die erfolgreiche Manifestation von Kolonien in sekundären Organen sowie die Wiederherstellung einer zellulären Integrität, was somit den finalen Schritt der Metastasierungskaskade darstellt (Dongre und Weinberg 2018). Obwohl es schwierig ist, den Prozess der MET in experimentellen Studien nachzuweisen, konnte die Arbeitsgruppe um Roca et al. zeigen, dass die TF OVOL1 und OVOL2 MET-ähnliche Veränderungen in Tumorzellen des Prostata- und Mammakarzinoms induzierten. Diese Veränderungen waren nicht nur auf zellulärer, sondern auch auf funktioneller Ebene nachweisbar. In *in vivo* Experimenten zeigte sich aber, dass neben Zellen mit MET-assoziiertem epithelialem Phänotyp auch EMT-assoziierte mesenchymale Tumorzellen Metastasen bilden konnten (Roca et al. 2013).

Die genannten Studien verdeutlichen, dass die Beziehung zwischen EMT und MET komplex ist und nicht einfach als dichotome Achse mit zwei gegensätzlichen Polen betrachtet werden kann. Es mehren sich Hinweise für die Existenz von hybriden Phänotypen innerhalb dieser Achse, die mit einer höheren zellulären Plastizität assoziiert sind. Diese hybriden Stadien

werden auch als partielle EMT (E/M) bezeichnet (Dongre und Weinberg 2018). Dieser intermediäre Zustand verleiht Tumorzellen möglicherweise die Fähigkeit, ihr Metastasierungspotenzial zu maximieren und sich besser an verändernde Umgebungsbedingungen anpassen zu können (Jolly et al. 2019). Die Existenz dieses E/M-Phänotyps wurde nicht nur im PDAC selbst, sondern auch bereits in Vorläuferläsionen nachgewiesen. In einer Studie der Arbeitsgruppe von Rhim et al. konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass pankreatische Vorläuferzellen bereits vor dem Nachweis des Primärtumors eine EMT durchlaufen und in der Zirkulation sowie in der Leber nachweisbar sind. Dabei exprimierten ein Teil dieser Zellen neben dem EMT-TF Zeb1 auch den epithelialen Marker *epithelial cell adhesion molecule* (EpCAM), was auf die Existenz eines E/M-Phänotyps beim PDAC hinweist (Rhim et al. 2012). Gestützt werden diese Ergebnisse zudem durch die genetische Sequenzierung von >51000 Zellen von 27 Patienten mit primären PDAC. Hier konnten 51 Tumorzellverbände innerhalb der EMT-MET-Achse nachgewiesen werden, von denen wiederum ca. 40% als E/M-assoziiert definiert werden konnten (Carstens et al. 2021). Somit bleibt der Zusammenhang zwischen EMT, MET und der Metastasierung uneindeutig und bedarf weiterer Forschung, um in Zukunft zielgerichtete Therapiestrategien gegen die unterschiedlichen Zellpopulationen und ihre Metastasierungstendenz zu entwickeln. Zusätzlich zu den oben genannten Eigenschaften werden EMT und MET mit dem Erwerb bzw. Verlust von Stammzeleigenschaften in Verbindung gebracht (Dongre und Weinberg 2018).

1.2.3 Krebsstammzellen

Stammzellen sind physiologisch in der Lage, sich selbst zu erneuern und sich zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren. Die symmetrische Teilung bedingt die Entstehung von zwei neuen Stammzellen und somit die Selbsterneuerung des Stammzellvorrats. Die asymmetrische Teilung hingegen fördert neben der Bildung von Vorläuferzellen auch die Entstehung unterschiedlicher Gewebetypen, sodass eine zelluläre Homöostase in differenzierten Geweben aufrechterhalten wird (Aponte und Caicedo 2017). CSCs hingegen stellen eine kleine Population von Tumorzellen innerhalb eines Tumors dar, die über dieselben Fähigkeiten wie die physiologischen Stammzellpopulationen verfügen und zur Entstehung, Progression und zum Wiederauftreten von Tumoren nach einer Therapie beitragen. Aufgrund ihrer langsamen Zellteilungsrate sind sie gegenüber klassischen Zytostatika resistent und werden zusammen mit ihrer Tumorinitiierungskapazität als Auslöser der Metastasen- und Rezidivbildung gesehen (Clarke et al. 2006; Ishiwata et al. 2018). Bereits im Jahr 2007 konnte die Existenz von PDAC-Zellen mit Stammzeleigenschaften nachgewiesen werden (Hermann et al. 2007; C. Li et al. 2007). Im weiteren Verlauf der Forschung wurde festgestellt, dass verschiedene Moleküle und Signalwege mit dem

Stammzellphänotyp des PDAC assoziiert sind. Unter den Molekülen, die beim PDAC mit CSC-Eigenschaften assoziiert werden, finden sich die Zelloberflächenantigene *Cluster of Differentiation* (CD) 133, 24 und 44, welche bereits bei anderen Malignomen als CSC-Marker identifiziert wurden (Hermann et al. 2007; C. Li et al. 2007; Olempska et al. 2007).

Weitere im Laufe der Zeit identifizierte CSC-Marker sind der C-X-C-Chemokin-Rezeptor Typ 4 (CXCR4) sowie das *ATP-binding-cassette-G2*-(ABCG2)-Molekül. CXCR4 ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor, der an der Chemotaxis und Signaltransduktion von Immunzellen beteiligt ist. Darüber hinaus kann er über seinen Liganden, den *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1), das Migrationsverhalten von Zellen beeinflussen. Der Nachweis dieses Rezeptors erfolgte auf CD133-positiven Zellen an der Invasionsfront von PDAC. In nachfolgenden *in vivo* Experimenten konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass lediglich Zellen mit einer Co-Expression von CD133 und CXCR4 im Blutkreislauf nachweisbar waren und zur hepatischen Metastasierung führten. In klinischen Untersuchungen konnte eine Korrelation zwischen der CD133- und CXCR4-Positivität bei PDAC-Patienten und einer fortgeschrittenen metastatischen Erkrankung festgestellt werden (Hermann et al. 2007).

Das ABCG2-Molekül ist aufgrund seiner Rolle bei der Arzneimittelresistenz von großer Relevanz. Es kann therapeutische Wirkstoffe aus den Zellen herausschleusen und dadurch wesentlich zur Multiresistenz bei malignen Tumorerkrankungen beitragen (Mo und Zhang 2012). Die Existenz des Moleküls wurde bereits beim PDAC nachgewiesen und ist vermutlich mit der Resistenz von CSCs gegenüber Chemotherapeutika assoziiert (Olempska et al. 2007; Wang et al. 2009).

Nestin, ein Klasse VI-Intermediärfilament, wurde in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen des Zentralnervensystems entdeckt. Es unterstützt die Gewebestabilität und ist in verschiedenen embryonalen Vorläuferzellen sowie in reaktiven Zellen nach Gewebeschäden zu finden (Neradil und Veselska 2015). In Tumoren, die aus undifferenzierten Vorläuferzellen entstehen, wird Nestin stark exprimiert und mit Stammzeleigenschaften verknüpft (Carrière et al. 2007). Beim PDAC beeinflusst Nestin die Zellmobilität und EMT-Eigenschaften. Eine Reduktion der Nestin-Expression verringert Tumorfrequenz, das Tumolvolumen und die Metastasenbildung (Matsuda et al. 2014).

Neben den genannten Molekülen sind auch eine Reihe von TF für CSCs von Bedeutung, darunter beispielsweise *sex determining region Y (SRY)-box 2* (Sox2), *Octamer-binding transcription factor 4* (Oct4) und Nanog. Diese TF sind allesamt auch mit der EMT assoziiert und unterstreichen das Zusammenspiel der EMT und CSCs (Du et al. 2011; Herreros-Villanueva et al. 2013; Lu et al. 2013). Die Arbeitsgruppe um Herreros-Villanueva konnte beispielsweise zeigen, dass Sox2 eine Dedifferenzierung und EMT-ähnliche Veränderungen in PDAC-Zellen hervorruft (Herreros-Villanueva et al. 2013). In der Studie von Shah et al. konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass in Gemcitabin-resistenten PDAC-Zellen eine

phänotypische und funktionelle Veränderung im Sinne einer EMT stattfindet. Die Analyse der CSC-Marker ergab, dass ein hoher Anteil der Zellen im Zuge dieser Transition auch die CSC-Marker CD24 und CD44 exprimierten (Shah et al. 2007). In einer anderen Studie wurde die Rolle des EMT-TF Zeb1 bei der Metastasierung des PDAC untersucht. Genetisch veränderte Mäuse, die neben einer KRAS und p53-Mutation eine Deletion von Zeb1 aufwiesen, entwickelten zwar PDAC, die hinsichtlich der Größe den Tumoren der Kontrollgruppe mit Zeb1-Expression ähnelten, jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Differenzierung zeigten. Zeb1-depletierte Tumoren wiesen dabei eine bessere Differenzierung und einen epithelialeren Phänotyp im Vergleich zu Tumoren mit Zeb1-Expression auf. Die Depletion von Zeb1 resultierte zudem in einer reduzierten lokalen Tumordinvasion und einer verminderten Metastasenbildung. Nach intravenöser Injektion waren Zeb1-depletierte Tumorzellen kaum noch in der Lage, die Lunge zu besiedeln. Gleichzeitig wiesen Zeb1-depletierte Zellen eine deutliche Verringerung hinsichtlich der Tumorinitiierungskapazität auf und waren kaum in der Lage, Sphäroide zu bilden – zwei Eigenschaften, die mit CSCs assoziiert werden. Auch nach Stimulation mit TGF- β konnte im Vergleich zu Kontrollsphäroiden keine EMT festgestellt werden. Diese Studie bekräftigt somit die These, dass die Aktivierung der EMT mit CSC-Eigenschaften verknüpft ist und beide Prozesse eine wichtige Rolle im Rahmen der Metastasierung spielen (Krebs et al. 2017).

In der Zusammenschau der oben genannten Studien lassen sich somit eindeutige Hinweise darauf finden, dass EMT-assoziierte Faktoren beim PDAC mit CSC-Eigenschaften verknüpft sind. Die gegenseitige Verstärkung resultiert in einer Population von PDAC-Zellen mit erhöhtem Invasionspotenzial, Metastasierungsrate und Therapieresistenz. Diese Korrelation zwischen EMT und CSC und einer erhöhten Metastasierungsrate wurde bereits in einigen klinischen Studien belegt (Hermann et al. 2007; Rasheed et al. 2010; Zhang und Xu 2022).

Allerdings existieren auch kontroverse Studienergebnisse, die die Notwendigkeit einer Aktivierung der EMT für die Erlangung eines CSC-Phänotyps infrage stellen. Die Arbeit von Liu et al. konnte beim Mammakarzinom die Existenz zweier phänotypischer CSC-Zustände nachweisen, eines epithelialen und eines mesenchymalen Phänotyps. Beide Phänotypen führten gleichermaßen zur Tumorinitiation im Mausmodell (Liu et al. 2014). In unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls die Existenz verschiedener CSC-Phänotypen beim PDAC nachgewiesen werden (Philipp 2023). Die Panc1-Zelllinie wurde als mesenchymal charakterisiert. Die mesenchymalen und EMT-assoziierten Marker Vimentin, L1CAM, und Zeb1 werden in dieser Zelllinie vermehrt exprimiert, während die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin gering bis gar nicht vorhanden ist. Durch Einzelzell-Klonierung konnten Zellvarianten dieser Zelllinie generiert werden, welche unterschiedliche CSC-Eigenschaften aufweisen. Die CSC-Population (sog. Holoklone) zeigt neben einem mesenchymalen Phänotyp eine Expression des Stammzellmarkers Nestin. Somit konnte gezeigt werden, dass

die EMT beim PDAC mit einem Stammzellphänotyp vergesellschaftet ist. Die Zellvariante ohne CSC-Eigenschaften (sog. Paraklone), die ebenfalls durch Einzelzell-Klonierung generiert wurde, wurde auch als mesenchymal charakterisiert, zeigte jedoch eine deutlich niedrigere Nestin-Expression.

Die Panc89-Zelllinie wurde dagegen als epithelial charakterisiert und es wurden auch von dieser Zelllinie durch Einzelzell-Klonierung Holo- und Paraklonzellvarianten isoliert. Neben der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin zeigen die parentalen Panc89-Zellen sowie die Panc89-Paraklonzellen zusätzlich die Expression des mesenchymalen Markers L1CAM. Die CSC-assoziierten Panc89-Holoklonzellen weisen als Stammzell-Marker Sox2 auf, während der CSC-Marker OVOL2 vermehrt in den Panc89-Paraklonzellen und in der parentalen Panc89-Population nachzuweisen ist. Somit lässt sich anhand der Charakterisierung der epithelialen Panc89-Zellvarianten zeigen, dass die Expression von CSC-Markern nicht zwingend mit einer EMT einhergehen muss, sondern auch mit einem epithelialen bzw. E/M-Phänotyp assoziiert sein kann. Insgesamt deuten diese Ergebnisse also auf eine Heterogenität innerhalb der untersuchten PDAC-Zellen hin, welche mit unterschiedlichen EMT/CSC-Phänotypen einhergehen (Philipp et al. 2024).

Insgesamt unterstützen diese Daten somit die Hypothese, dass hinsichtlich der CSC-Ausprägung ebenfalls keine dichotome Einteilung in Bezug auf epitheliale oder mesenchymale Eigenschaften existiert. Es liegt nahe, dass maligne Tumorzellen auch in Hinblick auf ihre Stammzellfunktion eine Plastizität besitzen, die ihre Heterogenität und divergente Funktion erklärt (Jolly et al. 2015). Diese Plastizität der Tumorzellen zu adressieren und die genauen Interaktionen zwischen verschiedenen Tumorzellpopulationen in Abhängigkeit ihres EMT-/MET-/CSC-Status zu definieren, könnte in Zukunft die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien ermöglichen.

1.3 Zielsetzung

Andere Studien unserer Arbeitsgruppe haben bereits Hinweise auf das komplexe Zusammenspiel von EMT- und CSC-Eigenschaften und deren funktionelle Auswirkungen beim PDAC aufgezeigt (Knaack et al. 2018; Philipp 2023; Rahn et al. 2018). Im Rahmen dieser Studien wurden aus zwei PDAC-Zelllinien (Panc1 und Panc89) durch Einzelzell-Klonierung Zellklone mit CSC-Eigenschaften (Holoklonzellen) und Nicht-CSC-Eigenschaften (Paraklonzellen) generiert (siehe Abschnitt 1.2.3).

Basierend auf diesen Befunden wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht, inwiefern sich die verschiedenen CSC- und Nicht-CSC-Populationen beider PDAC-Zelllinien hinsichtlich ihres Migrations- und Adhäsionsverhaltens an Lungenendothelzellen unterscheiden. Dazu

wurde das Migrationsverhalten mittels eines Migrationsassays sowie das Adhäsionsverhalten an Lungenendothelzellen durch einen Adhäsionsassay untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, den Einfluss von EMT- und CSC-Eigenschaften auf das Metastasierungspotenzial des PDAC besser zu verstehen. Die Ergebnisse könnten neue Erkenntnisse über die biologischen Grundlagen der Metastasierung des PDAC liefern und somit als Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien dienen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Zentrifugen

Zentrifuge

Heraeus Biofuge pico

Heraeus Fresco 17

Heraeus Multifuge 3-S-R

Heraeus Multifuge 3 S-R

Heraeus Pico 17

Rotina 420 R

Sprout® mini Zentrifuge

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Hettingen, Tuttlingen, DE

Heathrow Scientific, Vernon Hills, US

2.1.1.2 Inkubatoren

Inkubator

BBD 6220 CO₂ Inkubator

GyroTwister 3D Schüttler

HERA Cell 240 Inkubator

QBA1 Tischinkubator

Stuart SRT9 Rollenmischer

WNB 7-45 Wasserbad

WTC ED-53 Inkubator

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Labnet, Woodbridge, US

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Grant, Cambridge, UK

Bibby Scientific Ltd., Stone, UK

Memmert, Schwabach, DE

Binder, Tuttlingen, DE

2.1.1.3 Messgeräte

Messgerät

Infinite® 200 Pro, Mikroplatten-Reader

LightCycler® 480 II

NanoQuant Platte

Neubauer Zählkammer

Hersteller

Tecan, Crailsheim, DE

Roche, Basel, CH

Tecan, Crailsheim, DE

Marienfeld, Lauda-Koenigshofen, DE

2.1.1.4 Mikroskope

Mikroskop

AE2000

CELLAVISTA® Scientific

Evos XL Core Cell Imaging System

LionHeart FX

NYONE® Scientific

Hersteller

Motic, Wetzlar, DE

Synentec, Elmshorn, DE

AMG, Bothel, US

BioTek, Bad Friedrichshall, DE

Synentec, Elmshorn, DE

2.1.1.5 Pipetten

Pipette

Finnpipette F1 0.2-2 µl

Finnpipette F1 1-10 µl

Finnpipette F1 2-20 µl

Finnpipette F1 20-200 µl

Finnpipette F1 100-1000 µl

Macro pipette controller

Pipetboy-acu

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Brand, Wertheim, DE

Integra Biosciences, Fernwald, DE

2.1.1.6 Sterilwerkbänke

Sterilwerkbank

HERA Safe

HERA Safe KS

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.1.1.7 Waagen

Waage

Precisa BJ-2100D

Precisa XB 120A

Hersteller

Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

2.1.1.8 Weitere Geräte

Gerät

ARPEGE 110 Stickstofftank

CS-300V Power supply

Gefrierschrank (-20 °C)

HERAfreeze Basic freezer

Kühlschrank (4 °C)

Hersteller

AirLiquide, Paris, FR

Cleaver Scientific, West Sussex, UK

Liebherr, Ochsenhausen, DE

Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Liebherr, Ochsenhausen, DE

Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, DE
MILLI-Q Reagent Water System	Merck Millipore, Billerica, US
Sunrise remote control	Tecan, Crailsheim, DE
VORTEX GENIUS 3 Vortex-Mischer	IKA-Werke, Staufen, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
1,25 ml, 5,0 ml Ritips	Ritter, Schwabmünchen, DE
1,5 ml, 2 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
15 ml, 50 ml Zentrifugengefäße	Sarstedt, Nümbrecht, DE
5 ml, 10 ml, 50 ml Serumpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
6-/12-/24-/96-Well Platten, Flachboden	Sarstedt, Nümbrecht, DE
24-Well Platten, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
96-Well Platten, Flachboden	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
CryoPure tube, 1,0 ml, weiß	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Ibidi®-Zellkultureinsatz 2 Well	ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
Micro-Touch Nitril-Handschuhe	Ansell, München, DE
Parafilm M	Brand, Wertheim, DE
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen T-25, Cell+, 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen T-75 Cell+, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
AEC substrate Kit AB64252	Abcam B.V., Amsterdam, NL
Bovines Serumalbumin (BSA), fraction V	Biomol, Hamburg, DE
CellTracker™ Deep Red Farbstoff	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
CellTracker™ Green 5-	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Chloromethylfluorescein (CMFDA) Farbstoff	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Ethanol 99%, vollvergällt	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Ethanol, reinst	Merck Millipore, Darmstadt, DE

Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, München, DE
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, CH
Methanol	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE
Paraformaldehyd (PFA) 4,5 % (w/v)	BUEFA Chemikalien GmbH Co. KG, Hude, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Pasching, AT
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	PAA, Pasching, AT

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Zelllinien

Zelle

Panc1

Panc1 Holoklonzellen

Panc1 Paraklonzellen

(T3M4) Panc89

Panc89 Holoklonzellen

Panc89 Paraklonzellen

Hersteller

Humane PDAC-Zelllinie, welche aus einem Adenokarzinom im Pankreaskopf isoliert wurde. Die Zellen wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

PDAC-Zellvariante, welche aus der Panc1-Zelllinie mittels *Single Cell Cloning* generiert wurde (Philipp 2019).

PDAC-Zellvariante, welche aus der Panc1-Zelllinie mittels *Single Cell Cloning* generiert wurde (Philipp 2019).

Humane PDAC-Zelllinie, welche aus einer Lymphknotenmetastase eines PDAC isoliert wurde. Die Zellen wurden zur Verfügung gestellt von K. Keiichi (Kyoto Prefectural University of Medicine, JPN).

PDAC-Zellvariante, welche aus der Panc89-Zelllinie mittels *Single Cell Cloning* generiert wurde (Philipp 2019).

PDAC-Zellvariante, welche aus der Panc89-Zelllinie mittels *Single Cell Cloning* generiert wurde (Philipp 2019).

Human Lung Endothelial Cell (HuLEC)-5a Humane, immortalisierte Endothelzelllinie aus der Lunge eines männlichen Patienten. Die Zellen wurden von der ATCC bezogen.

2.1.4.2 Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenz	Hersteller
Epidermaler Wachstums-Faktor	Life Technologies, San Francisco, US
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin, DE
Dulbecco's PBS	Biochrom, Berlin, DE
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom, Berlin, DE
Hydrocortison	Pan Biotech, Aidenbach, DE
L-Glutamin	PAA, Pasching, AT
<i>Modified Coon's Dulbecco's Basal</i> (MCDB)- 131 Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin, DE
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, DE
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI 1640) Zellkulturmedium	Biochrom, Berlin, DE

2.1.4.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Panc Medium	RPMI 1640 10% (v/v) FCS 1% (v/v) Natriumpyruvat 1% (v/v) L-Glutamin
Migrationsmedium	RPMI 1640 1% (v/v) Natriumpyruvat 1% (v/v) L-Glutamin
HuLEC-5a Medium	MCDB 131 10% (v/v) FCS 1% (v/v) L-Glutamin 1 µg/mL Hydrocortison 10 ng/mL EGF

2.1.5 Antikörper

Antigen	Spezies (Isotyp)	Endkonzentration	Hersteller
E-Cadherin	Maus (IgG1)	28 µg/ml	Cell Signaling technologies, Danvers, US
L1CAM	Maus (IgG1)	10 µg/ml	Gerd Moldenhauer, Cancer Research Center Heidelberg, DE
Sox2	Hase (IgG)	25 µg/ml	Cell signaling technologies, Danvers, US
Sekundärreagenz	Spezies (Isotyp)	Endkonzentration	Hersteller
(Alexa Fluor 488) Anti-Maus IgG	Ziege	4 µg/ml	Life technologies, San Fransisco, US
(Alexa Fluor 647) Anti-Hase IgG	Ziege	2 µg/ml	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
DAKO REAL™ EnVision™ Rabbit/Mouse (K5007)	REAL™ HRP Anti-Maus-/Anti-Kaninchen- Immunglobulin	Biotinyliertes Ziegen- Keine Angabe	DAKO Agilent, SantaClara, US

2.1.6 Software

Software	Hersteller
Gen5	Agilent Technologies, Santa Clara, US
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, US
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim, DE
LightCycler480 Software	Roche, Basel, CH
Mendeley Desktop 1.17.10	Mendeley Ltd. London, UK
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, US
YT-Software	Synentec, Elmshorn, DE

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von PDAC-Zellen und humanen Lungenendothelzellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, welche eine Werkbank mit geeigneten Schutzvorkehrungen, sterile Reagenzien und Geräte umfasste. Alle kultivierten Zellen wurden regelmäßig auf das Vorhandensein von Mykoplasmen getestet, die während der gesamten Versuchszeit nicht nachgewiesen werden konnten.

Für die Kultivierung der Zellen wurde zunächst die Zellkonfluenz geprüft. Wenn in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von etwa 80 % zu beobachten war, wurde das Zellkulturmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Anschließend wurde der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden 5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen für 10-15 Minuten im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Aktivität des Trypsins wurde dann durch Zugabe von 5 ml Medium der jeweiligen Zellvariante gestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Nach dem Abtrennen des Überstands wurde das Zellpellet in 10 ml neues Panc-Medium bzw. HuLEC-5a Medium resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Anzahl der pro Kammer gezählten Zellen wurde jeweils durch die Anzahl der gezählten Kammerquadrate dividiert und mit 10⁴ multipliziert. Die so errechnete Menge entsprach der Zellzahl pro ml.

Die Zellen wurde dann nach entsprechender Verdünnung für weitere Experimente ausgesät oder in 10 ml neuem Medium in T75-Zellkulturflaschen kultiviert.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren und die langfristige Lagerung wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen unter Verwendung von Trypsin-EDTA abgelöst (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml FCS mit 10 % DMSO suspendiert und in ein Kryo-Gefäß übertragen. Dieses Kryo-Gefäß wurde dann in einem Kryo-Karussell platziert und für mindestens 24 Stunden bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Für eine Langzeitlagerung wurden die Kryo-Gefäße in einen Flüssig-Stickstofftank bei -196 °C überführt.

Für das Auftauen der Zellen wurden zunächst 5 ml Zellkulturmedium, das zuvor auf etwa 37 °C erwärmt wurde, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die eingefrorenen Zellen wurden rasch mit dem vorgewärmten Medium resuspendiert, anschließend bei 300 x g

zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 3 ml des entsprechenden Zellkulturmediums aufgenommen und auf drei Zellkulturflaschen verteilt. Dabei wurde jeweils 1 ml des Zellkulturmediums mit den aufgetauten Zellen in 9 ml neues Medium überführt.

2.2.1.3 Generierung von konditionierten Medien

Um konditionierte Medien (KM) der PDAC-Zellvarianten zu erzeugen, wurden zunächst $2,5 \times 10^5$ PDAC-Zellen pro Well in einer 12-Well-Platte ausgesät. Die Tumorzellen wurden zuvor aus den Zellkulturflaschen abgelöst, zentrifugiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Die berechnete Zellzahl wurde dann in das Well einer 12-Well-Platte gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde das Panc-Medium aus den Wells entfernt und durch 1 ml frisches Panc-Medium ersetzt.

Nach weiteren 48 Stunden wurde der Überstand aus den Wells unter sterilen Bedingungen in ein 2 ml Eppendorfgefäß übertragen und bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand aus dem 2 ml Eppendorfgefäß in ein weiteres 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Dieser Überstand entsprach den KM und wurde entweder direkt für die Versuche verwendet oder bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.1.4 Zellmarkierungen mit dem CellTracker™ Green CMFDA und DeepRed

Um Zellpopulationen während des Migrationsassays unterscheiden zu können und die Adhäsion von Tumorzellen an Lungenendothelzellen zu demonstrieren, erfolgte eine Zellmarkierung mittels Fluoreszenzfarbstoffen der untersuchten Zellvarianten vor dem Start der Experimente. Dafür wurden die Zellen zunächst wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben aus den Zellkulturflaschen abgelöst. Vor dem Zählen in der Neubauer-Zählkammer wurden sie in FCS-freiem Panc-Medium aufgenommen. Die erforderliche Zellzahl für die Färbung mit dem CellTracker™ Green CMFDA sowie dem CellTracker™ DeepRed wurde berechnet. Pro 5×10^5 Zellen in 1 ml FCS-freiem Panc-Medium wurden 0,5 µl des jeweiligen CellTracker™ verwendet. Die gefärbten Zellen wurden anschließend für 30 Minuten bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer T25-Zellkulturflasche auf einem Laborschüttler bei einer Geschwindigkeit von 1,75 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen durch Resuspendieren in FCS-freiem Panc-Medium aus den T25-Zellkulturflaschen abgelöst.

Anschließend wurden die gefärbten Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde dann in FCS-

haltigem Panc-Medium aufgenommen und für die Aussaat des jeweiligen Versuches in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.2 Migrationsassay

Der Migrationsassay erfolgte mittels eines *Woundhealing Assays*. Hierfür wird in einem Zellrasen eine Wunde generiert, die dann durch die Migration der Zellen geschlossen wird. In dieser Arbeit wurden für die standardisierte Generierung der Wunde Ibidi®-Zellkultureinsätze verwendet.

Ibidi®-Zellkultureinsätze sind spezielle Kultureinsätze aus Silikon, die für Migrations- und Co-Kulturversuche verwendet werden. Jeder Einsatz hat zwei Kammern, die durch eine Trennwand voneinander getrennt sind, so dass zwei gleiche oder auch verschiedene Zelltypen in unmittelbarer Nähe, aber ohne physischen Kontakt kultiviert werden können. Der Spalt zwischen den beiden Zellrasen beträgt standardisiert 500 µm +/- 100 µm.

Die Ibidi®-Zellkultureinsätze wurde für etwa 30 Minuten in einem Trockenschrank bei 37 °C erwärmt und anschließend mittig in ein Well einer 24-Well-Platte mit einer Pinzette platziert. Die PDAC-Zellen wurden aus der Zellkulturflasche mit Trypsin-EDTA abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Pro Kavität der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurden 5×10^4 Zellen in 75 bis 100 µl Panc-Medium ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Wells jeweils mit 1 ml PBS befüllt, die Platte wurde gleichmäßig geschwenkt und die Einsätze wurden aus den Wells entfernt. Das PBS wurde dann mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Wells wurden mit 1 ml des Migrationsmediums befüllt.

Die Migration der PDAC-Zellen wurde je nach Versuchsaufbau über einen Zeitraum von entweder 24 Stunden oder 32 Stunden gemessen. Dabei wurden alle acht Stunden Momentaufnahmen des Zwischenraums zwischen den Kavitäten der Ibidi®-Zellkultureinsätze mit einem automatisierten Mikroskop (NYONE® bzw. CELLAVISTA®) erstellt. In der Zeit zwischen den einzelnen Messungen wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relative Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die erste Messung erfolgte direkt nach dem Entfernen des Einsatzes. Die *Woundhealing*-Operatoren fanden automatisiert den Spalt und analysierten in dieser und den folgenden Messungen den Anteil der Spaltfläche, der von Zellen bedeckt war (*Confluence on gap*). Es war notwendig, den Rand des Spalts bei der ersten Messung mit einzubeziehen, um einen Ausgangswert zu generieren. Zum Zeitpunkt 0 Stunden betrug die Konfluenz im Spalt in allen Versuchen zwischen 5 und 20 % (Abbildung 4). Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde dieser Rand nicht von der Gesamtkonfluenz abgezogen.

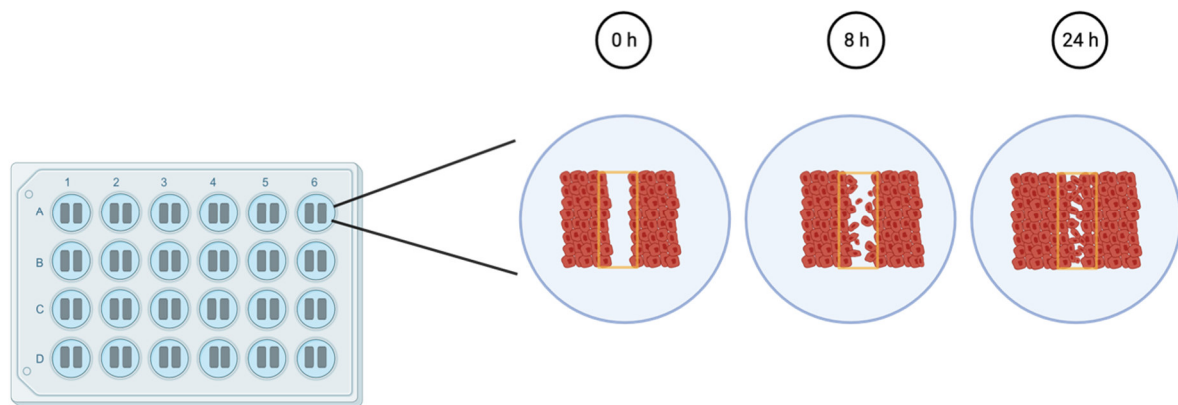


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Migrationsassays nach Aussaat der PDAC-Zellen in die Kavitäten der Ibidi®-Zellkultureinsätze. Die PDAC-Zellen wurden in beide Kavitäten eines Ibidi®-Zellkultureinsatzes ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Einsätze entfernt und es erfolgte die Messung der Konfluenz im Spalt (gelbe Markierung). Zu jedem Messzeitpunkt (0 h, 8 h, 16 h, 24 h, 32 h) wurde der gleiche Bereich erneut gemessen, sodass anhand der Veränderungen der Prozentsatz der migrierten Zellen bestimmt werden konnte. Hergestellt mit Biorender®.

2.2.2.1 Migrationsassay mit konditionierten PDAC-Zellvarianten

Um eine mögliche Beeinflussung der unterschiedlichen PDAC-Zellvarianten durch lösliche Faktoren zu untersuchen, erfolgte die Durchführung eines Migrationsassays nach Inkubation der Tumorzellen in KM. Dafür wurde zunächst das KM der jeweiligen Zellvariante generiert (siehe Abschnitt 2.2.1.3).

Die Vorbereitung der 24-Well-Platte und die Aussaat der PDAC-Zellen in die Ibidi®-Zellkultureinsätze wurden gemäß Abschnitt 2.2.2 durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit wurde das Medium in den Kavitäten der Ibidi®-Zellkultureinsätze mit einer Pipette entfernt und durch KM ersetzt.

Anschließend wurde die 24-Well-Platte für weitere 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Wells wurden dann erneut mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde 1 ml des Migrationsmediums hinzugefügt und die Zellkonfluenz im Spalt über einen Zeitraum von 32 Stunden am NYONE®/CELLAVISTA® gemessen (siehe Abschnitt 2.2.2).

2.2.2.2 Migrationsassay mit Fluoreszenz-markierten PDAC-Zellvarianten

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Panc89-Zellen unter dem Einfluss parakriner Mechanismen der verschiedenen Klone wurden die Kavitäten der Ibidi®-Zellkultureinsätze mit den unterschiedlichen Zellpopulationen befüllt. Der gesamte Versuchsaufbau, einschließlich

der Zellmarkierung und der Zellzählung, wurde gemäß Abschnitt 2.2.1.4 und 2.2.2 durchgeführt.

Bei der Aussaat der Fluoreszenz-markierten Zellen wurden die eine Kavität mit Panc89-Paraklonzellen (CellTracker™ DeepRed) und die andere Kavität mit Panc89-Holoklonzellen (CellTracker™ Green CMFDA) befüllt. Dadurch wurde ermöglicht, dass das Migrationsverhalten beider Zellpopulationen eindeutig verfolgt werden konnte. Die Zellmigration wurde mittels des NYONE®-Mikroskops über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert (siehe Abschnitt 2.2.2).

Um den Einfluss der direkten Interaktion von den verschiedenen Panc89-Klonen aufeinander zu untersuchen und die intratumorale Heterogenität zu imitieren, wurden die Holo- und Paraklon-Zellpopulationen der Panc89-Zelllinie in definierten Verhältnissen (100 %, 75 %/25 %, 50 %/50 %, 25 %/75 %) miteinander kombiniert und ausgesät. Die Zellmarkierung wurde gemäß Abschnitt 2.2.1.4 durchgeführt. Anschließend wurden die PDAC-Zellen nicht direkt ausgesät, sondern auf folgende Weise gezählt:

Nach Berechnung der erforderlichen Zellzahl für die einzelnen Verhältnisse (100 %, 75 %/25 %, 50 %/50 %, 25 %/75 % von 5×10^4 Zellen) wurden alle gefärbten Zellen in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und mit FCS-haltigem Panc-Medium resuspendiert. Aus den beiden gefärbten Zellsuspensionen wurden dann der errechnete prozentuale Anteil in weitere 2 ml Eppendorfgefäße überführt und mit dem korrespondierenden Anteil der anderen Zelllinie aufgefüllt, sodass die Gesamtzahl der in den Einsätzen kultivierten Zellen weiterhin 5×10^4 betrug. Schließlich wurden aus dieser Menge 75 bis 100 μ l pro Kavität ausgesät.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit erfolgte die Messung des Migrationsverhaltens über 24 Stunden (siehe Abschnitt 2.2.2). Hierfür wurde mit dem Operator „*Woundhealing 2F*“ automatisiert der Spalt am NYONE®-Mikroskop gemessen und in den einzelnen Messungen der Anteil der Spaltfläche, der von grün- bzw. rot-fluoreszierenden Zellen bedeckt war, als „*Confluence on gap*“ angegeben.

2.2.3 Adhäsionsassay

Für die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von PDAC-Zellen an Lungenendothelzellen wurde ein Adhäsionsassay in einer 96-Well-Platte durchgeführt.

Am ersten Tag wurden 1×10^5 HuLEC-5a Zellen in 200 μ l HuLEC-5a Medium pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Endothelzellen wurden gemäß Abschnitt 2.2.1.1 aus den Zellkulturflaschen abgelöst, im HuLEC-5a Medium aufgenommen und in einer Neubauer-

Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen ausgesät und für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Am Folgetag wurde der Adhäsionsassay durch Zugabe der fluoreszenz-markierten PDAC-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Tumorzellen aus den Zellkulturflaschen mit Trypsin-EDTA abgelöst (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Anschließend wurden sie zur Färbung mit dem CellTracker™ Green CMFDA in FCS-freies Panc-Medium aufgenommen. Die Färbung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben.

Nach der Färbung wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden dann in FCS-haltigem Panc-Medium resuspendiert und 10 µl der Lösung wurden für die Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Insgesamt wurden 1×10^4 Fluoreszenz-markierte Tumorzellen in 200 µl pro Well zu den bereits ausgesäten HuLEC-5a Zellen überführt.

Direkt im Anschluss an die Aussaat wurde die Platte für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und mit dem automatisierten Mikroskop NYONE® oder CELLAVISTA® analysiert. Der "Confluence 1F" Operator der zugehörigen YT-SOFTWARE quantifizierte die Anzahl fluoreszierender Zellen. Nach einer und vier Stunden wurde dieser Vorgang jeweils getrennt für die zu untersuchenden Wells wiederholt. Vor Beginn der zweiten und dritten Messung wurde das Medium nur aus den zu untersuchenden Wells der 96-Well-Platte mit einer Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt und durch frisches Panc-Medium ersetzt. Die Wells, welche nicht ausgemessen wurden, blieben unbehandelt (Abbildung 5).

Die Anzahl der gefärbten Tumorzellen nach einer Stunde und nach vier Stunden wurde durch die Anzahl der gefärbten Tumorzellen am Anfang des Versuches dividiert, um den prozentualen Anteil der noch im Well befindlichen PDAC-Zellen zu berechnen. Dieser Anteil entsprach den Zellen, die erfolgreich am Lungenendothel hafteten und durch den Waschprozess nicht entfernt wurden.

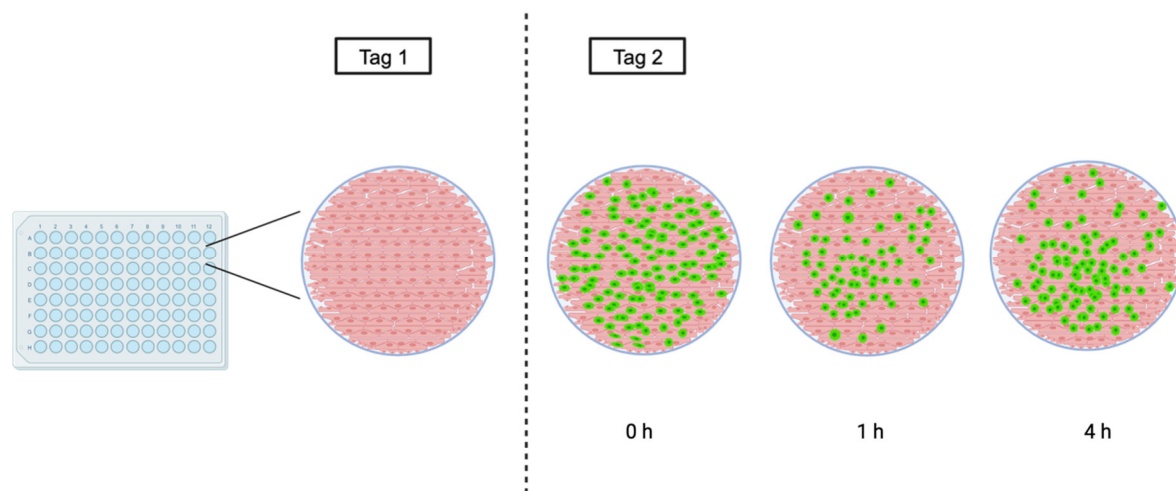


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Adhäsionsassays an Lungenendothelzellen. An Tag 1 erfolgte die Aussaat von 1×10^5 Endothelzellen pro Well einer 96-Well-Platte. An Tag 2 wurde der Adhäsionsassay durchgeführt. Dafür wurden 1×10^4 Fluoreszenz-markierte Tumorzellen pro Well zu den Endothelzellen gegeben und die Anzahl der am Lungenendothel adhären Tumorzellen zu drei Zeitpunkten (0 h, 1 h, 4 h) bestimmt. Hergestellt mit Biorender®.

2.2.3.1 Adhäsionsassay mit konditionierten Lungenendothelzellen

Um zu untersuchen, ob von den verschiedenen Tumorzellvarianten sezernierte Faktoren einen Einfluss auf die Lungenendothelzellen haben, worüber die Adhäsion der PDAC-Zellen beeinflusst wird, wurden die HuLEC-5a Zellen mit KM der verschiedenen PDAC-Zellvarianten vorinkubiert. Als Kontrolle diente die Konditionierung mit HuLEC-5a-Zellkulturmedium.

Dafür wurden die HuLEC-5a-Zellen wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben in einer 96-Well-Platte ausgesät.

Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relative Luftfeuchtigkeit) wurde das HuLEC-5a-Zellkulturmedium aus den Wells mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und durch 200 µl KM von Panc1-Zellvarianten (Parental-, Holoklon-, Paraklonpopulation) bzw. Panc89-Zellvarianten (Parental-, Holoklon-, Paraklonpopulation) oder HuLEC-5a-Zellkulturmedium ersetzt (siehe Abschnitt 2.2.1.3). Die Zellen wurden dann für weitere 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und der Adhäsionsassay durch Zugabe der Tumorzellen analog zu Abschnitt 2.2.3 durchgeführt.

2.2.4 Färbungen

2.2.4.1 Immunzytochemische Färbungen

Um die EMT- bzw. CSC-Eigenschaften der migrierten PDAC-Zellen genauer zu untersuchen, wurde ein Migrationsassay mit anschließender immunzytochemischer Darstellung der Tumorzellen durchgeführt.

Zunächst wurden Ibidi®-Zellkultureinsätze in eine 24-Well-Platte eingesetzt und ein Migrationsassay für acht Stunden durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2).

Nach acht Stunden Migrationszeit wurde das FCS-freie Panc-Medium unter nicht-sterilen Bedingungen abgesaugt und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls unter nicht-sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit einer 4 %-igen PFA-Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter einem Abzug. Anschließend wurden die Zellen drei Mal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, während die Platte auf einem Laborschüttler stand.

Nach der Fixierung wurden die Zellen für 10 Minuten bei -20 °C entweder mit Methanol (für die Sox2-Färbung) oder mit Methanol und 10 µl Wasserstoffperoxid (für die E-Cadherin- und L1CAM-Färbung) weiter fixiert. Danach wurden die Fixierlösungen entfernt und die Wells erneut drei Mal mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blockierlösung, entweder 4 % BSA in einer 0,3 %-igen Triton/PBS-Lösung (Sox2) oder 4 % BSA/PBS (E-Cadherin, L1CAM) behandelt. Danach wurde die Blockierlösung entfernt.

Die nachfolgenden Schritte variierten je nach Färbung:

1. E-Cadherin-Färbung: Der anti-E-Cadherin-Primärantikörper (finale Konzentration: 28 µg/ml) wurde in 200 µl 1 % BSA/PBS auf die fixierten Zellen aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.
2. L1CAM-Färbung: Der anti-L1CAM-Primärantikörper (finale Konzentration: 10 µg/ml) wurde in 200 µl 1 % BSA/PBS auf die PDAC-Zellen gegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Sox2-Färbung: Der anti-Sox2-Antikörper (finale Konzentration: 25 µg/ml) wurde in 200 µl 1 % BSA + 0,3 % Triton/PBS auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen drei Mal für 5 Minuten mit PBS auf einem Laborschüttler gewaschen. Danach wurde das Zweitreagenz *DAKO REAL™ EnVision™ HRP Rabbit/Mouse (K5007)* in die Wells pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Zweitantikörper entfernt und die Wells wurden erneut drei Mal für 5 Minuten mit 0,3 % Triton/PBS (Sox2) bzw. PBS (E-Cadherin, L1CAM) auf einem Laborschüttler gewaschen.

Für die Entwicklung der Färbung wurde das AEC Substrat Kit AB64252 verwendet. Nach Zugabe eines Tropfens auf die Zellen erfolgte eine 9-minütige Inkubation bei Raumtemperatur

in der Platte unter gleichmäßiger Bewegung. Danach wurden die Wells wiederum drei Mal für 5 Minuten mit PBS auf einem Laborschüttler gewaschen.

Abschließend wurde eine Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun bei Raumtemperatur für 2 bis 5 Minuten durchgeführt. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und eingedeckt.

Die Färbungen wurden anschließend mit dem Mikroskop LionHeart FX analysiert, um die Expression der EMT- bzw. CSC-Marker der migrierten PDAC-Zellen zu beurteilen.

2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Um die migrierten Panc89-Zellvarianten bezüglich der Co-Expression von E-Cadherin und Sox2 charakterisieren zu können, wurde ein Migrationsassay mit anschließender Immunfluoreszenz-Färbung nach acht Stunden Zellmigrationszeit durchgeführt.

Zuerst wurden Deckgläser in eine 24-Well-Platte eingesetzt. Die Ibidi®-Zellkultureinsätze wurden danach mittig auf den Deckgläsern platziert. Dann erfolgte die Aussaat und Messung des Migrationsassays für acht Stunden wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben.

Nach der Migration wurde das FCS-freie Panc-Medium unter nicht-sterilen Bedingungen abgesaugt und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten ebenfalls unter nicht-sterilen Bedingungen.

Die Zellen wurden mit einer 4 %-igen PFA-Lösung für 15 Minuten unter einem Abzug fixiert. Dabei wurde 1 ml PFA-Lösung auf die Deckgläser gegeben. Währenddessen wurde eine Feuchtkammer vorbereitet, indem der Boden der Kammer, der mit einem Mikrofaser Tuch ausgekleidet war, mit destilliertem Wasser befeuchtet wurde. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten auf einem Laborschüttler mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 4 % BSA blockiert. Für die Kombinationsfärbungen von E-Cadherin und Sox2 wurden die Antikörperfärbungen nacheinander durchgeführt, wobei zuerst die E-Cadherin-Färbung erfolgte, bevor die Sox2-Färbung begonnen wurde.

Der anti-E-Cadherin-Antikörper (finale Konzentration: 28 µg/ml) wurde in 1 % BSA/PBS auf die Deckgläser pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer im Kühlschrank.

Am nächsten Tag wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde der Alexa Fluor-488 Ziege anti-Maus-Antikörper (finale Konzentration: 4 µg/ml) in 1 % BSA/PBS hinzugefügt und die Zellen wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert.

Nach Beendigung der Antikörperinkubation für die erste Färbung, erfolgte die Sox2-Färbung. Der anti-Sox2-Antikörper (finale Konzentration: 25 µg/ml) wurde in 1 % BSA in 0,3 %

Triton/PBS bei Raumtemperatur auf die Zellen pipettiert. Nach 1 Stunde erfolgte ein dreifacher Waschschrift mit je 1 ml 0,3% Triton/PBS pro Well.

Anschließend wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor-647 Ziege-anti-Hase-Antikörper (finale Konzentration: 2 µg/ml) in 1 % BSA in 0,3 % Triton/PBS inkubiert und erneut in der Feuchtkammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur gelagert.

Um die Zellkerne zu färben, wurde den Lösungen mit den Sekundärantikörpern Hoechst 33258 in einer Verdünnung von 1:500 hinzugefügt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS und anschließend mit destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen. Zuletzt wurde Fluoro-Gel auf die Objektträger aufgetragen und die Deckgläser darauf platziert. Die Coverslips wurden mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die Charakterisierung der migrierten Zellen erfolgte mit dem Lionheart FX Mikroskop.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism 8 durchgeführt.

Der Shapiro-Wilk-Test wurde verwendet, um die Normalverteilung der Daten zu überprüfen.

Der *Equal-Variance*-Test wurde verwendet, um die Gleichheit der Varianzen zwischen den Gruppen zu testen.

Wenn die Daten normalverteilt waren und gleiche Varianzen aufwiesen, wurde zum Vergleich von zwei Stichproben der unabhängige Zweistichproben-t-Test verwendet., andernfalls wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet.

Für parametrische Datensätze mit mehr als zwei Stichproben wurde eine *one-way-analysis of variance* (*one-way* ANOVA) durchgeführt, während für nicht-parametrische Datensätze die Kruskal-Wallis *one-way* ANOVA *on Ranks* verwendet wurde.

In der graphischen Darstellung wurde der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittels (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt, da alle biologische Replikate zusätzlich als technische Replikate durchgeführt wurden.

Die statistische Signifikanz wurde mit einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0,05$ bewertet. Bei signifikanten Ergebnissen wurden Sternchen (*) verwendet, um den Grad der Signifikanz anzugeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$).

3 Ergebnisse

3.1 Migrationsverhalten

Die Migration von Tumorzellen spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Metastasierung in fremde Organe. Die Interaktion verschiedener Subpopulationen innerhalb des Primarius kann dabei sowohl die Aussaat der Tumoren in das unmittelbare TME, aber auch in fremde Organe begünstigen (Hanahan und Coussens 2012). Um zu untersuchen, ob die Zellvarianten der Panc1- und Panc89-Zelllinien hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens Unterschiede aufweisen, erfolgte die Durchführung von Migrationsassays über 32 Stunden bzw. 24 Stunden. Dabei wurde die Migrationsfähigkeit der Zellvarianten nicht nur nativ, sondern auch unter Stimulation durch KM bzw. in Form von Co-Kulturen überprüft.

3.1.1 Panc1-Zellvarianten migrieren signifikant langsamer als Panc89-Zellvarianten

Das Migrationsverhalten der Panc1- und Panc89-Zellvarianten wurde über einen Zeitraum von insgesamt 32 Stunden untersucht. Im Verlauf der Zeit zeigte sich eine Zunahme der Zellkonfluenz im Spalt bei allen Zellvarianten, wobei deutliche Unterschiede zwischen den beiden parentalen Zellen und zum Teil auch zwischen den Subpopulationen zu beobachten waren (Abbildung 6A).

Die Konfluenz der parentalen Panc1-Zellen stieg über die Zeit an und nach 32 Stunden wurde eine Konfluenz von 29,22 % gemessen. Die Gesamtzunahme der Konfluenz im Spalt betrug insgesamt 13,61 % (Abbildung 6B).

Die Panc1-Holoklonzellen zeigten die geringste Konfluenzänderung unter allen Panc1-Zellvarianten. Innerhalb von 32 Stunden stieg die Konfluenz im Spalt um insgesamt 3,37 % an, sodass die Konfluenz in der letzten Messung bei 19,29 % lag (Abbildung 6B).

Das Migrationsverhalten der Panc1-Paraklonvariante ähnelte denen der anderen Panc1-Zellvarianten. Nach 32 Stunden bedeckte die Panc1-Paraklonvariante 21,98 % des Spalts. Die Differenz zwischen der ersten und der letzten Messung betrug 7,18 % (Abbildung 6B).

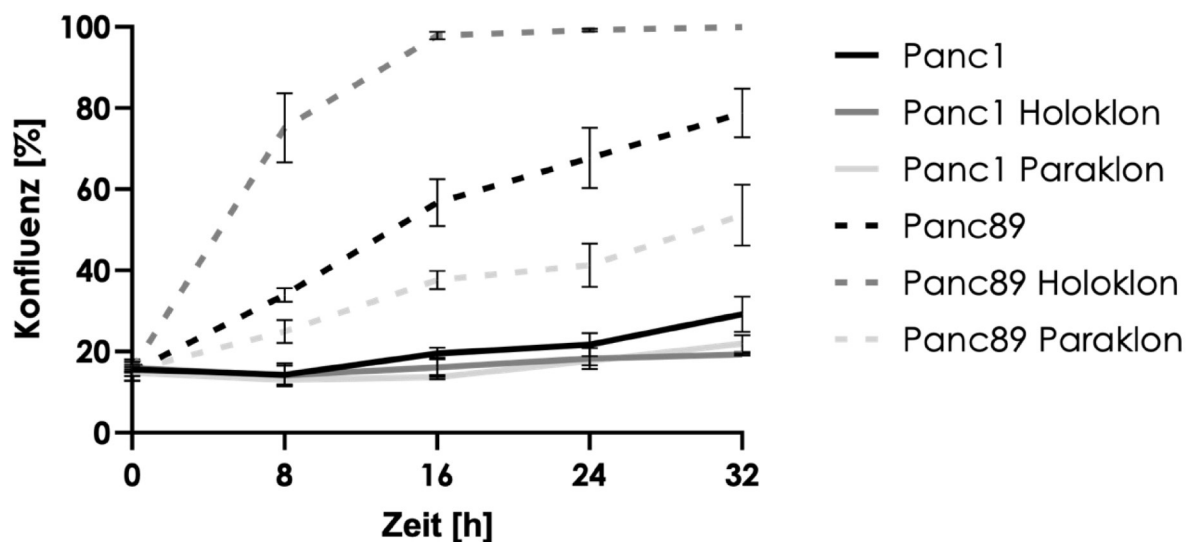
Insgesamt zeigte sich bei allen drei Panc1-Zellvarianten eine geringe Migrationsaktivität, wobei die parentalen Panc1-Zellen noch die stärkste Migrationsfähigkeit zeigten.

Die parentalen Panc89-Zellen zeigten hingegen eine deutliche Zunahme der Konfluenz im Spalt, welche nach 32 Stunden 78,76 % betrug. Die stärkste Zunahme mit einem Anstieg um 22,79 % wurde zwischen den Zeitpunkten 8 und 16 Stunden beobachtet. Die maximale Zunahme betrug 63,61 % (Abbildung 6C).

Bei den Panc89-Holoklonvarianten betrug die Konfluenz im Spalt nach 8 Stunden bereits 75,16 % und nach weiteren 8 Stunden war der Spalt nahezu vollständig verschlossen (97,91 %). Der gesamte Anstieg am Ende des Versuchs betrug damit 84,32 %. Diese Zellvariante war die einzige Zellpopulation, die in dem gewählten Beobachtungszeitraum in der Lage war, den Spalt vollständig zu schließen (Abbildung 6C).

Die Panc89-Paraklonzellen zeigten die geringste Migrationsaktivität innerhalb der Panc89-Zellvarianten. Bei ihnen stieg die Konfluenz im Spalt auf 53,65 % am Ende des Beobachtungszeitraums an. Die Konfluenzzunahme betrug insgesamt 38,25 % (Abbildung 6C).

A)



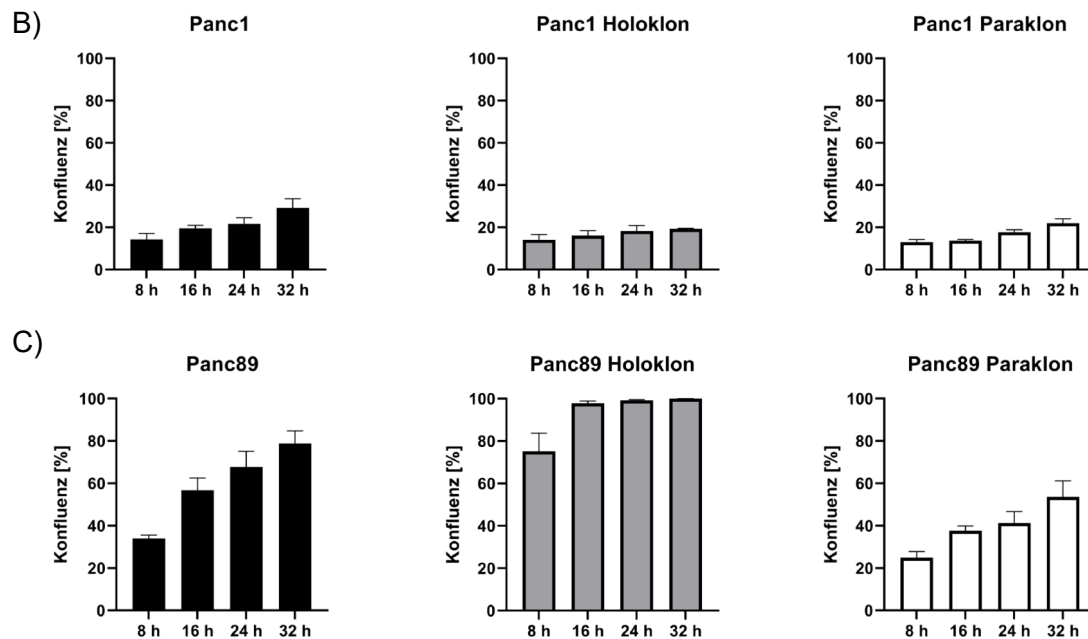


Abbildung 6: In allen untersuchten Zellvarianten lässt sich eine Zunahme der Zellkonfluenz im Spalt beobachten. Parentale Panc1- und Panc89-Zellen sowie ihre jeweiligen Subpopulationen (Holoklon- und Paraklonzellen) wurden mit Hilfe eines Wundheilungsassay hinsichtlich ihrer Migrationsfähigkeit untersucht. Nach Aussaat von 5×10^4 Zellen der Panc1 und Panc89-Zellvarianten in die Kammern der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurde die Zellkonfluenz im Spalt zum Zeitpunkt $t = 0, 8, 16, 24$ und 32 Stunden gemessen. Die Konfluenz im Spalt wird als prozentualer Anteil in Form von Mittelwerten mit SEM von $n = 3$ unabhängigen Versuchen angegeben und ist jeweils für A) alle Zellvarianten, B) die Panc1-Zellvarianten und C) die Panc89-Zellvarianten dargestellt.

Im direkten Vergleich der Panc1- und Panc89-Zellvarianten zeigten die Panc89-Zellvarianten eine signifikant stärkere Migrationsfähigkeit gegenüber den Panc1-Zellvarianten sowohl zu allen Zeitpunkten als auch bei allen Varianten (Abbildung 7A bis C). Der Unterschied war besonders deutlich im direkten Vergleich der CSC-assoziierten Holoklonzellen erkennbar.

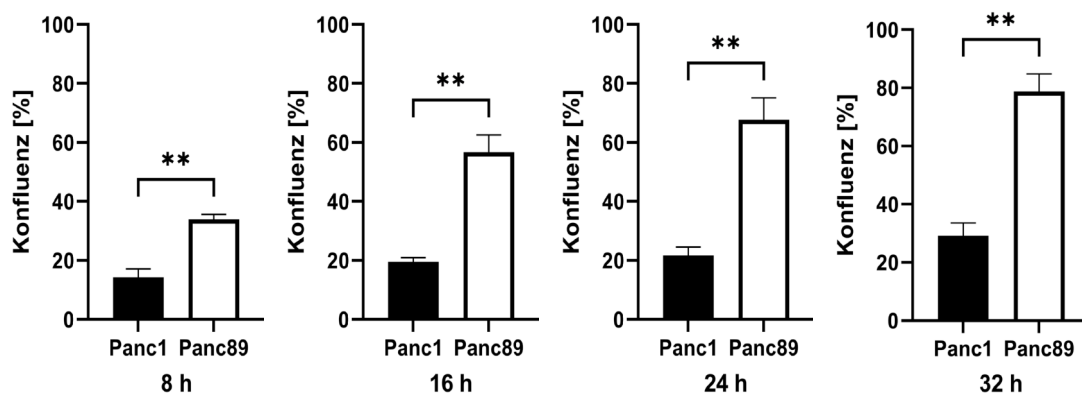
Die Abbildung 7D zeigt beispielhaft die Migrationsfront der Panc1-Zellvarianten zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 8 Stunden und 24 Stunden. Hier ist zu erkennen, dass die wenigen Zellen, die in den Spalt migrierten, einen länglichen, spindelförmigen Phänotyp in Übereinstimmung mit dem mesenchymalen Charakter der Panc1-Zellen aufwiesen und als einzelne Zellen migrierten (weißer Pfeil).

Die Abbildung 7E veranschaulicht die Migration der Panc89-Zellvarianten. Vor allem bei den epithelialen Panc89-Holoklonzellen wird deutlich, dass die Migration in den Spalt durch kollektive Tumorzellverbände ermöglicht wird. Jedoch lassen sich migrierende Zellverbände auch bei der parentalen Population und den Panc89-Paraklonzellen erkennen (weiße Pfeile).

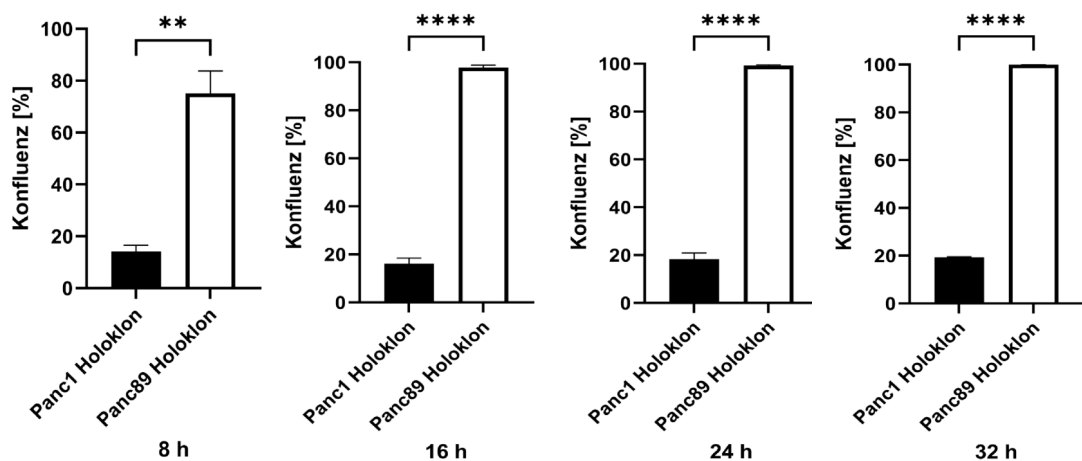
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es deutliche Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen den epithelialen Panc89-Zellvarianten und den mesenchymalen Panc1-Zellvarianten gab. Auffällig ist, dass die CSC-assoziierten Panc89-Holoklonzellen von den sechs untersuchten Zellvarianten die stärkste Migration zeigten, während die CSC-assoziierten Panc1-Holoklonzellen die niedrigste Migrationstendenz hatten. Im Allgemeinen war die Migrationsrate bei allen Panc89-Zellvarianten stärker ausgeprägt als bei den Panc1-Zellvarianten. Darüber hinaus zeigten in Übereinstimmung mit ihrem mesenchymalen Phänotyp die Panc1-Zellvarianten eine Migration in Form von Einzelzellen, während die Panc89-Zellvarianten in Form von Zellkollektiven migrierten.

Aufgrund des signifikant besseren Migrationsverhaltens der epithelialen Panc89-Zellvarianten wurden nur diese Zellen in den nachfolgenden Versuchen weiter untersucht.

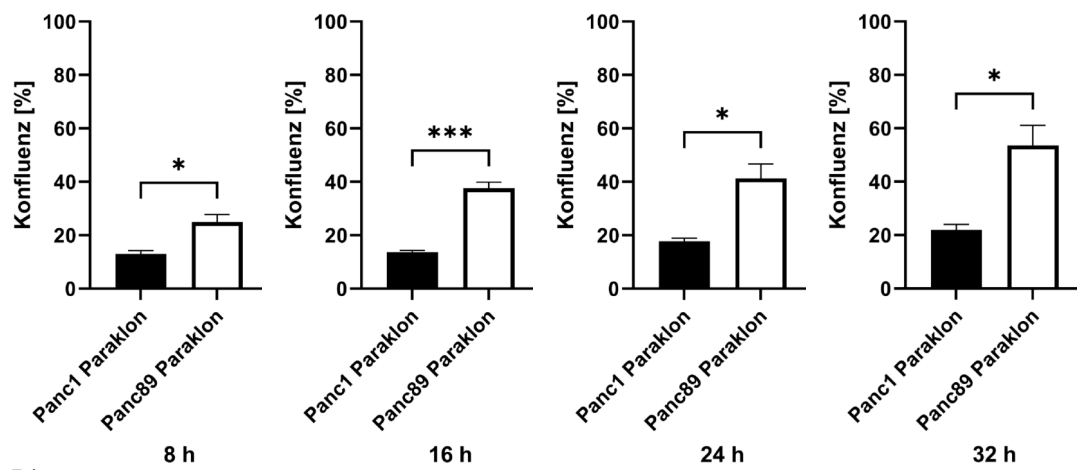
A)



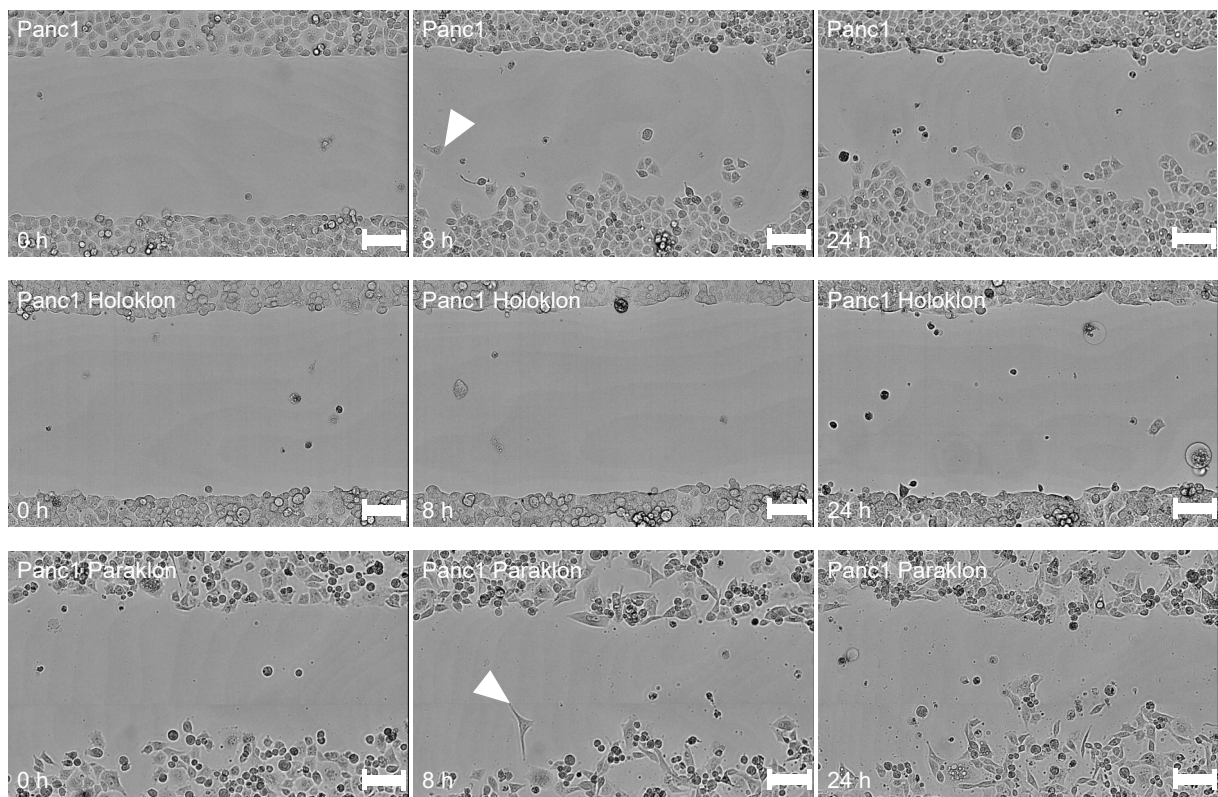
B)



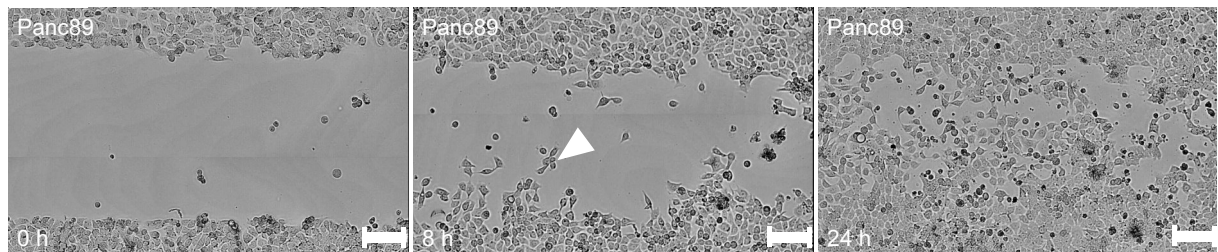
C)



D)



E)



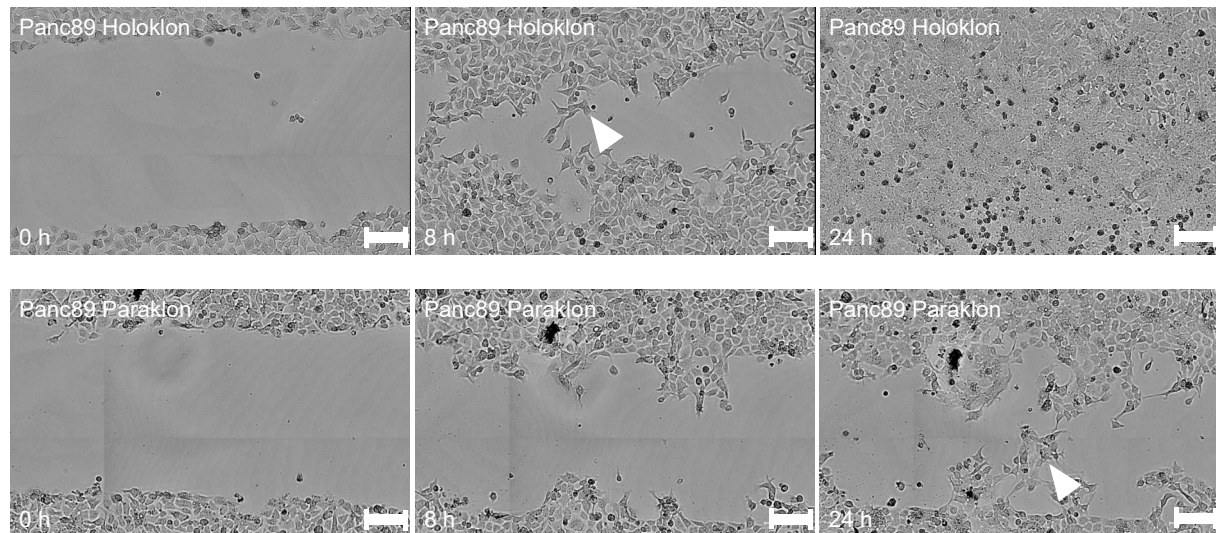


Abbildung 7: Panc1-Zellvarianten migrieren signifikant langsamer als Panc89-Zellvarianten. Parentale Panc1- und Panc89-Zellen sowie ihre jeweiligen Subpopulationen (Holoklon- und Paraklonzellen) wurden mit Hilfe eines Wundheilungsassays hinsichtlich ihrer Migrationsfähigkeit untersucht. Nach Aussaat von 5×10^4 Zellen der Panc1 und Panc89-Zellvarianten in die Kammern der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurde die Zellkonfluenz im Spalt zum Zeitpunkt $t = 0, 8, 16, 24$ und 32 Stunden gemessen. Die Konfluenz im Spalt wird als prozentualer Anteil in Form von Mittelwerten mit SEM von $n = 3$ unabhängigen Versuchen angegeben und ist vergleichend für A) die parentalen Zellen, B) die CSC-assoziierten Holoklonvarianten und C) die Nicht-CSC-assoziierten Paraklonvarianten dargestellt. Darüber hinaus sind repräsentative Aufnahmen des Spalts zu den Messzeitpunkten $t = 0, 8$ und 24 Stunden für D) die Panc1-Zellvarianten sowie E) die Panc89-Zellvarianten dargestellt. Die weißen Pfeilspitzen zeigen exemplarisch in den Spalt migrierte Tumorzellen als einzelne, spindelförmige Zellen bei den mesenchymalen Panc1-Zellvarianten bzw. als Kollektivverbünde mehrerer Zellen bei den epithelialen Panc89-Zellvarianten. Die Daten wurden statistisch mithilfe eines unabhängigen Zwei-Stichproben-t-Tests analysiert. Signifikanzniveau $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, $p^{****} < 0,0001$; Maßstab = $100 \mu\text{m}$.

3.1.2 Immunzytochemische Darstellung der Expression von EMT- und CSC-Markern in migrierenden Panc89-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Panc89-Zellvarianten eine stärkere Migration in den Spalt als die Panc1-Zellvarianten aufweisen, wurde eine genauere Charakterisierung der in den Spalt wandernden Zellen vorgenommen. Dazu wurden nach einer 8-stündigen Migration immunzytochemische Untersuchungen auf den epithelialen Marker E-Cadherin, den mesenchymalen Marker L1CAM sowie den CSC-Marker Sox2 durchgeführt (Abbildung 8).

Die Panc89-Holoklonzellen waren am stärksten positiv für das Membranprotein E-Cadherin im Vergleich zu den parentalen Panc89-Zellen sowie den Panc89-Paraklonzellen. Bei allen drei Zellvarianten war jedoch zu beobachten, dass E-Cadherin-positive Zellen zusammen mit E-Cadherin-negativen Zellen in Zellverbänden in den Spalt migrierten (schwarzer Kreis), wobei diese Zellverbände am ausgeprägtesten bei den Panc89-Holoklonvarianten zu beobachten waren.

In Einklang mit der bisherigen Charakterisierung der Panc89-Zellen zeigten die Panc89-Holoklonzellen keine L1CAM-Expression und damit kaum mesenchymale Charakteristika. Obwohl die parentalen Panc89-Zellen und die Paraklonzellen den mesenchymalen Marker L1CAM exprimierten, waren im Spalt kaum mesenchymal-imponierende L1CAM-positive Zellen zu finden.

Die Expression des CSC-Markers Sox2 stellte sich am deutlichsten in den Panc89-Holoklonzellen dar. Dabei zeigten diese Tumorzellen eine intranukleäre Anreicherung des CSC-Markers (weißer Kreis). In der parentalen Panc89-Population war nur eine geringe Anzahl an Sox2-positiven Zellen zu beobachten, was in Einklang mit einem nur geringen Anteil an CSCs innerhalb einer Gesamtzellpopulation steht. Die Panc89-Paraklonzellen zeigten keine Sox2-Expression, was im Einklang mit ihrem Nicht-CSC-Phänotyp steht.

Aus der Zusammenschau der Daten kann gefolgert werden, dass die Panc89-Holoklonzellen trotz ihres epithelialen Phänotyps, der durch die hohe E-Cadherin-Expression verdeutlicht wird, die höchste Migrationsrate in Form von Zellverbänden aufweisen. Die parentalen Panc89-Zellen und die Panc89-Paraklonzellen, die eher einen mesenchymaleren Charakter aufweisen (indiziert durch die L1CAM-Expression), waren nicht in der Lage, den Spalt in gleichem Maße zu schließen wie die Panc89-Holoklonzellen. Somit können in Zusammenschau mit dem epithelialen Phänotyp der Panc89-Holoklonzellen und zu Teilen auch der parentalen Panc89-Zellen mesenchymale Eigenschaften als treibende Kraft der Zellmigration ausgeschlossen werden. Da die Sox2-exprimierenden Tumorzellen innerhalb der parentalen Panc89-Population keine ausgeprägte Migrationstendenz zeigten, scheint Sox2 vermutlich eine geringere Relevanz für die Zellmigration zu haben.

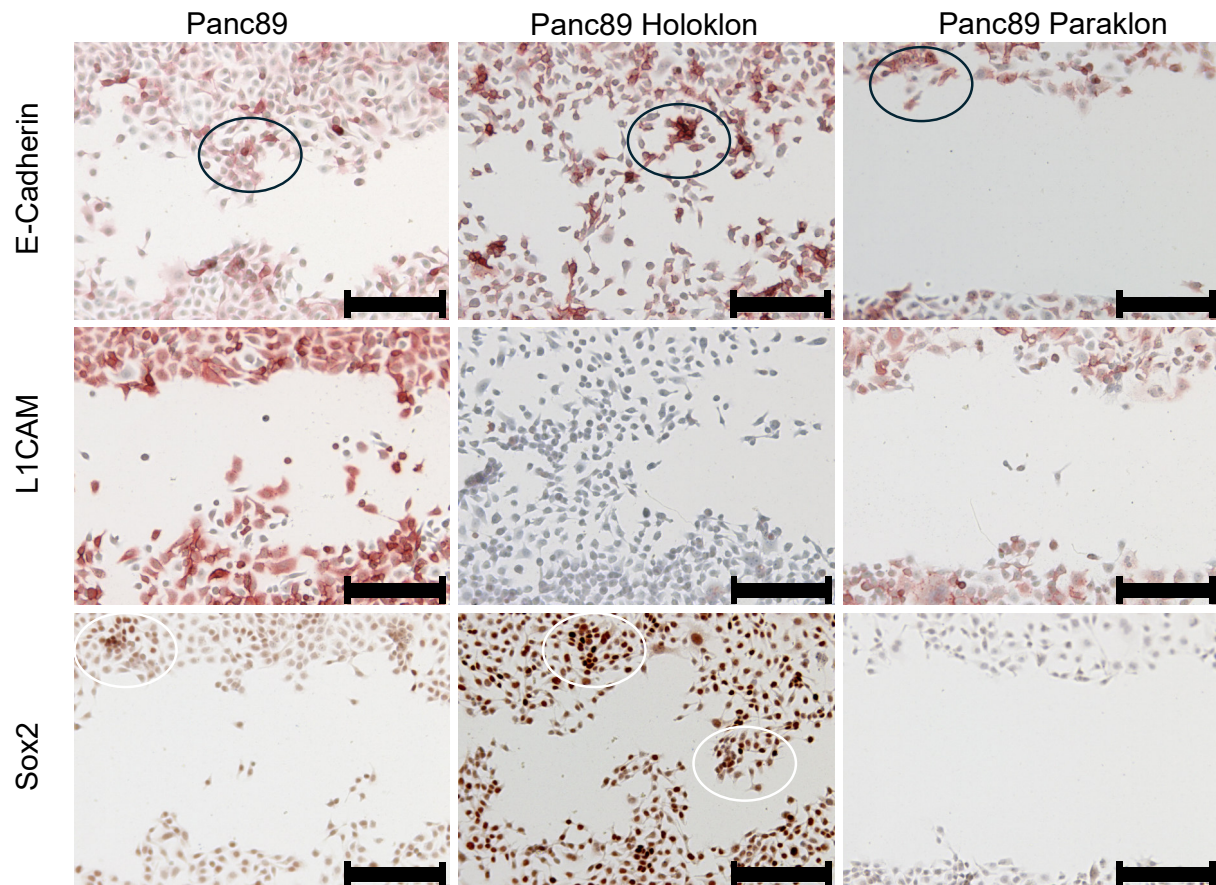


Abbildung 8: Migrierende Zellverbände enthalten E-Cadherin-exprimierende Zellen, sind aber nicht exklusiv Sox2-exprimierend. Nach Aussaat von 5×10^4 parentaler Panc89-, Panc89-Holoklon- und Panc89-Paraklonzellen in die Kammern der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurde die Zellmigration nach 8 Stunden gestoppt. Anschließend wurde eine immunzytochemische Färbung des epithelialen Markers E-Cadherin, des mesenchymalen Markers L1CAM sowie des CSC-Markers Sox2 durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der drei Zellvarianten nach der Färbung in $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Die schwarzen bzw. weißen Kreise zeigen exemplarisch Zellen mit der Expression von E-Cadherin bzw. Sox2. Maßstab = 200 μm .

3.1.3 Immunfluoreszenzdoppelfärbung von E-Cadherin und Sox2 in migrierenden Panc89-Zellen

Um das Zusammenspiel zwischen E-Cadherin und Sox2 in Panc89-Zellvarianten bei der Zellmigration genauer zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung durchgeführt.

Die Migration der Panc89-Holoklonzellen war erneut am effektivsten. Der Spalt war nach 8 Stunden fast vollständig geschlossen, während bei den anderen beiden Zellvarianten

weiterhin ein freier Spalt zwischen beiden Migrationsfronten zu erkennen war. Darüber hinaus zeigte sich erneut eine Migration in Form von kollektiven Tumorzellverbänden (Abbildung 9). In den Färbungen wurde deutlich, dass die parentale Population sowohl aus E-Cadherin-positiven als auch aus E-Cadherin-negativen Zellen zusammengesetzt ist und einige Zellen ebenfalls eine Sox2-Expression zeigen (Abbildung 9, linke Spalte). Zudem ist zu erkennen, dass diese beiden Marker gleichzeitig von einigen Zellen exprimiert werden (weißer Kreis). Die Panc89-Holoklonzellen zeigten hingegen eine deutlich höhere Positivität für die Co-Expression von E-Cadherin und Sox2 als die parentalen Panc89-Zellen sowie die Panc89-Paraklonzellen (weißer Kreis). Gleichzeitig fiel bei den Panc89-Holoklonzellen auf, dass eine variable Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Bei der Panc89-Paraklonvariante waren aufgrund des weiterhin vorhandenen Spalts zwischen den Zellrasen weniger E-Cadherin-positive Zellen zu erkennen und die Sox2-Expression fehlte vollständig. Im Einklang mit den vorherigen Färbungen lässt sich somit sagen, dass in allen Zellvarianten E-Cadherin zu detektieren ist, wohingegen Sox2-positive Zellen vornehmlich in den Holoklonzellen sowie in geringerer Anzahl in den parentalen Zellen zu verzeichnen waren (weißer Pfeil). Doppelt positive Zellen waren insbesondere in den Panc89-Holoklonzellen zu detektieren (weißer Kreis). Dabei waren diese Tumorzellen sowohl an der Migrationsfront als auch zentral im Zellrasen zu detektieren, was darauf hindeutet, dass Sox2 vermutlich eine geringere Rolle für die Migration selbst spielt.

Somit stehen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen in Einklang mit den zuvor generierten Daten und unterstreichen die Bedeutung einer kollektiven Zellmigration in den Panc89-Zellvarianten, die mit einem epithelialen Phänotyp der Zellen im Einklang steht.

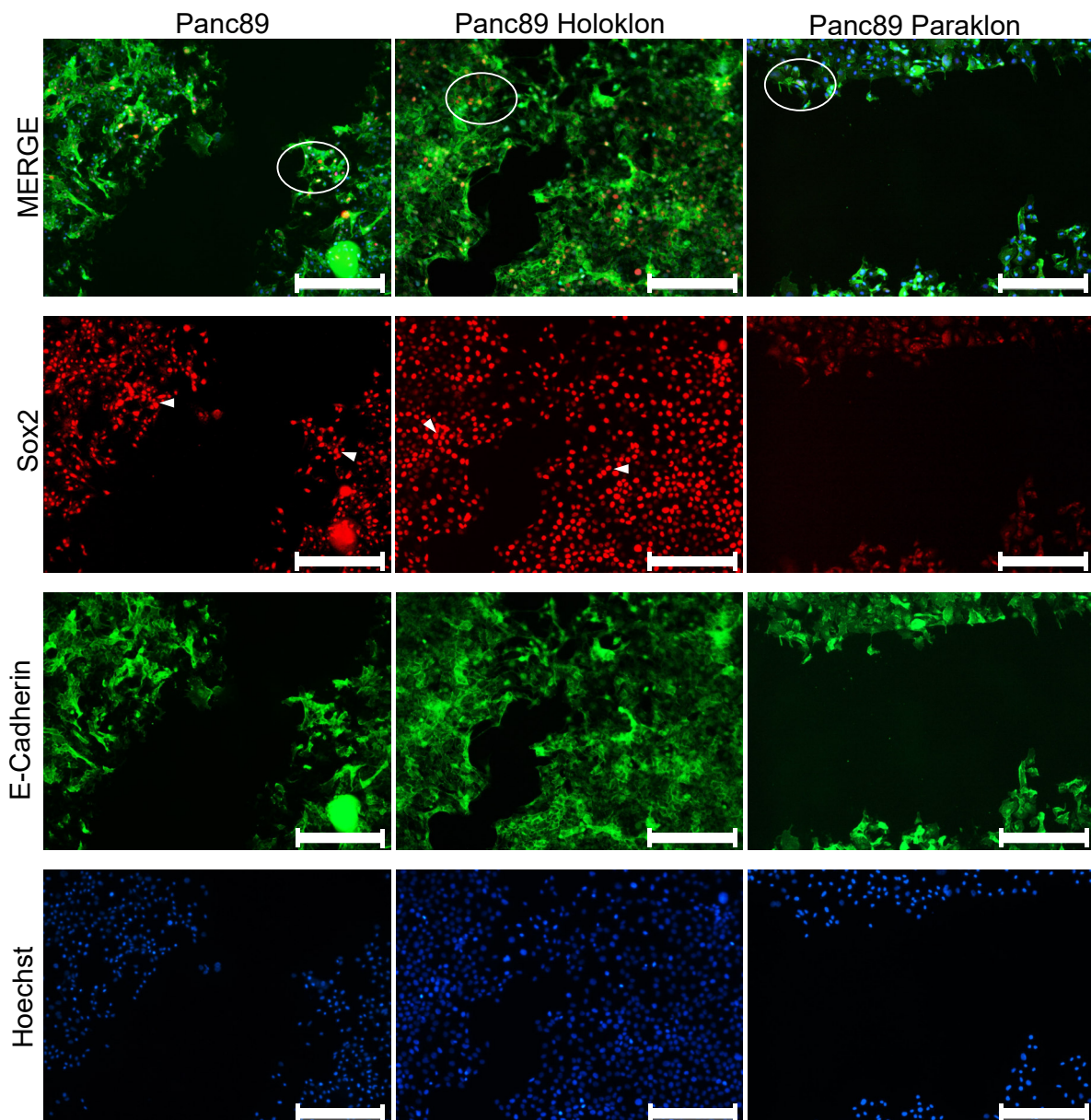


Abbildung 9: Co-Expression von E-Cadherin und Sox2 sowohl an der Migrationsfront als auch zentral im Zellrasen der parentalen Panc89-Zellen und Panc89-Holoklonzellen.

Nach Aussaat von 5×10^4 parentaler Panc89-, Panc89-Holoklon- und Panc89-Paraklonzellen in die Kammern der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurde die Zellmigration nach 8 Stunden gestoppt. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung von E-Cadherin und Sox2 zusammen mit einer Hoechstfärbung durchgeführt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen des Spalts von $n = 3$ unabhängigen Versuchen der drei Zellvarianten. Die obere Reihe entspricht der Kombination der einzelnen Färbungen, darunter sind die Färbungen von Sox2, E-Cadherin und Hoechst dargestellt. Die weißen Kreise zeigen exemplarisch Zellen mit der Co-Expression von E-Cadherin und Sox2, während die weißen Pfeile die Expression von Sox2 sowohl an der Migrationsfront als auch im Zellrasen aufzeigen. Maßstab = 200 μm .

3.1.4 Keine parakrine Beeinflussung der Migration von Panc89-Holoklon- und Panc89-Paraklonzellen

Um einen möglichen Einfluss von löslichen Faktoren, die von den Holoklon- und Paraklonzellen sezerniert werden, auf das Migrationsverhalten zu untersuchen, wurden die Panc89-Subpopulationen vor dem Migrationsassay entweder mit ihrem eigenen KM oder dem KM der anderen CSC- bzw. Nicht-CSC-Population für 48 Stunden inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Migration über 32 Stunden.

Im Einklang mit den bisherigen Experimenten zeigten die Panc89-Holoklonzellen nach Konditionierung mit ihren eigenen Medien ein deutlich stärkeres Migrationsverhalten als die Paraklonzellen nach Inkubation mit ihrem Zellkulturmedium. Das Migrationsverhalten beider Zellvarianten wurde kaum bis gar nicht durch die vorherige Inkubation der Zellen in KM der jeweils anderen Zellpopulation beeinflusst (Abbildung 10A und B).

Die Konfluenz im Spalt der Panc89-Holoklonvariante nach Inkubation in eigenem Zellkulturmedium betrug nach 32 Stunden 64,77 %, während die Inkubation im Zellkulturmedium der Panc89-Paraklonzellen eine Zellkonfluenz im Spalt von 57,49 % ergab (Abbildung 10A). In der Panc89-Paraklonvariante wurde ein leichter Anstieg der Konfluenz im Spalt unter beiden Bedingungen beobachtet. Nach 32 Stunden waren nach Inkubation in eigenem Zellkulturmedium 18,58 % des Spalts konfluent bzw. nach Inkubation in Zellkulturmedium der Panc89-Holoklonzellen 17,5 % (Abbildung 10B).

In der Zusammenfassung deuten diese Befunde darauf hin, dass beide Zellpopulationen nicht in der Lage sind durch sezernierte Faktoren das Migrationsverhalten der anderen Subpopulation zu beeinflussen.

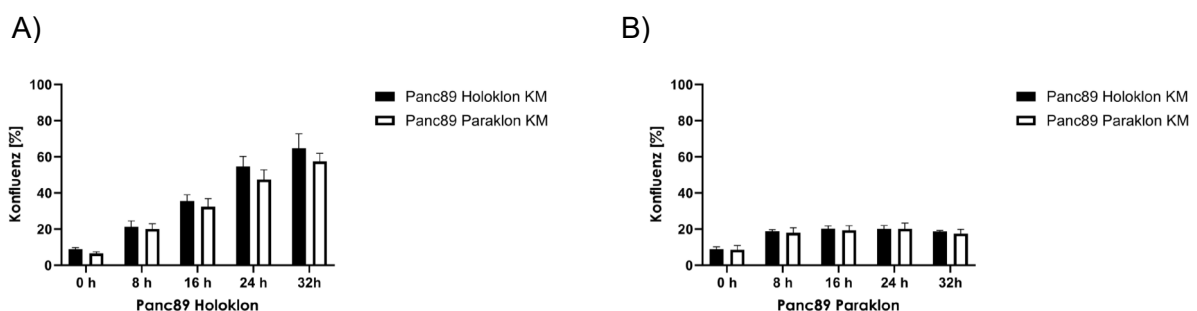


Abbildung 10: Das Migrationsverhalten der Panc89-Zellvarianten wird nicht durch sezernierte lösliche Faktoren der anderen Zellpopulation beeinflusst. Nach Aussaat von 5×10^4 Panc89-Holoklon- bzw. Paraklonzellen in die Kammern der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurden beide Zellvarianten entweder mit ihren eigenen konditionierten Medien (KM) oder mit

den KM der anderen Zellvariante für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellkonfluenz im Spalt zum Zeitpunkt $t = 0, 8, 16, 24$ und 32 Stunden gemessen. Die Zellmigration A) der Panc89-Holoklonzellen und B) der Panc89-Paraklonzellen wird dargestellt als Mittelwerte der prozentualen Zellkonfluenz im Spalt mit SEM von $n = 4$ unabhängigen Experimenten.

3.1.5 Keine Beeinflussung des Migrationsverhaltens der Panc89-Holoklonzellen und Panc89-Paraklonzellen durch parallele Aussaat im Migrationsassay

In dem vorherigen Versuch hatte die Kultivierung der Panc89-Zellvarianten durch KM 48 Stunden vor der Durchführung eines Migrationsassays keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten zeigen können. Um jedoch zu prüfen, ob sich die beiden Zellpopulationen in einer gemeinsamen Kultur durch sezernierte Faktoren beeinflussen und darüber das Migrationsverhalten jeweils verändert wird, erfolgte eine parallele Aussaat der Zellvarianten in gegenüberliegende Kavitäten der Ibidi®-Zellkulturinsätze und die Beurteilung der Migration über 24 Stunden. Der maximale Messzeitpunkt wurde reduziert, da in den vorherigen Versuchen demonstriert werden konnte, dass die Panc89-Holoklonzellen bereits nach 24 Stunden mit einer fast vollständigen Konfluenz den Spalt schließen konnten. Ferner wurden die Panc89-Holoklonzellen mit dem Farbstoff CellTracker® Green CMFDA grün und die Panc89-Paraklonzellen mit dem Farbstoff CellTracker® Deep Red rot gefärbt, um beide Zellpopulationen eindeutig voneinander unterscheiden zu können.

Die mittlere Konfluenz der Panc89 Holoklonzellen stieg nach 24 Stunden auf 28,42 % an und die Konfluenzzunahme betrug insgesamt 22,49 % (Abbildung 11A).

Bei den Panc89-Paraklonzellen zeigte sich ein Anstieg um 7,84 % und die Konfluenz im Spalt betrug nach 24 Stunden 8,86 % (Abbildung 11A).

Insgesamt war die Migrationsaktivität beider Zellvarianten somit schwächer als in den vorherigen Versuchen mit den unmarkierten Zellvarianten.

Wie in Abbildung 11B jedoch zu sehen ist, wurde der Anstieg der Konfluenz im Spalt weiterhin durch die Panc89-Holoklonzellen verursacht. Die Paraklonzellen zeigten hingegen kaum Migrationsaktivität. Dies verdeutlicht in Übereinstimmung mit den bisherigen Versuchen das stärkere Migrationspotential der Panc89-Holoklonzellen innerhalb der Panc89-Zellvarianten. Eine gegenseitige Beeinflussung der Migrationstendenz von Panc89-Zellpopulationen durch lösliche Faktoren kann anhand dieser Ergebnisse sowie der Ergebnisse aus 3.1.4 jedoch ausgeschlossen werden.

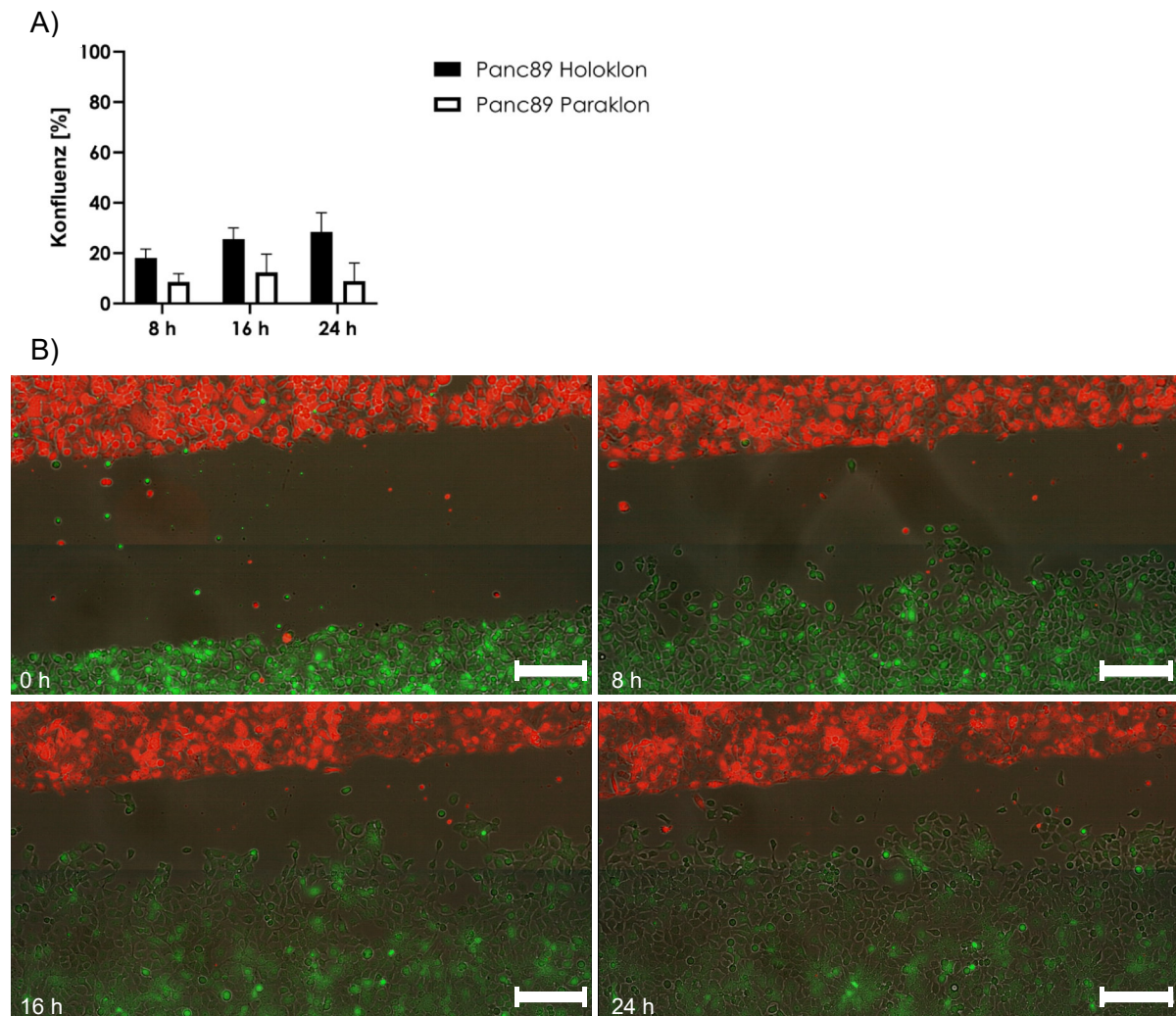


Abbildung 11: Das Migrationsverhalten der Panc89-Holo- und Paraklonzellen wird nicht durch parakrine Faktoren beeinflusst. Vor dem Migrationsassay wurden die Panc89-Holoklonzellen mit dem Farbstoff CellTracker® Green CMFDA und die Panc89-Paraklonzellen mit dem Farbstoff CellTracker® DeepRed gefärbt. Nach Aussaat von 5×10^4 Panc89-Holoklon- bzw. Paraklonzellen in die Kammern der Ibidi®-Zellkultureinsätze wurde die Zellkonfluenz im Spalt zu den Zeitpunkten $t = 0, 8, 16$ und 24 Stunden gemessen. Die Zellmigration A) der Panc89-Holoklon- und Panc89-Paraklonzellen ist dargestellt als Mittelwerte der prozentualen Zellkonfluenz im Spalt mit SEM aus $n = 5$ unabhängigen Versuchen. Darüber hinaus sind repräsentative Aufnahmen des Spalts zu den Zeitpunkten $t = 0, 8, 16$ und 24 Stunden mit B) den grün-fluoreszierenden Panc89-Holoklonzellen und den rot-fluoreszierenden Panc89-Paraklonzellen dargestellt. Maßstab = $200 \mu\text{m}$.

3.1.6 Ein höherer Anteil an Panc89-Holoklonzellen an der Gesamtzellpopulation geht mit einer schnelleren Migrationsfähigkeit einher

Die bisherigen Befunde untermauern, dass die parentalen Panc89-Zellen aus mehreren Subpopulationen bestehen, u.a. Panc89-Holoklon- und Paraklonzellen. Die Ergebnisse der vorherigen Experimente haben zudem zeigen können, dass die Panc89-Holoklonzellen die stärkste Zellmigration im Vergleich zur parentalen Population sowie der Paraklonzellen haben. Um zu untersuchen, ob und wie sich die Zellmigration der beiden Zellpopulationen durch den Anteil an der Gesamtpopulation verändert, wurde beide Zellpopulationen in unterschiedlichen Zellverhältnissen (100%-Holoklon- bzw. Paraklonzellen, 75:25, 50:50 oder 25:75 Holoklonzellen bzw. Paraklonzellen) kultiviert und das Migrationsverhalten über 24 Stunden analysiert.

Die 100 %-Population der Panc89-Holoklonzellen zeigte eine ähnliche Migrationsdynamik wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Es wurde ein Anstieg um 75,7 % gemessen, wobei die Zellkonfluenz im Spalt 81,54 % nach 24 Stunden betrug (Abbildung 12A). Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben migrierte die 100 %-Population der Panc89-Paraklonzellen deutlich weniger und der Spalt war nach 24 Stunden nur zu 28,04 % mit den Zellen bedeckt (Abbildung 12B).

Bei einem Verhältnis von 75:25 (3:1) von Panc89 Holoklon- zu Panc89 Paraklonzellen war nach 24 Stunden ein Anstieg beider Zellkonfluenzraten zu verzeichnen (Panc89-Holoklonzellen: 58,14 %, Panc89-Paraklonzellen: 15,22 %). Der gesamte Anstieg der Zellkonfluenz im Spalt betrug somit für die Panc89-Holoklonzellen 52,82 % und für die Panc89 Paraklonzellen 13,72 % (Abbildung 12A und B).

Die Zellkonfluenz im Spalt betrug beim 50:50-Verhältnis (1:1) nach 24 Stunden 45,82 % für die Holoklonzellen und 30,67 % für die Paraklonzellen (Abbildung 12A und B). Die Zunahme der Konfluenz im Spalt lag somit nach 24 Stunden bei 42,01 % bzw. 27,94 %.

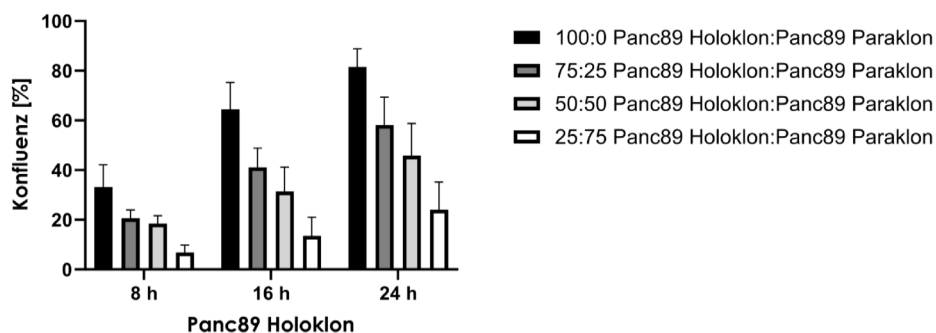
Die Auswertung der Daten des 25:75-Verhältnisses (1:3) ergab für die Panc89 Holoklonzellen einen mittleren Konfluenzanstieg um 21,36 % nach 24 Stunden, während dieser Anstieg bei den Panc89 Paraklonzellen 31,33% betrug. Nach 24 Stunden konnte eine Konfluenz im Spalt von 24,03 % bei den Holoklonzellen und 34,12 % bei den Paraklonzellen gemessen werden (Abbildung 12A und B).

In allen Verhältnissen (bis auf dem 1:3-Verhältnis) war der Anteil der Panc89-Holoklonzellen im Spalt somit höher als der Anteil der Panc89-Paraklonzellen. Außerdem wurde deutlich, dass durch die Veränderung der Zellverhältnisse von Panc89-Holoklon- zu Panc89-Paraklonzellen ein zunehmender Anteil an Paraklonzellen mit einer weniger effektiven Migration einherging, während ein hoher Anteil an Holoklonzellen einen schnellen Spaltverschluss begünstigte.

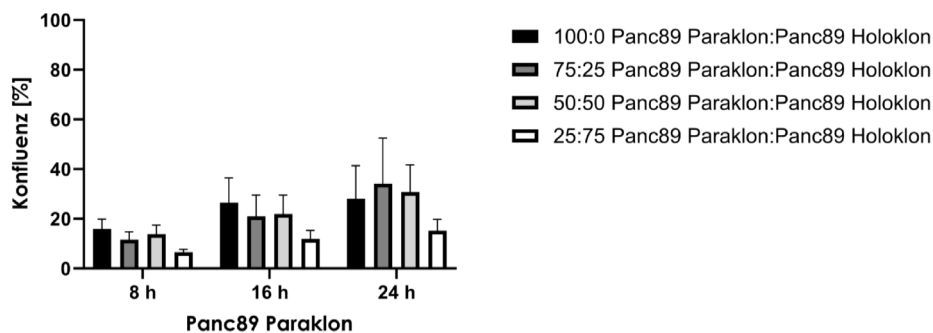
In der mikroskopischen Auswertung konnten wie zuvor beobachtet nur wenige Paraklonzellen im Spalt nachgewiesen werden, während die Holoklonzellen auch in den unterschiedlichen Zellverhältnissen eine kollektive Migration in den Spalt zeigten. Dabei waren sie sogar in der Lage, Paraklonzellen mit in den Spalt zu dirigieren (weißer Pfeil, Abbildung 12C).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Annahme, dass vor allem die CSC-assoziierten Holoklonzellen die Migration der Panc89-Zellen vermitteln, während die Nicht-CSC-assoziierten Paraklonzellen eine untergeordnete Rolle im Migrationsprozess spielen. Darüber hinaus weisen die Daten darauf hin, dass epitheliale Panc89-Holoklonzellen die weniger migrationsfähigen Panc89-Paraklonzellen durch direkte Zellkontakte zur Migration befähigen.

A)



B)



C)

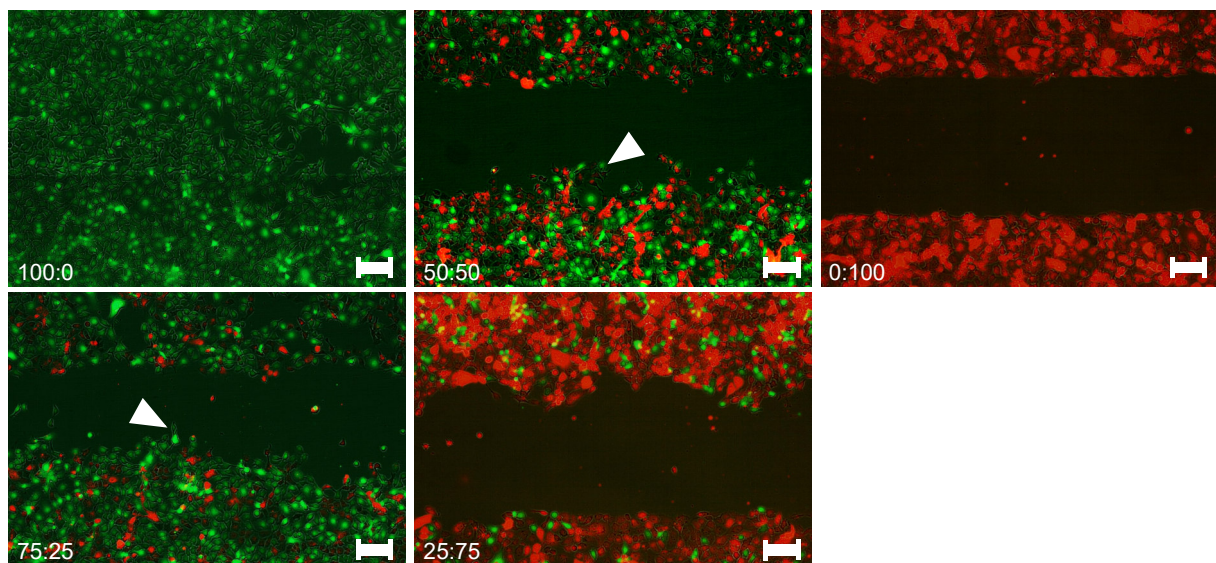


Abbildung 12: Panc89-Holoklonzellen beeinflussen das Migrationsverhalten der Panc89-Paraklonzellen durch direkte Interaktion. Vor dem Migrationsassay wurden die Panc89-Holoklonzellen mit dem Farbstoff CellTracker® Green CMFDA und die Panc89-Paraklonzellen mit dem Farbstoff CellTracker® DeepRed gefärbt. Die für die einzelnen Verhältnisse (100 A%, 75 %/25 %, 50 %/50 %, 25 %/75 %) erforderliche Zellzahl wurde errechnet und die Zellen dementsprechend in die Kavitäten der Ibidi®-Zellkultureinsätze ausgesät, sodass die Gesamtzahl der kultivierten Zellen 5×10^4 betrug. Im Anschluss erfolgte die Messung der Zellkonfluenz im Spalt für die grün- und rot fluoreszierenden Panc89-Zellvarianten zu den Zeitpunkten $t = 0, 8, 16$ und 24 Stunden. Die Zellmigration der A) Panc89-Holoklonzellen sowie der B) Panc89-Paraklonzellen ist dargestellt als Mittelwerte der prozentualen Zellkonfluenz im Spalt mit SEM von $n = 5$ unabhängigen Versuchen. In der Legende sind die unterschiedlichen Verhältnisse gezeigt. Darüber hinaus sind in C) repräsentative Aufnahmen des Spalts zu dem Zeitpunkt $t = 24$ Stunden mit den grün-fluoreszierenden Panc89-Holoklonzellen und den rot-fluoreszierenden Panc89-Paraklonzellen in den verschiedenen Zellverhältnissen dargestellt. Die weißen Pfeile markieren exemplarisch Panc89-Holoklonzellen, welche die Migration in den Spalt dirigieren und über Zell-Zell-Kontakte sowohl mit anderen Panc89-Holoklonzellen als auch mit Panc89-Paraklonzellen verbunden sind. Maßstab = $100 \mu\text{m}$.

3.2 Adhäsionsverhalten

Neben der Fähigkeit zur Zellmigration stellt auch die Zelladhäsion der Tumorzellen an Endothelzellen der Zweitmanifestationsorgane einen wichtigen Schritt in der Metastasierungskaskade dar (Makrilia et al. 2009). Um zu untersuchen, ob sich Panc1- und Panc89-Zellvarianten hinsichtlich ihrer Adhäsion an Lungenendothelzellen unterscheiden, wurde ein Adhäsionsassay mit der humanen Lungenendothelzelllinie HuLEC-5a durchgeführt und die Adhäsion der sechs PDAC-Zellvarianten eine und vier Stunden nach Aussaat auf die HuLEC-5a-Zellen bestimmt. Darüber hinaus erfolgte in weiterführenden Experimenten die Aussaat der PDAC-Zellvarianten nach Konditionierung der Lungenendothelzellen durch KM der PDAC-Zellvarianten.

3.2.1 Panc1-Zellvarianten adhären geringer an Lungenendothelzellen als Panc89-Zellvarianten

Die parentalen Panc1-Zellen und die Panc1-Holoklonzellen zeigten ein ähnliches Adhäsionsverhalten an die HuLEC-5a-Zelllinie. Nach einer Stunde betrug die Adhäsionsrate für die parentale Zellpopulation 50,44 % und für die Holoklon-Population 49,95 %. Die

Adhäsionsrate der Paraklon-Population war etwas niedriger und betrug 37,75 %. Nach vier Stunden war eine leichte Zunahme in allen drei Panc1-Zellvarianten auf 55,53 %, 60,93 % bzw. 51,62 % zu verzeichnen. Die Zunahme der adhärenenten Zellen lag damit für die parentalen Panc1-Zellen bei 5,09 %, für die Holoklon-Variante bei 10,98 % und für die Paraklon-Variante bei 13,87 % (Abbildung 13A).

Die Panc1-Paraklonzellen zeigten damit den höchsten Anstieg der Adhärenz über die Zeit, obwohl die stärkste Adhärenz bei den Panc1-Holoklonzellen gemessen werden konnte.

Alle Panc89-Zellvarianten zeigten ein zueinander ähnliches Adhäsionsverhalten an die Lungenendothelzellen. Nach einer Stunde adhärten 69,38 % der parentalen Population, 73,74 % der Holoklonzellen und 68,45 % der Paraklonzellen am Lungenendothel. In der zweiten Messung erhöhte sich dieser Anteil leicht auf 79,5 %, 80,35 % und 80,24 %. Die gesamte Zunahme der adhärenenten Zellen betrug damit für die parentale Panc89-Population 10,12 %, für die Holoklon-Population 6,61 % und für die Paraklon-Population 11,79 % (Abbildung 13B).

Beim Vergleich der PDAC-Zellen zeigte sich ein signifikant besseres Adhäsionsverhalten der Panc89-Zellvarianten im Vergleich zu den Panc1-Zellvarianten zu allen untersuchten Zeitpunkten und für jede einzelne Zellpopulation (Abbildung 13C).

Diese Daten weisen darauf hin, dass der Unterschied in der Adhäsionsfähigkeit vom CSC-Phänotyp unabhängig zu sein scheint und eher durch den EMT-Phänotyp bestimmt wird, da alle epithelialen Panc89-Zellvarianten unabhängig von ihrem CSC-Phänotyp signifikant besser an der Lungenendothelzelllinie HuLEC-5a adhärten als die mesenchymalen Panc1-Zellvarianten.

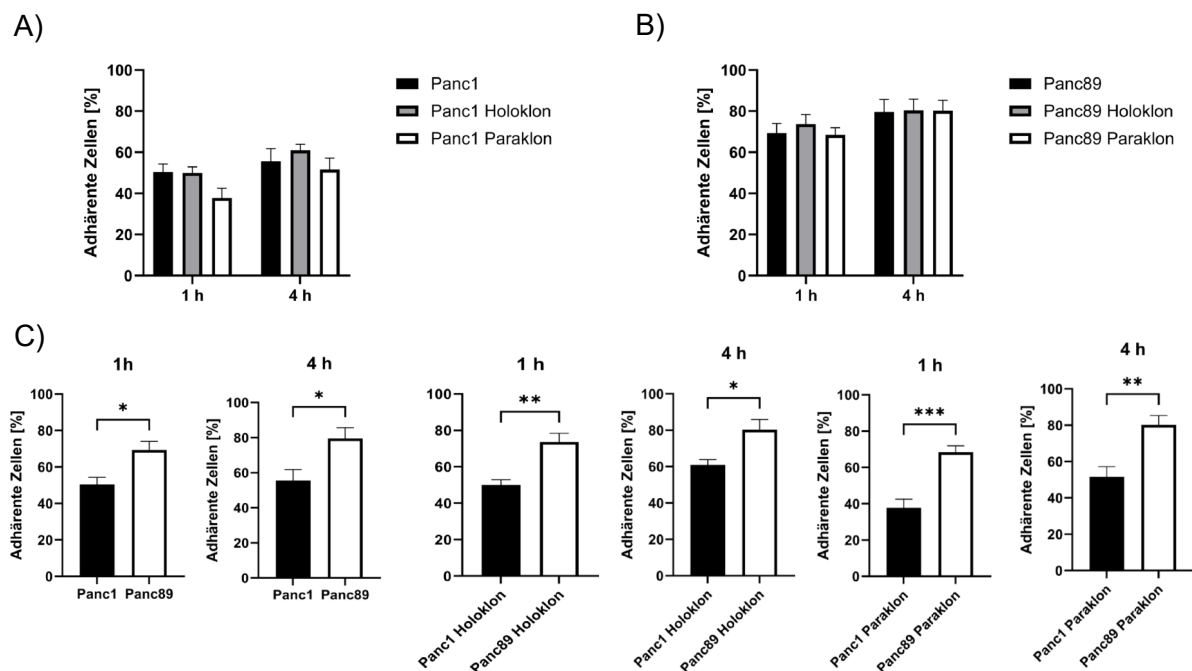


Abbildung 13: Panc1-Zellvarianten adhären signifikant weniger an Lungenendothelzellen als Panc89-Zellvarianten. Es erfolgte die Aussaat von 1×10^5 HuLEC-5a-Zellen. Nach 24 Stunden wurden 1×10^4 der fluoreszenzmarkierten PDAC-Zellvarianten ausgesät und die Adhäsionsfähigkeit an den Lungenendothelzellen nach 1 und 4 Stunden Adhäsionszeit bestimmt. Die Zelladhäsion der A) Panc1-Zellvarianten sowie der B) Panc89-Zellvarianten ist dargestellt als Mittelwerte der prozentualen Zelladhäsion mit SEM nach $t = 1$ und 4 Stunden von $n = 3$ unabhängigen Experimenten. Darüber hinaus wird C) die Adhärenz der parentalen sowie der CSC bzw. Nicht-CSC-Zellvarianten der Panc1- und Panc89-Zellen verglichen.

Die Daten wurden statistisch mithilfe eines unabhängigen Zwei-Stichproben-t-Tests analysiert. Signifikanzniveau $p^* < 0,05$, $^{**} < 0,01$, $^{***} < 0,001$.

3.2.2 Keine Beeinflussung der Adhäsionsfähigkeit der Panc1- und Panc89-Zellvarianten an Lungenendothelzellen nach Stimulation der Lungenendothelzellen mit konditionierten Medien

Als nächstes wurde untersucht, ob das Adhäsionsverhalten der PDAC-Zellen an die Lungenendothelzellen durch eine Vorinkubation der HuLEC-5a-Zellen mit KM der PDAC-Zellvarianten im Sinne einer Vorbereitung der Metastasierung beeinflusst wird. Dafür wurden die Lungenendothelzellen für 48 Stunden mit den KM der jeweils zu untersuchenden Zellvariante inkubiert, bevor die Adhäsion untersucht wurde. Als Kontrolle diente das Standard-Medium der Lungenendothelzellen.

Alle sechs Zellvarianten zeigten unter Kontrollbedingungen ähnliche Adhäsionswerte wie bereits in Versuch 3.2.1 beschrieben.

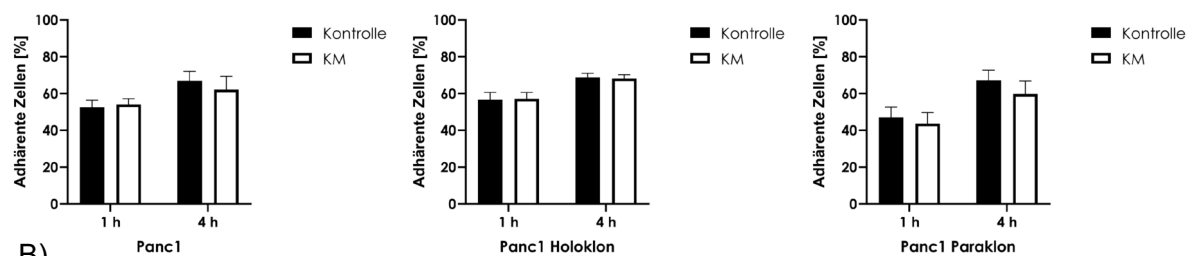
Die Adhärenz an Lungenendothelzellen nach Vorinkubation dieser mit KM betrug für die parentalen Panc1-Zellen nach einer Stunde 54,1 % und nach vier Stunden 62,18 %. Der Anteil der an Lungenendothelzellen adhären Panc1-Holoklonzellen und Panc1-Paraklonzellen lag nach einer Stunde bei 57,24 % bzw. 43,74 % und stieg nach vier Stunden auf 68,18 % bzw. 59,81 % an. Der Gesamtanstieg für die drei Panc1-Zellvarianten unter der KM-Bedingung lag bei 8,08 %, 10,94 % bzw. 16,07 % (Abbildung 14A).

Die Panc89-Zellvarianten verzeichneten unter der KM-Bedingung nach einer Stunde eine Adhäsion von 64,59 % bei den parentalen Zellen, 65,34 % bei den Holoklonzellen und 63,14 % bei den Paraklonzellen. Nach vier Stunden zeigte sich ein Anstieg in allen drei Panc89-Zellvarianten auf 78,46 %, 75,77 % bzw. 77,95 %. Insgesamt wurde eine Steigerung um 13,87 %, 10,43 % bzw. 14,81 % gemessen (Abbildung 14B).

Die Adhäsionsanalyse der PDAC-Zellvarianten ergab somit unter Standardbedingungen verglichen mit den Adhäsionswerten nach Stimulation der Lungenendothelzellen mit KM weder

eine schnellere noch eine stärkere Zelladhäsionsfähigkeit durch die Vorinkubation der HuLEC-5a-Zellen mit den KM der PDAC-Zellvarianten.

A)



B)

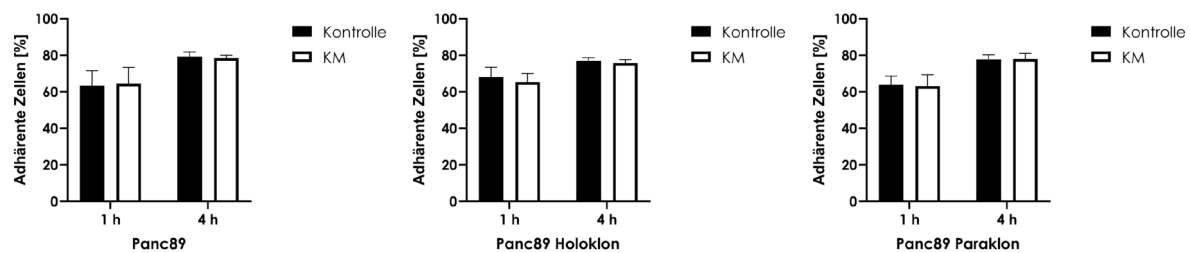


Abbildung 14: Die Vorkonditionierung der Lungenendothelzellen durch konditioniertes Medium der PDAC-Zellvarianten hat keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit. Es erfolgte die Aussaat von 1×10^5 HuLEC-5a-Zellen. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen entweder mit ihrem eigenen Medium (Kontrolle) oder mit konditionierten Medien (KM) der jeweiligen PDAC-Zellvariante für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneut gewechselt und es erfolgte die Aussaat von 1×10^4 fluoreszenzmarkierten parentalen Panc1- und Panc89-Zellen oder ihrer Holoklon- und Paraklonvarianten auf die entsprechend konditionierten HuLEC-5a-Zellen. Die Adhäsion der PDAC-Zellen wurde nach $t = 1$ und 4 Stunden gemessen. Die Zelladhäsion der A) Panc1-Zellvarianten sowie der B) Panc89-Zellvarianten ist dargestellt als Mittelwerte der prozentualen Zelladhäsion mit SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Um zu untersuchen, ob parakrine Faktoren der CSC-Populationen das Lungenendothel konditionieren und darüber die Adhäsionsfähigkeit der Nicht-CSC-Zellen an das Lungenendothel beeinflussen und umgekehrt, wurden HuLEC-5a-Zellen mit KM der Holo- und Paraklonzellen beider PDAC-Zelllinien für 48 Stunden inkubiert, bevor der Adhäsionsassay durchgeführt wurde.

In der Holoklonvariante der Panc1-Zelllinie zeigte sich nach Stimulation der HuLEC-5a-Zellen mit dem Holoklon-KM eine Adhärenz von 59,94 % nach einer Stunde und von 66,29 % nach vier Stunden. Im Vergleich dazu wurde nach Konditionierung der Lungenendothelzellen mit KM der Panc1-Paraklonzellen eine ähnliche Adhärenz der Panc1-Holoklone von 58,21 % nach einer Stunde und 68,13 % nach vier Stunden gemessen. Der Gesamtanstieg lag somit bei

6,35 % bzw. 9,92 %. Für die Paraklonvariante der Panc1-Zelllinie betrug die Adhärenz nach einer Stunde an den HuLEC-5a-Zellen nach Konditionierung mit KM der Panc1-Holoklonzellen 60,46 %, aber nur 53,45 %, wenn die Lungenendothelzellen zuvor mit den KM der Panc1-Paraklonzellen konditioniert worden waren. Nach vier Stunden lag die Adhärenz der Panc1-Paraklonzellen bei 69,96 % bzw. 70,17 %. Die Gesamtzunahme der Adhärenz an die Lungenendothelzellen für die Panc1-Paraklonvariante betrug somit 9,5 % nach Konditionierung mit dem eigenen KM, aber 16,72 % nach Konditionierung mit dem Holoklon-KM (Abbildung 15A).

Die Panc89-Holoklonzellen verzeichneten eine ähnliche Adhärenz an den Lungenendothelzellen nach einer Stunde. Nach Konditionierung der HuLEC-5a-Zellen mit Holoklon-KM lag diese bei 62,25 % und nach Konditionierung mit Paraklon-KM bei 62,11 %. Im Verlauf des Versuches kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg der Adhärenz auf 66,1 % bzw. 69,33 % nach vier Stunden. Die Gesamtzunahme zwischen den beiden Messzeitpunkten lag somit bei 3,85 % bzw. 7,22 %. Die Panc89-Paraklonzellen zeigten nach Konditionierung der HuLEC-5a -Zellen durch Holoklon-KM eine Adhärenz von 71 %, während die Konditionierung mit KM der Paraklonzellen zu einer Adhärenz von 75,48 % führte. Nach vier Stunden stieg der Adhäsionswert auf 75,28 % bzw. 76,91 % an. Dabei zeigte sich ein Gesamtanstieg von 4,28 % bzw. 1,43 % (Abbildung 15B).

In der Zusammenschau zeigen die Ergebnisse, dass eine Konditionierung der HuLEC-5a-Zellen durch KM der Panc1- und Panc89-Zellvarianten keinen bedeutenden Effekt auf die Adhäsionsfähigkeit dieser Zellpopulationen hat.

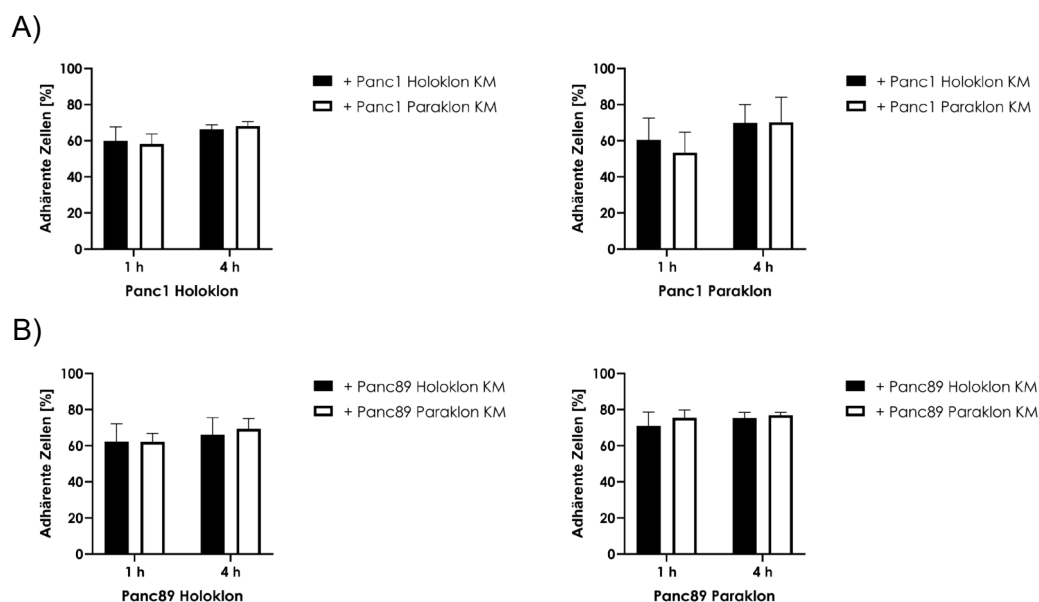


Abbildung 15: Parakrine Faktoren in konditionierten Medien haben keinen Einfluss auf die Adhäsionsfähigkeit der CSC- bzw. Nicht-CSC-Populationen der PDAC-Zellvarianten.

Es erfolgte die Aussaat von 1×10^5 HuLEC-5a-Zellen. Nach 24 Stunden wurde das Medium

gewechselt und die Zellen entweder mit dem konditioniertem Medium (KM) der CSC (Holoklon)- oder Nicht-CSC (Paraklon)-Variante der jeweiligen PDAC-Zelllinie für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium erneut gewechselt und es erfolgte die Aussaat von 1×10^4 fluoreszenzmarkierten Panc1- und Panc89-Holoklon- bzw. Paraklonzellen auf die entsprechend konditionierten HuLEC-5a-Zellen. Die Adhäsion der PDAC-Zellen wurde nach $t = 1$ und 4 Stunden gemessen. Die Zelladhäsion der A) Panc1-Zellvarianten sowie der B) Panc89-Zellvarianten ist dargestellt als Mittelwerte der prozentualen Zelladhäsion mit SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Das PDAC geht aufgrund seiner frühen Metastasierungstendenz und ausgeprägten Therapieresistenz mit einer infausten Prognose einher. Dabei ist bei einem Großteil der Patienten bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine lokale Invasion oder eine Filialisierung in Sekundärorgane nachweisbar (Mizrahi et al. 2020).

In den letzten Jahren haben sich bei verschiedenen Krebsentitäten vielversprechende Therapieoptionen zur Behandlung von Metastasen etabliert. Beim PDAC jedoch stellt weiterhin die palliative Chemotherapie mit FOLFIRINOX oder Gemcitabin und nab-Paclitaxel den Standard in der metastasierten Situation dar (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Pathogenese der Metastasierung beim PDAC genauer zu entschlüsseln, um in Zukunft neue und effektivere Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

Ziel dieser Dissertation war es das Migrations- und Adhäsionsverhalten an Lungenendothelzellen von zwei PDAC-Zelllinien und ihrer jeweiligen Subpopulationen zu untersuchen. Dabei wurde gezielt das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit ihrer EMT- und CSC-Eigenschaften charakterisiert.

4.1 Migrationsverhalten der PDAC-Zellvarianten

4.1.1 Migrationsverhalten von PDAC-Zellvarianten in Abhängigkeit ihres EMT- und CSC-Status

Zu allen Zeitpunkten war die Migrationstendenz der Panc89-Zellvarianten im Vergleich zu den Panc1-Zellvarianten signifikant besser (siehe Abschnitt 3.1.1).

Für die parentalen Panc1-Zellen sowie ihre Subpopulationen konnte dabei gezeigt werden, dass sie nicht in der Lage waren, den Wundspalt innerhalb von 32 Stunden zu schließen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Arbeiten (Hu et al. 2023; Shao et al. 2020). Die vergleichende Analyse der Panc1-Zellvarianten untereinander ergab wiederum, dass die parentalen Panc1-Zellen die ausgeprägteste Tendenz zur Migration aufwiesen. Es liegt deshalb nahe, dass die interklonale Kooperation verschiedener Subpopulationen von größerer Bedeutung für ihre Migrationsfähigkeit ist als das Vorhandensein einer homogenen, mesenchymal-differenzierten Zellpopulation (Neelakantan et al. 2015).

Die Panc89-Holoklonzellen waren hingegen in der Lage, den Wundspalt innerhalb von 32 Stunden vollständig zu schließen. Die parentalen Panc89-Zellen sowie die Panc89-

Paraklonzellen präsentierten hingegen nur eine Konfluenz von 75 % bzw. 50 % nach 32 Stunden.

In anderen Studien konnten für die parentalen Panc89-Zellen Konfluenzraten von ca. 90 % nach 7 Stunden bzw. 60 % nach 20 Stunden bzw. 45 % nach 24 Stunden gezeigt werden (Borchardt et al. 2019; Boukrout et al. 2021; Hedemann 2013). Anzumerken ist, dass in den genannten Studien die Versuchsbedingungen variierten, da die Tumorzellen teilweise mit verschiedenen Substanzen vorbehandelt wurden. Insgesamt stehen die Konfluenzraten der Panc89-Zellen in dieser Arbeit jedoch im Einklang mit der Literatur und weisen auf einen migratorischen Phänotyp hin.

Die signifikant höhere Migrationstendenz aller Panc89-Zellen im Vergleich zu den Panc1-Zellen lässt die Schlussfolgerung zu, dass vor allem der divergente EMT-Status für dieses Verhalten verantwortlich ist. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass in Invasionsversuchen in eine EZM mit denselben Zellvarianten der CSC-Status ebenfalls keinen wesentlichen Einfluss auf das Invasionsverhalten der Panc1- und Panc89-Zellen hatte (A. Surrow, unveröffentlichte Dissertation; Philipp et al. 2024). In den genannten Versuchen konnte allerdings eine bessere Invasionsfähigkeit der Panc1-Zellvarianten im Vergleich zu den Panc89-Zellvarianten beobachtet werden. Das bessere Invasionsverhalten der Panc1-Zellen lässt sich wohlmöglich dadurch erklären, dass diese als mesenchymal-geprägte, einzelne Zellen einfacher in die EZM eindringen können als epitheliale Tumorzellverbände, wie sie bei den Panc89-Zellen beobachtet wurden. Darüber hinaus sind mesenchymale Zellphänotypen in der Lage, durch die Produktion von MMPs eine Degradation der EZM zu bewirken, was die Invasion vereinfacht (Friedl und Wolf 2003; Philipp et al. 2024).

Eine gesteigerte Migrationstendenz in Assoziation mit dem CSC-Phänotyp konnte lediglich für die Sox2-dominante Holoklonpopulation der Panc89-Zelllinie festgestellt werden. Die Nestin-dominante Panc1-Holoklonvariante wies hingegen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur parentalen Panc1- bzw. Panc1-Paraklonzellvariante auf und migrierte von allen untersuchten Zellvarianten sogar am wenigsten in den Spalt. Dies unterstreicht die Annahme, dass der Stammzellcharakter von geringerer Bedeutung für die Migration ist als der EMT-Phänotyp.

Für den CSC-Marker Sox2 lässt sich vermuten, dass er im Hinblick auf die Migrationstendenz der Panc89-Holoklonvariante eine gewisse Rolle spielt. Diese Annahme kann damit begründet werden, dass die Sox2-dominierten Panc89-Holoklonzellen die stärkste Migrationstendenz aller untersuchten Zellvarianten in den Spalt zeigten. Um den Zusammenhang von Sox2 und dem Migrationsverhalten der Panc89-Zellvarianten jedoch genauer zu eruieren, ist es notwendig, Studien mit Zellen durchzuführen, in denen die Sox2-Expression unterdrückt ist (z.B. mit einem *small interfering RNA (siRNA)* oder *small hairpin RNA (shRNA)* vermitteltem *Knockdown* (KD) von Sox2).

Ferner ist zu berücksichtigen, dass der divergente Ursprung der Zelllinien einen Einfluss auf die unterschiedliche Migrationstendenz haben könnte. Der Ursprung der parentalen Panc1-Zelllinie ist ein primäres PDAC des Pankreaskopfes mit positiver Perineuralscheideninvasion und einer peripankreatischen Lymphknotenmetastase (Lieber et al. 1975). Die parentale Panc89-Zellpopulation hingegen stammt aus einem peripankreatischen Lymphknoten eines bereits in die Leber metastasierten Pankreaskopfkarzinoms (Okabe et al. 1983). Außerdem weisen die Panc1-Zellen eine geringe Differenzierung auf, wohingegen die Panc89-Zellen durch eine moderate Differenzierung charakterisiert sind (Sipos et al. 2003). Obgleich ein niedriger Differenzierungsgrad mit einer höheren Wachstumsrate, Metastasierungswahrscheinlichkeit sowie einer schlechteren Prognose einhergeht, wies der Tumor des Patienten, aus dem die Panc1-Zelllinie generiert wurde, im Gegensatz zu dem Tumor des Patienten, aus dem die Panc89-Zelllinie generiert wurde, klinisch ein niedrigeres Tumorstadium auf (Lieber et al. 1975; Okabe et al. 1983). In der Zusammenschau dieser Informationen kann spekuliert werden, dass die Tumorzellen im Primärtumor, aus dem die Panc1-Zellen isoliert wurden, zwar eine EMT durchlaufen haben, jedoch noch keine erfolgreiche Fernmetastasierung stattgefunden hat. Im Gegensatz dazu haben Tumorzellen, aus denen die Panc89-Zellen isoliert wurden, nach erfolgreicher Metastasierung in Lymphknoten eine MET durchlaufen oder einen E/M-Phänotyp im Metastasierungsprozess angenommen, welcher vorteilhafter für das Auswachsen in sekundären Organen ist (Jolly et al. 2019). Der Nachweis der kollektiven Migration in den Panc89-Zellvarianten, die signifikant besser als die Einzelzellmigration der Panc1-Zellvarianten war, unterstützt diese Hypothese. Neben den geno- und phänotypischen Unterschieden sind auch bereits funktionelle Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit verwendeten parentalen Populationen beschrieben worden. In der Arbeit von Monti et al. wurden beispielsweise zwölf verschiedene PDAC-Zellpopulationen, darunter auch die in dieser Arbeit verwendeten Zellen, hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens sowie ihrer Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Zytostatika untersucht und Unterschiede festgestellt (Monti et al. 2004).

Auch unsere Arbeitsgruppe konnte Unterschiede zwischen den Zellpopulationen hinsichtlich der Wachstumsraten *in vitro* und *in vivo* sowie der Ansprechrate auf das Zytostatikum Gemcitabin feststellen. Die Untersuchung des Zellwachstums der epithelialen Panc89-Zellvarianten im Vergleich zu den mesenchymal-differenzierten Panc1-Zellvarianten aber auch den E/M-assoziierten Panc89-Paraklonzellen ergab, dass die epithelialeren Tumorzellen eine höhere Wachstumsrate und damit auch ein besseres Ansprechen auf Gemcitabin aufwiesen (Philipp et al. 2024). Diese Beobachtungen stehen somit im Einklang mit dem proliferationsfähigeren Charakter epithelialer Zellen (Joshi et al. 2023). In Metastasierungsmodellen *in vivo* konnte darüber hinaus eine höhere Anzahl makroskopisch detektierbarer Metastasen beobachtet werden, wenn epitheliale Panc89-Zellvarianten,

insbesondere Panc89-Holoklonzellen, den Versuchstieren intralinal injiziert wurden. Die Hauptlast der Metastasen war dabei hauptsächlich im Peritoneum zu detektieren. Dagegen wiesen die mesenchymal-differenzierten Panc1-Holoklonzellen eine höhere Mikrometastasierungsrate auf und die Metastasen waren vor allem auf das Pankreas begrenzt (Philipp et al. 2024).

Unter Berücksichtigung des Ursprungs beider Zelllinien sowie der Kenntnis über die Ausprägung von epithelialen bzw. mesenchymalen Markern in den einzelnen Zellvarianten lässt sich ableiten, dass der EMT-assoziierte Phänotyp der aus dem Primärorgan stammenden Panc1-Zellen durch seine niedrigere Wachstumsrate zu einer geringeren makroskopischen Tumorlast geführt hat, welche sich primär auf das Pankreas konzentrierte. Im Gegensatz dazu konnten die bereits metastasierten epithelialeren Panc89-Zellen nicht nur zur Ausbildung von größeren Tumoren führen, sondern waren auch durch die Lokalisation außerhalb des Pankreas, insbesondere im Peritoneum, charakterisiert. Es kann somit spekuliert werden, dass in der Frühphase der Metastasierung des PDAC ein mesenchymaler Phänotyp im Primarius vorteilhafter ist, um die erste Aussaat von malignen Tumorzellen in das unmittelbare TME zu ermöglichen und damit die Absiedlung von Tumorzellen in fremde Organe vorzubereiten. Im weiteren Verlauf sind dann epitheliale Faktoren für das kollektive und wohlmöglich effektivere Auswandern aus dem Primärorgan sowie das Überleben und Auswachsen von Sekundärtumoren notwendig (Jolly et al. 2019). Diese Annahme wird unter anderem durch das bessere Migrations- und Adhäsionsverhalten, die bessere Wachstumsrate und durch die höhere *in vivo* Tumorlast der Panc89-Zellvarianten im Vergleich zu den Panc1-Zellvarianten gestützt (Philipp et al. 2024).

Die Analyse des Migrationsmodus der parentalen Panc1- und Panc89-Zelllinien sowie ihrer Subpopulationen zeigte ebenfalls Unterschiede.

Die Panc1-Zellvarianten migrierten in Übereinstimmung mit ihrem mesenchymalen Phänotyp als Einzelzellen, während die Panc89-Zellvarianten eine Migration vorwiegend als epitheliales Zellkollektiv aufwiesen (siehe Abschnitt 3.1).

Lian et al. postulierten dagegen für die parentalen Panc1-Zellen eine Migration als kollektive Zellverbände (Lian et al. 2020). Die unterschiedlichen Befunde könnten dadurch erklärt werden, dass in der genannten Arbeit kein konventioneller Wundheilungsassay durchgeführt wurde, sondern die Beweglichkeit der Zellen in Form eines Einzelzell-Motilitäts-Assays erfasst wurde. Außerdem wurden die Panc1-Zellen in der genannten Studie mit einer shRNA vorbehandelt.

Mesenchymale Zellen migrieren und invadieren in der Regel als Einzelzellen und nicht als Kollektiv, sodass das in dieser Arbeit für die Panc1-Zellvarianten beobachtete Migrationsverhalten damit im Einklang steht (Friedl und Wolf 2003). Darüber hinaus wurde für

die Panc1-Zellen eine Invasion in Form einzelner Zellen beobachtet, was ebenfalls mit dem mesenchymalen Charakter dieser Zellen übereinstimmt (A. Surrow, unveröffentlichte Dissertation; Philipp et al. 2024).

Die Charakterisierung des Migrationsmodus der Panc89-Zellvarianten hingegen ergab, dass die Migration vorwiegend als Zellkollektiv stattfindet. Innerhalb der migrierten Zellkollektive waren entsprechend zahlreiche Zellen durch eine hohe Expression des epithelialen Membranproteins E-Cadherin charakterisiert (siehe Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3). Obgleich ein Verlust von E-Cadherin häufig mit einer gesteigerten Motilität assoziiert wurde (Mendonsa et al. 2018), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression dieses epithelialen Markers mit einer stärkeren Migration verbunden war. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls zeigen konnten, dass das Beibehalten epithelialer Eigenschaften mit einer besseren Metastasierungsfähigkeit einhergehen kann (Carstens et al. 2021; Fischer et al. 2015; Jolly et al. 2016, 2019). In der Arbeit von Aiello et al. konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass im Bereich mit direkten Zell-Zell-Kontakten innerhalb kollektiver Tumorzellverbände E-Cadherin exprimiert wird, während die äußeren Zellen dieser kollektiven Tumorzellverbände keine E-Cadherin-Expression aufweisen. Die Expression von E-Cadherin in diesen E/M-Zellen änderte sich nicht durch eine transkriptionelle Herunterregulation, sondern durch Endozytose und Internalisierung in den Bereichen ohne direkte Zell-Zell-Kontakte. Die Beibehaltung epithelialer Eigenschaften in selektiven Bereichen der Tumorzellverbände spiegelt somit die Möglichkeit einer schnellen Relokation der E-Cadherin-Expression auf der Zellmembran und somit die rasche Adaptationsfähigkeit im Rahmen der Metastasierung wider und kann als Hinweis auf die zelluläre Plastizität innerhalb der EMT-MET-Achse angesehen werden (Aiello et al. 2018). Diese zelluläre Plastizität innerhalb der EMT-MET-Achse in den Panc89-Zellen erlaubt wohlmöglich die Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen und vereint die Vorteile epithelialer und mesenchymaler Differenzierungsgrade (Jolly et al. 2019). Es ist daher denkbar, dass auch bei den Panc89-Zellen die Veränderung der biologischen Aktivität von E-Cadherin auf der Zelloberfläche die Migration beeinflusst, da innerhalb der migrierten Tumorzellverbände einige Zellen keine E-Cadherin-Expression mehr aufwiesen (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3). Gleichzeitig ermöglicht die Aufrechterhaltung der membranständigen E-Cadherin-Expression in Bereichen mit direktem Zell-Zell-Kontakt die Integrität der Tumorzellverbände, was eine effektivere Besiedlung verschiedener Zellklone in Sekundärorgane mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften zur Folge hat (Friedl und Gilmour 2009). Diese Annahme wird ebenfalls durch die Beobachtung gestützt, dass nicht alle Panc89-Zellen innerhalb der migrierten Zellverbände eine vollständige Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche aufwiesen (siehe Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3). So zeigte sich auch in den Migrationsversuchen aus Abschnitt 3.1.6, dass in den Spalt migrierende Panc89-Holoklonzellen teilweise von Panc89-

Paraklonzellen begleitet wurden, welche eine geringere E-Cadherin-Expression aufweisen. Darüber hinaus wird diese Annahme durch die höhere Makrometastasenlast im Vergleich zu den Panc1-Zellvarianten unterstützt (Philipp et al. 2024). In einer Übersichtsarbeit von Cheung und Ewald wird ein Modell postuliert, das die Bedeutung epithelialer Membranproteine für die Metastasierung zirkulierender Tumorzellverbände verdeutlicht. Heterogene Tumorzellpopulationen, die aus dem Primarius durch Absiedlung kooperierender polyklonaler Tumorzellen hervorgehen und zu polyklonalen Metastasen führen, werden durch die Expression epithelialer Adhäsionsmoleküle zu einer effektiveren Dissemination befähigt (Cheung und Ewald 2016). Die Bedeutung von E-Cadherin für diese Hypothese sollte daher in zukünftigen Studien genauer erörtert werden.

4.1.2 Panc89-Zellvarianten beeinflussen sich nicht gegenseitig über lösliche Faktoren in ihrem Migrationsverhalten

In einer Vielzahl von Studien konnte bereits gezeigt werden, dass stromale Komponenten aber auch Tumorzellen selbst durch Sekretion von parakrinen Faktoren das Verhalten von malignen Zellen sowohl im Primarius als auch in metastasierten Organen erheblich beeinflussen können (Group Young Researchers in Inflammatory Carcinogenesis et al. 2021; Neelakantan et al. 2015).

Um zu untersuchen, ob die Migrationsfähigkeit der Panc89-Zellen auch durch sezernierte Botenstoffe der jeweiligen Tumorzellvarianten beeinflusst wird, wurden beide Panc89-Zellvarianten mit ihrem eigenen sowie mit dem KM der jeweils anderen Panc89-Zellvariante inkubiert. Hierbei wurde eine insgesamt geringere Migrationstendenz in den Spalt beobachtet, ohne dass Unterschiede zwischen den Panc89-Zellvarianten festgestellt werden konnten (siehe Abschnitt 3.1.4).

Diese Beobachtung wurde durch den Versuch in Abschnitt 3.1.5 bestätigt. Die parallele Aussaat beider Panc89-Zellvarianten in gegenüberliegenden Kammern hat keine signifikanten Unterschiede auf das Migrationsverhalten der Panc89-Zellvarianten zeigen können.

In Zusammenschau der Ergebnisse aus den beiden oben genannten Versuchen lässt sich somit schlussfolgern, dass die Migrationsfähigkeit der Panc89-Holoklon- und Paraklonzellen nicht durch eine klonale Kooperation im Sinne einer parakrinen Wechselwirkung zwischen den beiden Tumorzellpopulationen beeinflusst wird.

4.1.3 Die Panc89-Holoklonzellen sind der Treiber des ausgeprägten Migrationsverhaltens der Panc89-Zellvarianten

Die Vielfalt und Variabilität der geno- und phänotypischen Eigenschaften von Zellen innerhalb eines einzelnen Tumors wird als intratumorale Heterogenität bezeichnet. Subpopulationen

interagieren miteinander und tragen zur Aufrechterhaltung und Progression von malignen Tumorerkrankungen bei. Im Verlauf der Karzinogenese führt die klonale Selektion zur Expansion besonders maligner metastasierungsfähiger Zellpopulationen. Zu diesen Subpopulationen gehören neben metastasierungsfähigen EMT-assoziierten Klonen auch die CSCs (Singh und Settleman 2010). Die Subpopulation der CSCs spielt aufgrund ihrer tumorinitiierenden und resistenzfördernden Eigenschaften eine wichtige Rolle beim Therapieversagen und in der Rezidivsituation nach vermeintlich erfolgreicher Primärtherapie. Zudem ist sie im Rahmen der Metastasierung von Relevanz, da sie mit der EMT assoziiert ist (Prasetyanti und Medema 2017; Rodriguez-Aznar et al. 2019). Die Interaktion von EMT- und CSC-Merkmalen wird jedoch durch die Existenz einer zellulären Plastizität innerhalb der EMT-MET-Achse sowie der CSC- und Nicht-CSC-Achse verkompliziert (Marjanovic et al. 2013; Neelakantan et al. 2015). Diese Plastizität konnte bereits für die in dieser Arbeit untersuchten PDAC-Zellen in Abhängigkeit vom TME nachgewiesen werden. In der immunhistochemischen Analyse von Gewebeproben aus Mausmodellen wiesen einige Panc1- und Panc89-Zellen im Vergleich zu den *in vitro* Analysen unterschiedliche Expressionsmuster der EMT- und CSC-Marker auf (Philipp et al. 2024). Dies verdeutlicht die Fähigkeit von Subpopulationen, ihren Phänotyp durch Plastizität zu verändern und sich damit optimal an die jeweiligen Umgebungsbedingungen anzupassen. Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Zusammensetzung und funktionellen Fähigkeiten bestimmter Subpopulationen innerhalb einer Tumorzellpopulation zu verstehen. Die Bestimmung dieser Heterogenität erweist sich jedoch sowohl in experimentellen Studien als auch im klinischen Alltag vielfach als Herausforderung (Alizadeh et al. 2015; Davnall et al. 2012). Im Rahmen des Versuchs 3.1.6 wurde daher das Migrationsverhalten von Panc89-Zellvarianten in Abhängigkeit von ihrer klonalen Zusammensetzung aus den beiden Subpopulationen Panc89-Holoklon- und Panc89-Paraklonzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden Zellvarianten in definierten Anteilen in dieselbe Kavität der Ibidi®-Zellkultur-Einsätze ausgesät und ein Migrationsassay durchgeführt.

Es konnte beobachtet werden, dass die Migration der Tumorzellpopulationen in Abhängigkeit vom Anteil der Panc89-Holoklonzellen variiert. Zusätzlich wurde festgestellt, dass migrierende Tumorzellverbände sowohl Panc89-Holoklon- als auch Panc89-Paraklonzellen enthielten, wobei letztere an die Panc89-Holoklonzellen adhärten. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass der epitheliale CSC-assoziierte Phänotyp der Panc89-Holoklonvariante für die verstärkte Migration verantwortlich ist und gleichzeitig weniger migrationsfähige Tumorzellen durch direkte Zell-Zell-Interaktionen zur Migration befähigt (siehe Abschnitt 4.1). Die Expression von E-Cadherin auf der Oberfläche der E/M-assoziierten Panc89-Paraklonzellen ermöglichte vermutlich die interzelluläre Adhäsion an die migrationsfähigeren Panc89-Holoklonzellen. Im Gegensatz dazu scheinen die mesenchymalen Proteine L1CAM

und Vimentin, die ebenfalls von Panc89-Paraklonzellen exprimiert werden, keine funktionelle Bedeutung für die Migration dieser Zellen zu haben, da ein höherer Anteil an Panc89-Paraklonvarianten in den Kavitäten mit einer geringeren zellulären Konfluenz im Spalt assoziiert war. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen anderer Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Expression von L1CAM und Vimentin und einer erhöhten Motilität von Tumorzellen gezeigt haben (Danielsson et al. 2018; Kiefel et al. 2012a). Es ist daher denkbar, dass für die Panc89-Zellvarianten die Co-Expression von E-Cadherin und Sox2 eine wichtigere Rolle für die Zellmigration spielt als die Expression der mesenchymalen Markerproteine L1CAM und Vimentin (Hüser et al. 2018). Weitere Studien sollten diese Befunde in Zukunft genauer untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Studie legen insgesamt nahe, dass die Panc89-Holoklonvariante mit ihrem epithelialen CSC-assoziierten Phänotyp die Migrationsfähigkeit der Panc89-Zellen dominiert und nicht durch eine Akquirierung von mesenchymalen Eigenschaften im Rahmen einer zellulären Plastizität migratorische Eigenschaften annimmt. Es ist jedoch zu beachten, dass die gesamte Tumorzellpopulation nicht nur aus diesen beiden Subpopulationen besteht, sondern das weitere Zellklone existieren. Daher sollten die Ergebnisse dieser Untersuchung durch weitere Studien mit anderen Subpopulationen erweitert werden.

4.1.4 Unterscheidung von Proliferation und Migration im Migrationsassay

Eine Herausforderung bei *in vitro*-Migrationsuntersuchungen ist die Unterscheidung zwischen Zellmigration und Zellproliferation. Vor allem in 2D-Versuchen kann der Spaltverschluss, insbesondere bei der kollektiven Migration, auf eine Zellproliferation zurückzuführen sein. Um die Verfälschung der Ergebnisse durch dieses Phänomen zu reduzieren, gibt es verschiedene Modifikationen im Versuchsaufbau (Grada et al. 2017).

Eine Möglichkeit zwischen Proliferation und Migration zu unterscheiden, besteht darin, den Beobachtungszeitraum einer Versuchsreihe auf die Dauer einer vollständigen Zellteilung zu begrenzen (Grada et al. 2017). Idealerweise sollte der gesamte Beobachtungszeitraum kürzer sein als die Zellverdopplungszeit (Liang et al. 2007). Hierfür muss die Wachstumsrate der untersuchten Zellen bekannt sein. Für die parentale Zelllinie Panc1 ist eine Zellverdopplungszeit von 52 Stunden bekannt (Lieber et al. 1975), während die Zellverdopplungszeit der parentalen Panc89-Zelllinie bei 31 Stunden liegt (Okabe et al. 1983). In Versuchen unserer Arbeitsgruppe zur Charakterisierung der Wachstumsraten der Holo- und Paraklonvarianten zeigte sich ähnliche bzw. geringere Werte (Philipp et al. 2024), sodass zunächst ein Zeitraum von 32 Stunden für die Migrationsassays gewählt wurde. Nach den ersten Versuchen wurde dieser Zeitraum auf 24 Stunden reduziert, da die Panc89-

Holoklonzellen den Spalt bereits innerhalb der ersten 24 Stunden fast vollständig geschlossen hatten.

Um die Proliferationsfähigkeit der Tumorzellen noch weiter zu reduzieren, ist auch die Reduktion von FCS im Migrationsmedium möglich. Durch den Entzug von Nährstoffen kommt es zu einer Reduktion der Zellteilungsrate. Der Spaltschluss wird dann hauptsächlich durch eine Migration der Zellen bedingt (Grada et al. 2017; Liang et al. 2007). Allerdings kann diese Methode auch zu Veränderungen im funktionellen Verhalten führen, da eine Serumdeprivation eine intrazelluläre Stressreaktion hervorruft (Pirkmajer und Chibalin 2011). Da jedoch das Proliferationsverhalten von Panc1-Zellen unter Serumdeprivation bekannt ist (Giehl et al. 2000), wurde zusätzlich zur Begrenzung des Beobachtungszeitraums eine Serumdeprivation auf 0 % FCS durchgeführt. Ein vergleichbares Verhalten wurde für die Panc89-Zellen angenommen, die während der gesamten Versuche unter Serumdeprivation keine morphologischen Auffälligkeiten zeigten.

Eine weitere Möglichkeit, die Proliferation der Tumorzellen zu reduzieren, besteht darin, das als Zytostatikum verwendete Medikament Mitomycin C zu verwenden. Die Verwendung von Mitomycin C, das ursprünglich als Antibiotikum entwickelt wurde, führt durch Interkalation in die DNA zu einem Zellzyklusarrest und damit zu einer Hemmung der Proliferation (Tomasz 1995). Der Einsatz ist jedoch aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften mit möglicher Beeinflussung der zellulären Funktionen nicht immer möglich. Da bereits durch die Begrenzung des Beobachtungszeitraums sowie durch die Entfernung des FCS im Migrationsmedium die Proliferation der Tumorzellen erfolgreich reduziert wurde, wurde auf den Einsatz von Mitomycin C in dieser Arbeit verzichtet.

4.2 Adhäsionsverhalten der PDAC-Zellen an Lungenendothelzellen

4.2.1 Adhäsion an Lungenendothelzellen von PDAC-Zellvarianten in Abhängigkeit ihres EMT- und CSC-Status

Die Adhäsion an Endothelzellen wurde erstmals in der Immunbiologie beschrieben. Im Blutkreislauf können zirkulierende Leukozyten an Endothelzellen binden und somit in tiefere Gewebeschichten eindringen (Springer 1994). Daher wurde bereits früh postuliert, dass auch CTCs immunologische Adhäsionsmechanismen nutzen, um in sekundäre Organe zu metastasieren (Fidler 2003; Rice und Bevilacqua 1989). Aufgrund der Tatsache, dass CTCs bzw. zirkulierende Pankreasepithelzellen beim PDAC nicht nur in bereits manifesten Tumorerkrankungen, sondern auch in Vorläuferläsionen nachgewiesen wurden (Martini et al. 2019), ist es von großer Bedeutung, die Mechanismen der Tumorzell-Endothelzell-Adhäsion zu entschlüsseln, um effektive Therapiestrategien gegen die Metastasierung von PDAC-Zellen

zu entwickeln. Zur Evaluierung der Adhäsionsfähigkeit von PDAC-Zellen wurde daher ein Adhäsionsassay an Lungenendothelzellen durchgeführt. Die Lunge stellt mit der Leber und dem Peritoneum eines der häufigsten Metastasierungsorgane des PDAC dar (Usón et al. 2020) und wurde in dieser Arbeit untersucht, da in der Dissertation von Arne Surrow bereits Adhäsionsassays an Leberendothel- und Mesothelzellen durchgeführt wurden (A. Surrow, unveröffentlichte Dissertation; Philipp et al. 2024).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass die Panc89-Zellvarianten im Vergleich zu den Panc1-Zellvarianten eine signifikant höhere Adhäsion an die Lungenendothelzellen aufwiesen. Bei der vergleichenden Analyse der Subpopulationen innerhalb einer Zelllinie konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der unterschiedliche CSC-Status der Holo- und Paraklonzellen der jeweiligen PDAC-Zellen keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten hatte, während der divergente EMT-Status zu einer besseren Adhäsion der epithelialen Panc89-Zellvarianten geführt hat. In den Experimenten von Arne Surrow konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der CSC-Status für die Adhäsionsfähigkeit der PDAC-Zellpopulationen an Leber- und Mesothelzellen keine Relevanz hatte (A. Surrow, unveröffentlichte Dissertation; Philipp et al. 2024).

Die bessere Adhäsionsfähigkeit von epithelialen Panc89-Zellen an Lungenendothelzellen ist vermutlich auf andere Membranproteine als das E-Cadherin zurückzuführen, da E-Cadherin vornehmlich der Adhäsion an andere epitheliale Zellen dient (Mendonsa et al. 2018). Da Endothelzellen jedoch keine E-Cadherin-Expression aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass andere Adhäsionsproteine wie Syndecane, Selektine und Integrine als Bindungspartner der Tumorzellen fungieren, um an die Endothelzellen zu binden (Betriu et al. 2021; Kemper et al. 2021; Klemke et al. 2007).

4.2.2 Die Adhäsion an Lungenendothelzellen wird nicht durch lösliche Faktoren in den konditionierten Medien beeinflusst

Im Jahr 1889 veröffentlichte Steven Paget die „*Seed and Soil*“-Hypothese. Die „*Seed and Soil*“-Hypothese postuliert, dass sich Tumorzellen mit Metastasierungspotenzial („*seed*“) gezielt in bestimmte Zweitorgane ausbreiten, wo sie förderliche Bedingungen für ihr Auswachsen vorfinden („*soil*“) (Paget 1889). Weiterhin weisen diverse Studien darauf hin, dass die Ausbreitung nicht zufällig oder aufgrund anatomischer und mechanischer Faktoren erfolgt, sondern durch die Vorbereitung dieser Organe durch den Primärtumor selbst gefördert wird (Fidler 2003). In verschiedenen Studien konnte beim PDAC nachgewiesen werden, dass eine Vorbereitung der Zielorgane durch verschiedene freigesetzte Faktoren aus den

Primärtumoren stattfindet, bevor es zur Metastasierung kommt (Costa-Silva et al. 2015; Grünwald et al. 2016; Lee et al. 2019).

Um potenzielle Auswirkungen einer Vorbereitung des gesunden Endothels durch die Panc1- und Panc89-Zellen zu untersuchen, wurden die Lungenendothelzellen mit KM der Tumorzellen vorinkubiert, bevor der Adhäsionsassay durchgeführt wurde.

Die Inkubation der Zelllinie HuLEC-5a mit Zellkulturüberständen der Panc1- und Panc89-Populationen hatte jedoch keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der jeweiligen PDAC-Zellvariante (siehe Abschnitt 3.2.2). Sowohl im Vergleich zur Kontrollbedingung, d. h. Inkubation in Zellkulturmedium der HuLEC-5a-Zelllinie, als auch nach Inkubation mit verschiedenen KM konnten keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit zwischen den Zellvarianten festgestellt werden.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass eine Vorkonditionierung der Endothelzellen durch die Tumorzellen nicht ausreicht, sondern es einer direkten Interaktion zwischen Tumorzellen und Endothelzellen bedarf. In einer Studie untersuchte die Arbeitsgruppe um Khatib et al. in einem Mausmodell die Reaktion der Leber auf Tumorzellen eines Kolorektalkarzinoms sowie eines Lungenkarzinoms. Die Injektion maligner Zellen in die Strombahn der Leber resultierte in der Auslösung einer intrahepatischen proinflammatorischen Zytokinkaskade. Im weiteren Verlauf wurde eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin, P-Selectin, *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und ICAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen beobachtet. Die Autoren postulierten, dass die direkte Interaktion von Tumorzellen mit sinusoidalen Endothelien für diese Aktivierung der Endothelzellen notwendig war (Khatib et al. 2005). Eine weitere Studie konnte ebenfalls demonstrieren, dass lediglich die direkte Interaktion von Endothelzellen und Tumorzellen zu Veränderungen des Expressionsprofils der Endothelien führte, während eine indirekte Interaktion über parakrine Faktoren keine Auswirkungen hatte (Zhang et al. 2014).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde ein direkter Kontakt jedoch nur während des Adhäsionsassays selbst hergestellt, der offenbar zu kurz ist, um zu einem veränderten Expressionsprofil von Adhäsionsmolekülen in den Endothelzellen zu führen. Eine Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen mit funktionellen Folgen ist bereits für die parentale Panc1-Zellpopulation bekannt (Issa et al. 2009), sodass in Zukunft Versuche mit den anderen PDAC-Zellvarianten nach einem ähnlichen Versuchsprotokoll wie in der aufgeführten Studie durchgeführt werden sollten.

4.3 Ausblick

Das Fehlen von Frühsymptomen, die ausgeprägte Metastasierungstendenz sowie die eingeschränkten Therapiemöglichkeiten kennzeichnen das PDAC weiterhin als eine der

tödlichsten Erkrankungen weltweit (Mizrahi et al. 2020; Siegel et al. 2023). Die aggressive Natur dieser Krebsentität ist auf eine ausgeprägte intra- und intertumorale Heterogenität zurückzuführen. Die interklonale Kooperation heterogener Tumorzellpopulationen sowie von stromalen Komponenten mit den PDAC-Zellen trägt zur Progression des PDAC bei (Group Young Researchers in Inflammatory Carcinogenesis et al. 2021; Maddipati und Stanger 2015; Yachida et al. 2010). Die Akkumulation von EMT- und CSC-Merkmalen innerhalb einiger Tumorzellpopulationen fördert zudem die Metastasierung sowie das Therapieversagen (Rodriguez-Aznar et al. 2019). Daher ist es von entscheidender Bedeutung, diese Subpopulationen detailliert zu charakterisieren, um effektive therapeutische Strategien entwickeln zu können.

Aus diesem Grund wurde in dieser Dissertation das Migrations- und Adhäsionsverhalten an Lungenendothelzellen von zwei verschiedenen PDAC-Zelllinien einschließlich ihrer Subpopulationen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Ausprägung von EMT- und CSC-Phänotypen untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Migration der Panc1-Zellen in Übereinstimmung mit ihrem mesenchymalen Phänotyp in Form von Einzelzellen stattfand. Die epithelialen Panc89-Zellvarianten wiesen hingegen eine Migration in Form von kollektiven Tumorzellverbänden auf. Zellen mit der höchsten Expression des epithelialen Adhäsionsproteins E-Cadherin sowie des Stammzellmarkers Sox2 migrierten dabei am stärksten. Die vergleichende Analyse der verschiedenen PDAC-Zellpopulationen demonstrierte zudem, dass alle Panc89-Zellvarianten ein signifikant besseres Migrationsverhalten aufwiesen als die Panc1-Zellvarianten. Das Vorhandensein der epithelialen E-Cadherin-positiven Tumorzellverbände war damit in allen durchgeführten Versuchen mit einer besseren Migrationsfähigkeit assoziiert. Die Expression der mesenchymalen Proteine L1CAM und Vimentin schien dagegen weniger relevant für die Migrationsfähigkeit der in dieser Arbeit untersuchten PDAC-Zellpopulationen zu sein. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls zeigen konnten, dass eine Dissemination in Form kollektiver Tumorzellverbände, welche vollständig oder teilweise epitheliale Eigenschaften aufweisen, mit einer besseren Metastasierungsfähigkeit einhergehen kann (Carstens et al. 2021; Fischer et al. 2015; Jolly et al. 2016, 2019). Diese Form der Migration kann die Dissemination heterogener Populationen, die aus unterschiedlichen Klonen bestehen, ermöglichen und dadurch die funktionellen Vorteile verschiedener Klone vereinen (Cheung und Ewald 2016).

Die Adhäsionsfähigkeit an Lungenendothel war ebenfalls für die Panc89-Zellvarianten signifikant besser als für die Panc1-Zellvarianten. Hier zeigte sich erneut eine Assoziation mit dem EMT-, nicht aber mit dem CSC-Phänotyp. Inwieweit die Expression des epithelialen

Adhäsionsmoleküls E-Cadherin dieses Verhalten beeinflusste, bleibt unklar und muss weiter untersucht werden (siehe Abschnitt 4.4).

Darüber hinaus zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Vorkonditionierung der PDAC-Zellen durch KM vor Durchführung des Migrationsassays oder der HuLEC-5a-Zelllinie durch KM vor Durchführung des Adhäsionsassays keine Auswirkung auf das funktionelle Verhalten hatte.

Diese Beobachtungen bieten allesamt die rationale Grundlage für die Durchführung von KD-Experimenten, um das funktionelle Verhalten der einzelnen Zellpopulationen nach einer Herunterregulation der EMT- und CSC-assoziierten Gene zu untersuchen. Dadurch kann der kausale Zusammenhang zwischen EMT- und CSC-Eigenschaften und dem Verhalten der PDAC-Zellvarianten evaluiert werden. Beispielsweise könnten die Stammzellmarker Nestin, Sox2 und OVOL2 in den Holoklonvarianten der Panc1-Zellen bzw. den einzelnen Panc89-Populationen ausgeschaltet werden, um die Relevanz dieser Stammzellmarker auf die Migrations-, Adhäsions- und Invasionsfähigkeit zu untersuchen. Die Bedeutung der E-Cadherin-Expression in den Panc89-Zellverbänden sollte ebenfalls weiter untersucht werden. Dabei kann sowohl durch Suppression der Expression bzw. Blockade der Funktion als auch durch Steigerung der Aktivität die Relevanz von E-Cadherin für die kollektive Migration aber auch die bessere Adhäsionsfähigkeit an Lungenendothel genauer charakterisiert werden. Aus der Studie von Petrova et al. ist beispielsweise bekannt, dass nicht nur die Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche, sondern auch dessen Aktivität von funktioneller Bedeutung für die Metastasierung ist (Petrova et al. 2016).

Darüber hinaus sollte eruiert werden, ob ein direkter Kontakt von Endothelzellen und PDAC-Zellen über einen längeren Zeitraum zu einer Veränderung des Expressionsprofils von Adhäsionsmolekülen und letztendlich zu einem verändertem Adhäsionsverhalten der PDAC-Zellen führen kann. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Vorkonditionierung der Endothelzellen durch KM der PDAC-Zellen keine Auswirkung auf das Adhäsionsverhalten der PDAC-Zellen hatte. Jedoch gibt es Hinweise, dass durch den direkten Kontakt von PDAC-Zellen und Endothelzellen eine funktionelle Beeinflussung des Tumorverhaltens möglich ist (Khatib et al. 2005; Zhang et al. 2014). Beispielsweise könnte zu diesem Zweck eine direkte Co-Kultur durch gleichzeitige Aussaat von Endothelzellen und Tumorzellen mit anschließender Analyse des Expressionsprofils von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen und PDAC-Zellen erfolgen. Weiterhin könnte die Auswirkung von löslichen Faktoren im Rahmen von indirekten Co-Kulturversuchen mit Transwell-Experimenten evaluiert werden. In solchen Transwell-Co-Kultur-Experimenten werden verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Kammern, die meist übereinander angeordnet und durch eine permeable Membran voneinander getrennt sind, ausgesät. Dies erlaubt den kontinuierlichen Austausch löslicher Faktoren zwischen den verschiedenen Zelltypen und kann dadurch ein dynamischeres und physiologisch relevanteres Modell zur Untersuchung der Auswirkungen löslicher Faktoren bieten als die statische

Inkubation mit zuvor generierten KM, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Darüber hinaus wäre es hilfreich, CTCs aus Blut- und TAEs aus Gewebeproben von Metastasen von Patienten mit klinisch gesichertem PDAC auf die Expression von Adhäsionsmolekülen zu untersuchen.

Abschließend sollten weitere Untersuchungen an anderen PDAC-Zelllinien mit unterschiedlichen CSC-Eigenschaften sowie der Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern durchgeführt werden, da die beiden analysierten PDAC-Zelllinien eine unzureichende intra- und intertumorale Heterogenität im Vergleich zur gesamten Tumormasse von Patienten widerspiegeln. Die Identifizierung verschiedener Tumorklone und Phänotypen würde dazu beitragen, die funktionellen Auswirkungen dieser Heterogenität beim PDAC insbesondere im Hinblick auf die Metastasierung besser zu verstehen und wirksamere Behandlungsstrategien zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt den häufigsten bösartigen Tumor der Bauchspeicheldrüse dar und ist charakterisiert durch ein schlechtes Therapieansprechen, eine frühe Metastasierung sowie eine hohe Letalität. Der Begriff Metastasierung beschreibt die Ausbreitung maligner Tumorzellen vom Primärtumor in entfernte Gewebe. Dieser Prozess erfolgt in einer schrittweisen Kaskade von Ereignissen, bei der Zellmigration und Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielen. Im Verlauf der Metastasierung verlieren Karzinome ihren ursprünglich epithelialen Charakter und nehmen stattdessen mesenchymale Eigenschaften an. Dieses als epithelial-mesenchymale Transition bezeichnete Programm begünstigt die Entstehung eines invasiven Phänotyps. Darüber hinaus wird dieser Prozess mit dem Erwerb von Krebsstammzeleigenschaften, die als essentiell für die Tumoringenition sowie die Therapieresistenz gesehen werden, in Verbindung gebracht.

Im Rahmen von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden die beiden PDAC-Zelllinien Panc1 und Panc89 hinsichtlich ihrer epithelialen, mesenchymalen sowie Krebsstammzell-assoziierten Eigenschaften charakterisiert. Zudem konnten durch Einzelzell-Klonierungsversuche unterschiedliche Klone aus den beiden parentalen Zelllinien generiert werden. Aus der Panc1-Zelllinie wurden ein mesenchymaler Nestin-exprimierender Stammzell-Phänotyp (Panc1-Holoklon) sowie ein mesenchymaler Nicht-Stammzell-Phänotyp (Panc1-Paraklon) isoliert. Im Gegensatz dazu wurde aus der Panc89-Zelllinie ein epithelialer Sox2-exprimierender Stammzell-Phänotyp (Panc89-Holoklon) sowie ein epithelial-mesenchymaler Nicht-Stammzell-Phänotyp (Panc89-Paraklon) generiert. Somit konnte gezeigt werden, dass im PDAC unterschiedliche Stammzellphänotypen mit unterschiedlichen epithelial-mesenchymalen Differenzierungsgraden existieren.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Zellmigration- und Adhäsionseigenschaften der parentalen Panc1- und Panc89-Zelllinien sowie ihrer Klone. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Mechanismen der Metastasierung des PDAC besser zu verstehen, um in Zukunft gezielte Therapiestrategien zu entwickeln.

Das Migrationsverhalten wurde in Wundheilungsassays untersucht. Zur molekularen Charakterisierung migrierender Zellen wurden zusätzlich immunzytochemische Färbungen und Immunfluoreszenzdoppelfärbungen durchgeführt. Um die klonale

Zusammenfassung

Heterogenität der Primärtumoren abzubilden und die Interaktion zwischen den Klonen darzustellen, wurden verschiedene Co-Kulturen generiert und die Migrationsdynamik durch Fluoreszenzmarkierung der PDAC-Zellen beurteilt.

Die Adhäsion wurde an Lungenendothelzellen durch Quantifizierung der an den Endothelzellen adhären fluoreszenzmarkierten Karzinomzellen bestimmt. Zusätzlich wurden die PDAC-Zellen vor der Durchführung des Wundheilungsassays sowie die Endothelzellen vor der Durchführung des Adhäsionsassays durch konditionierte Medien der malignen Zellen inkubiert, um eine Beeinflussung durch lösliche Faktoren auf das funktionelle Verhalten zu evaluieren.

Die epithelialen Panc89-Zellen zeigten alle eine signifikant bessere Migration als die mesenchymal-differenzierten Panc1-Zellen. Darüber hinaus wiesen die Stammzell-assoziierten Sox2-exprimierenden Panc89-Holoklonzellen die stärkste Migrationsfähigkeit aller Zellvarianten auf. Bei den Panc1-Zellvarianten konnte keine Assoziation des Migrationsverhaltens mit dem Stammzellphänotyp festgestellt werden.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Panc89-Zellen in epithelialen Zellverbänden aus Stammzell- und Nicht-Stammzell-assoziierten Klonen migrierten, während die Panc1-Zellen entsprechend ihrem mesenchymalen Charakter als einzelne Zellen in den Spalt wanderten.

Die Adhäsionsfähigkeit an Lungenendothelzellen war in den Panc89-Zellen ebenfalls signifikant ausgeprägter als in den Panc1-Zellen. Eine Assoziation mit dem Krebsstammzellphänotyp konnte jedoch auch hier nicht nachgewiesen werden.

Die Konditionierung der PDAC-Zellen sowie der Lungenendothelzellen durch konditionierte Medien hatte keine Veränderungen im Migrations- und Adhäsionsverhalten zu Folge.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die klonale Heterogenität eine funktionell bedeutsame Rolle bei der Metastasierung des PDAC spielt. Die effektive Migration als Zellkollektiv wird dabei offenbar durch die epithelialen Eigenschaften und gewissermaßen auch den Stammzellcharakter der PDAC-Zellen bedingt, wohingegen das Adhäsionsverhalten an Lungenendothelzellen weniger mit dem Stammzellcharakter assoziiert zu sein scheint. Inwiefern die epithelialen und Stammzell-assoziierten Eigenschaften der PDAC-Zellen jedoch kausal einen Einfluss auf das funktionelle Verhalten haben, muss in zukünftigen Studien weiter evaluiert werden.

6 Literaturverzeichnis

Abe K, Kitago M, Kitagawa Y und Hirasawa A (2021). Hereditary pancreatic cancer. *Int J Clin Oncol.* 26: 1784–1792.

Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS und DePinho RA (2003). Activated Kras and *Ink4a/Arf* deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17: 3112–3126.

Aiello NM, Maddipati R, Norgard RJ, Balli D, Li J, Yuan S, Yamazoe T, Black T, Sahmoud A, Furth EE, Bar-Sagi D und Stanger BZ (2018). EMT subtype influences epithelial plasticity and mode of cell migration. *Dev Cell.* 45: 681–695.

Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, Caldas C, Califano A, Doherty M, Elsner M, Esteller M, Fitzgerald R, Korbel JO, Lichter P, Mason CE, Navin N, Pe'Er D, Polyak K, Roberts CWM, Siu L, Snyder A, Stower H, Swanton C, Verhaak RGW, Zenklusen JC, Zuber J und Zucman-Rossi J (2015). Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med.* 21: 846–853.

Aponte PM und Caicedo A (2017). Stemness in cancer: Stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment. *Stem Cells Int.* 2017: 5619472.

Bailey P, Chang D, Nones K, Johns A, Patch A, Gingras M, Miller D, Christ A, Bruxner T, Quinn M, Nourse C, Murtaugh L, Harliwong I, Idrisoglu S, Manning S, Nourbakhsh E, Wani S, Fink L, Holmes O, Chin V, Anderson M, Kazakoff S, Leonard C, Newell F, Waddell N, Wood S, Xu Q, Wilson P, Cloonan N, Kassahn K, Taylor D, Quek K, Robertson A, Pantano L, Mincarelli L, Sanchez L, Evers L, Wu J, Pinese M, Cowley M, Jones M, Colvin E, Nagrial A, Humphrey E, Chantrill L, Mawson A, Humphris J, Chou A, Pajic M, Scarlett C, Pinho A, Giry-Laterriere M, Rooman I, Samra J, Kench J, Lovell J, Merrett N, Toon C, Epari K, Nguyen N, Barbour A, Zeps N, Moran-Jones K, Jamieson N, Graham J, Duthie F, Oien K, Hair J, Grützmann R, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Wolfgang C, Morgan R, Lawlor R, Corbo V, Bassi C, Rusev B, Capelli P, Salvia R, Tortora G, Mukhopadhyay D, Petersen G, Munzy D, Fisher W, Karim S, Eshleman J, Hruban R, Pilarsky C, Morton J, Sansom O, Scarpa A, Musgrove E, Bailey U, Hofmann O, Sutherland R, Wheeler D, Gill A, Gibbs R, Pearson J, Waddell N, Biankin A und Grimmond S (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531: 47–52.

Literaturverzeichnis

Bapat AA, Hostetter G, von Hoff DD und Han H (2011). Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nat Rev Cancer*. 11: 695–707.

Bardeesy N, Cheng K, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D und DePinho RA (2006). Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev*. 20: 3130–3146.

Batabyal P, van der Hoorn S, Christophi C und Nikfarjam M (2014). Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: A meta-analysis of 88 studies. *Ann Surg Oncol*. 21: 2453–2462.

Bergmann F, Wandschneider F, Sipos B, Moldenhauer G, Schniewind B, Welch T, Schirmacher P, Klöppel G, Altevogt P, Schäfer H und Sebens Muerköster S (2010). Elevated L1CAM expression in precursor lesions and primary and metastatic tissues of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 24: 909–915.

Betriu N, Bertran-Mas J, Andreeva A und Semino CE (2021). Syndecans and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biomolecules* 11: 349.

Borchardt H, Schulz A, Datta K, Muders MH und Aigner A (2019). Silencing of Neuropilins and GIPC1 in pancreatic ductal adenocarcinoma exerts multiple cellular and molecular antitumor effects. *Sci Rep*. 9:15471.

Boukrout N, Souidi M, Lahdaoui F, Duchêne B, Neve B, Coppin L, Leteurtre E, Torrisani J, van Seuningen I und Jonckheere N (2021). Antagonistic roles of the tumor suppressor mir-210-3p and oncomucin muc4 forming a negative feedback loop in pancreatic adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* 13: 6197.

Cancer Genome Atlas Research Network (2017). Integrated genomic characterization of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 32: 185-203

Carrière C, Seeley ES, Goetze T, Longnecker DS und Korc M (2007). The Nestin progenitor lineage is the compartment of origin for pancreatic intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 4437–4442.

Literaturverzeichnis

Carstens JL, Yang S, Correa de Sampaio P, Zheng X, Barua S, McAndrews KM, Rao A, Burks JK, Rhim AD und Kalluri R (2021). Stabilized epithelial phenotype of cancer cells in primary tumors leads to increased colonization of liver metastasis in pancreatic cancer. *Cell Rep.* 35: 108990.

Chen S, Chen J, Zhang J, Chen H, Yan M, Huang L, Tian Y, Chen Y und Wang Y (2016). Hypoxia induces TWIST-activated epithelial–mesenchymal transition and proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in nude mice. *Cancer Lett.* 383: 73–84.

Cheung KJ und Ewald AJ (2016). A collective route to metastasis: Seeding by tumor cell clusters. *Science* 352: 167–169.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL und Wahl GM (2006). Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 66: 9339–9344.

Costache MI, Costache CA, Dumitrescu CI, Tica AA, Popescu M, Baluta EA, Anghel AC, Saftoiu A und Dumitrescu D (2017). Which is the best imaging method in pancreatic adenocarcinoma diagnosis and staging - CT, MRI or EUS? *Curr Health Sci J.* 43: 132–136.

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.

Danielsson F, Peterson MK, Caldeira Araújo H, Lautenschläger F und Gad AKB (2018). Vimentin diversity in health and disease. *Cells.* 7: 147.

Davnall F, Yip CSP, Ljungqvist G, Selmi M, Ng F, Sanghera B, Ganeshan B, Miles KA, Cook GJ und Goh V (2012). Assessment of tumor heterogeneity: An emerging imaging tool for clinical practice? *Insights Imaging* 3: 573–589.

Dongre A und Weinberg RA (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20: 69–84.

Literaturverzeichnis

Du Z, Qin R, Wei C, Wang M, Shi C, Tian R und Peng C (2011). Pancreatic cancer cells resistant to chemoradiotherapy rich in “stem-cell-like” tumor cells. *Dig Dis Sci*. 56: 741–750.

Edwards P, Kang BW und Chau I (2021). Targeting the stroma in the management of pancreatic cancer. *Front Oncol*. 11: 691185.

Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, Fingerle AA, Dobritz M, Kleeff J und Friess H (2012). The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 9: 454–467.

Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA und Fares Y (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Sig Transduct Target Ther*. 5: 28.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I und Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Verfügbar auf: <https://gco.iarc.who.int/today>; Zugriffsdatum: 07.06.2024

Fidler IJ (1970). Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*. 45: 773–782.

Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 3: 453–458.

Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong STC, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V und Gao D (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527: 472–476.

Friedl P und Gilmour D (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10: 445–457.

Friedl P und Mayor R (2017). Tuning collective cell migration by cell–cell junction regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9: a029199.

Literaturverzeichnis

Friedl P und Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 3: 362–374.

Geismann C, Morscheck M, Koch D, Bergmann F, Ungefroren H, Arlt A, Tsao M-S, Bachem MG, Altevogt P, Sipos B, Fölsch UR, Schäfer H und Sebens Muerköster S (2009). Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is Transforming Growth Factor β 1– and Slug-dependent: Role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res*. 69: 4517–4526.

Giehl K, Skripczynski B, Mansard A, Menke A und Gierschik P (2000). Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene* 19: 2930–2942.

Goebel L, Grage-Griebenow E, Gorys A, Helm O, Genrich G, Lenk L, Wesch D, Ungefroren H, Freitag-Wolf S, Sipos B, Röcken C, Schäfer H und Sebens S (2015). CD4+ T cells potently induce epithelial-mesenchymal- transition in premalignant and malignant pancreatic ductal epithelial cells–novel implications of CD4+ T cells in pancreatic cancer development. *Oncoimmunology* 4: e1000083.

Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z und Falanga V (2017). Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *J Invest Dermatol* 137: e11–e16.

Greenburg G und Hay ED (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*. 95: 333–339.

Group Young Researchers in Inflammatory Carcinogenesis (Aldag L, Beckinger S, Daunke T, Philipp L-M, Surrow A, Yesilyurt U-U), Wandmacher AM, Mehdorn A-S und Sebens S (2021). The heterogeneity of the tumor microenvironment as essential determinant of development, progression and therapy response of pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 13: 4932.

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.

Literaturverzeichnis

Hanahan D und Coussens LM (2012). Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21: 309–322.

Hanahan D und Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646–674.

Harjunpää H, Lloret Asens M, Guenther C und Fagerholm SC (2019). Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Front Immunol.* 10: 1078.

Hedemann N (2013). Die Metalloprotease ADAM17 - potentieller Tumormarker und Schlüsselregulator in der Epidermal-growth factor receptor-Expression von Pankreaskarzinomzellen. Dissertation: Christian-Albrechts-Universität, Kiel

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, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajás AA-M, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L und Billadeau DD (2013). SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 2: e61.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramautd TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S und Tuveson DA (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7: 469–483.

Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr H-J und Hotz HG (2007). Epithelial to mesenchymal transition: Expression of the regulators Snail, Slug, and Twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 13: 4769–4776.

Hu X, Zhang R, Yao J, Mu B und Zhao C (2023). Wild-type KRAS inhibits the migration and invasion of pancreatic cancer through the Wnt/ β -catenin pathway. *Mol Med Rep.* 27: 4.

Literaturverzeichnis

Hüser L, Novak D, Umansky V, Altevogt P und Utikal J (2018). Targeting SOX2 in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 22: 983–991

Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P und Lowenfels AB (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*. 393: 535–545.

Isaji S, Mizuno S, Windsor JA, Bassi C, Fernández-del Castillo C, Hackert T, Hayasaki A, Katz MHG, Kim S-W, Kishiwada M, Kitagawa H, Michalski CW und Wolfgang CL (2018). International consensus on definition and criteria of borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma 2017. *Pancreatology* 18: 2–11.

Ishiwata T, Matsuda Y, Yoshimura H, Sasaki N, Ishiwata S, Ishikawa N, Takubo K, Arai T und Aida J (2018). Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods. *Pathol Oncol Res*. 24: 797–805.

Issa Y, Nummer D, Seibel T, Sebels Muerköster S, Koch M, Schmitz-Winnenthal F-H, Galindo L, Weitz J, Beckhove P und Altevogt P (2009). Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med*. 87: 99–112.

Janiszewska M, Primi MC und Izard T (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem*. 295: 2495–2505.

Janssen QP, Buettner S, Suker M, Beumer BR, Addeo P, Bachellier P, Bahary N, Bekaii-Saab T, Bali MA, Besselink MG, Boone BA, Chau I, Clarke S, Dillhoff M, El-Rayes BF, Frakes JM, Grose D, Hosein PJ, Jamieson NB, Javed AA, Khan K, Kim K-P, Kim SC, Kim SS, Ko AH, Lacy J, Margonis GA, McCarter MD, McKay CJ, Mellon EA, Moorcraft SY, Okada K-I, Panizza A, Parikh PJ, Peters NA, Rabl H, Samra J, Tinchon C, van Tienhoven G, van Veldhuisen E, Wang-Gillam A, Weiss MJ, Wilmink JW, Yamaue H, Homs MYV, van Eijck CHJ, Katz MHG und Groot Koerkamp B (2019). Neoadjuvant FOLFIRINOX in patients with borderline resectable pancreatic cancer: A systematic review and patient-level meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 111: 782–794.

Jolly MK, Jia D, Boareto M, Mani SA, Pienta KJ, Ben-Jacob E und Levine H (2015). Coupling the modules of EMT and stemness: A tunable ‘stemness window’ model. *Oncotarget* 6: 25161–25174.

Literaturverzeichnis

Jolly MK, Somarelli JA, Sheth M, Biddle A, Tripathi SC, Armstrong AJ, Hanash SM, Bapat SA, Rangarajan A und Levine H (2019). Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. *Pharmacol Ther.* 194: 161–184.

Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celikbas M, Hanash SM, Mani SA, Pienta KJ, Ben-Jacob E und Levine H (2016). Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget* 7: 27067-27084.

Joshi VB, Gutierrez Ruiz OL und Razidlo GL (2023). The cell biology of metastatic invasion in pancreatic cancer: Updates and mechanistic insights. *Cancers (Basel)* 15: 2169.

Kalluri R und Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428.

Kemper M, Schiecke A, Maar H, Nikulin S, Poloznikov A, Galatenko V, Tachezy M, Gebauer F, Lange T, Riecken K, Tonevitsky A, Aigner A, Izbicki J, Schumacher U und Wicklein D (2021). Integrin α -V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression. *J Exp Clin Cancer Res.* 40: 214.

Khatib A-M, Auguste P, Fallavollita L, Wang N, Samani A, Kontogiannina M, Meterissian S und Brodt P (2005). Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis. *Am J Pathol.* 167: 749–759.

Kiefel H, Bondong S, Hazin J, Ridinger J, Schirmer U, Riedle S und Altevogt P (2012). L1CAM - A major driver for tumor cell invasion and motility. *Cell Adh Migr.* 6: 374–384.

Kiefel H, Bondong S, Pfeifer M, Schirmer U, Erbe-Hoffmann N, Schäfer H, Sebens S und Altevogt P (2012). EMT-associated up-regulation of L1CAM provides insights into L1CAM-mediated integrin signalling and NF- κ B activation. *Carcinogenesis* 33: 1919–1929.

Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH und Samstag Y (2007). High affinity interaction of integrin α 4 β 1 (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol.* 212: 368–374.

Literaturverzeichnis

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.

Krebs AM, Mitschke J, Laserra 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.

Lee JW, Stone ML, Porrett PM, Thomas SK, Komar CA, Li JH, Delman D, Graham K, Gladney WL, Hua X, Black TA, Chien AL, Majmundar KS, Thompson JC, Yee SS, O'Hara MH, Aggarwal C, Xin D, Shaked A, Gao M, Liu D, Borad MJ, Ramanathan RK, Carpenter EL, Ji A, de Beer MC, de Beer FC, Webb NR und Beatty GL (2019). Hepatocytes direct the formation of a pro-metastatic niche in the liver. *Nature* 567: 249–252.

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. (2024). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Langversion 3.0. AWMF-Registernummer 032-010OL.

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 F, Tiede B, Massagué J und Kang Y (2007). Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 17: 3–14.

Lian EY, Hyndman BD, Moodley S, Maritan SM und Mulligan LM (2020). RET isoforms contribute differentially to invasive processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 39: 6493–6510.

Liang C-C, Park AY und Guan J-L (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2: 329–333.

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.* 15: 741–747.

Literaturverzeichnis

Lindsey S und Langhans SA (2015). Epidermal Growth Factor signaling in transformed cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 314: 1–41.

Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC und Wicha MS (2014). Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal States reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports* 2: 78–91.

Loh C-Y, Chai J, Tang T, Wong W, Sethi G, Shanmugam M, Chong P und Looi C (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin switch in Epithelial-to-Mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells* 8: 1118.

Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, Lu J, Fan X, Zhu S, Wang Y, Guo Q, Wang L, Huang Y, Zhu M und Wang Z (2013). Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 340: 113–123.

Lucenteforte E, La Vecchia C, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Ji BT, Bosetti C, Li D, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Gao YT, Negri E, Hassan M, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Boffetta P und Duell EJ (2012). Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case–Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol.* 23: 374–382.

Maddipati R und Stanger BZ (2015). Pancreatic cancer metastases harbor evidence of polyclonality. *Cancer Discov.* 5: 1086–1097.

Maier HJ, Schmidt-Straßburger U, Huber MA, Wiedemann EM, Beug H und Wirth T (2010). NF- κ B promotes epithelial–mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett.* 295: 214–228.

Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L und Syrigos K (2009). Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest.* 27: 1023–1037.

Marjanovic ND, Weinberg RA und Chaffer CL (2013). Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem.* 59: 168–179.

Literaturverzeichnis

Martini V, Timme-Bronsert S, Fichtner-Feigl S, Hoepfner J und Kulemann B (2019). Circulating tumor cells in pancreatic cancer: Current perspectives. *Cancers (Basel)* 11: 1659.

Matsuda Y, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M und Ishiwata T (2014). Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2R^γnull (NOG) mice. *Am J Pathol.* 184: 674–685.

Mendonsa AM, Na T-Y und Gumbiner BM (2018). E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* 37: 4769–4780.

Michaud DS (2001). Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA.* 286: 921-929.

Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR und Derynck R (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol.* 127: 2021–2036.

Mizrahi JD, Surana R, Valle JW und Shroff RT (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet* 395: 2008–2020.

Mo W und Zhang J-T (2012). Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol.* 3: 1–27.

Monti P, Marchesi F, Reni M, Mercalli A, Sordi V, Zerbi A, Balzano G, Di Carlo V, Allavena P und Piemonti L (2004). A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile. *Virchows Arch.* 445: 236–247.

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M und Parulekar W (2007). Erlotinib plus Gemcitabine compared with Gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* 25: 1960–1966.

Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R und Imamura M (2004). N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res.* 10: 4125–4133.

Literaturverzeichnis

Neelakantan D, Drasin DJ und Ford HL (2015). Intratumoral heterogeneity: Clonal cooperation in epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Cell Adh Migr.* 9: 265–276.

Nelson WJ, Dickinson DJ und Weis WI (2013). Roles of cadherins and catenins in cell–cell adhesion and epithelial cell polarity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 116: 3–23.

Neradil J und Veselska R (2015). Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* 106: 803–811.

Nummer D, Suri-Payer E, Schmitz-Winnenthal H, Bonertz A, Galindo L, Antolovich D, Koch M, Büchler M, Weitz J, Schirrmacher V und Beckhove P (2007). Role of tumor endothelium in CD4+CD25+ regulatory T cell infiltration of human pancreatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 99: 1188–1199.

Okabe T, Yamaguchi N und Ohsawa N (1983). Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer* 51: 662–668.

Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, Ungefroren H, Fandrich F und Kalthoff H (2007). Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 6: 92–97.

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

Pandey S, Gupta VK und Lavania SP (2023). Role of epigenetics in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Epigenomics* 15: 89–110.

Pannala R, Basu A, Petersen GM und Chari ST (2009). New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. *Lancet Oncol.* 10: 88–95.

Permuth-Wey J und Egan KM (2009). Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer.* 8: 109–117.

Petrova YI, Schecterson L und Gumbiner BM (2016). Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell.* 27: 3233–3244.

Literaturverzeichnis

Philipp L-M (2019). Charakterisierung von Pankreaskarzinomzellklonen mit unterschiedlichen Stammzeleigenschaften. Masterarbeit: Christian-Albrechts-Universität, Kiel.

Philipp L-M (2023). The impact of clonal heterogeneity and plasticity on malignancy associated properties and therapy response in pancreatic cancer. Dissertation: Christian-Albrechts-Universität, Kiel

Philipp L-M, Yesilyurt U-U, Surrow A, Künstner A, Mehdorn A-S, Hauser C, Gundlach J-P, Will O, Hoffmann P, Stahmer L, Franzenburg S, Knaack H, Schumacher U, Busch H und Sebens S (2024). Epithelial and mesenchymal-like pancreatic cancer cells exhibit different stem cell phenotypes associated with different metastatic propensities. *Cancers (Basel)* 16: 686.

Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, Macià A und Panosa A (2019). In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Front Cell Dev Biol.* 7: 107.

Pirkmajer S und Chibalin AV (2011). Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301: C272–C279.

Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jariod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Solà R, Salas A und Real FX (2005). Exocrine pancreatic cancer: Symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol.* 7: 189–197.

Prasetyanti PR und Medema JP (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Mol Cancer* 16: 41.

Qiu W, Sahin F, Iacobuzio-Donahue CA, Garcia-Carracedo D, Wang WM, Kuo C-Y, Chen D, Arking DE, Lowy AM, Hruban RH, Remotti HE und Su GH (2011). Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget* 2: 862–873.

Rahib L, Wehner MR, Matrisian LM und Nead KT (2021). Estimated projection of US cancer incidence and death to 2040. *JAMA Netw Open.* 4: e214708

Literaturverzeichnis

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

Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, Hong S-M, Koorstra J-B, Rajeshkumar N V., He X, Goggins M, Iacobuzio-Donahue C, Berman DM, Laheru D, Jimeno A, Hidalgo M, Maitra A und Matsui W (2010). Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 102: 340–351.

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.

Rice GE und Bevilacqua MP (1989). An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246: 1303–1306.

Roca H, Hernandez J, Weidner S, McEachin RC, Fuller D, Sud S, Schumann T, Wilkinson JE, Zaslavsky A, Li H, Maher CA, Daignault-Newton S, Healy PN und Pienta KJ (2013). Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer. *PLoS One* 8: e76773.

Rodriguez-Aznar E, Wiesmüller L, Sainz B und Hermann PC (2019). EMT and stemness—key players in pancreatic cancer stem cells. *Cancers (Basel)* 11: 1136.

Roland CL, Harken AH, Sarr MG und Barnett CC (2007). ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* 141: 705–707.

Ryan DP, Hong TS und Bardeesy N (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 371: 1039–1049.

Satelli A und Li S (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 68: 3033–3046.

Schmidt-Hansen M, Berendse S und Hamilton W (2016). Symptoms of pancreatic cancer in primary care. *Pancreas* 45: 814–818.

Literaturverzeichnis

Shah AN, Summy JM, Zhang J, Park SI, Parikh NU und Gallick GE (2007). Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol*. 14: 3629–3637.

Shao F, Cai M, Fan FF, Huang M, Tao Y, Wang C, Meng FT und Huang Q (2020). Overexpression of circRNA chr7:154954255-154998784+ in cancer-associated pancreatic stellate cells promotes the growth and metastasis of pancreatic cancer by targeting the miR-4459/KIAA0513 axis. *Am J Transl Res*. 12: 5048–5063.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS und Jemal A (2023). Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 73: 17–48.

Singh A und Settleman J (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741–4751.

Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M und Klöppel G (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch*. 442: 444–452.

Sommariva M und Gagliano N (2020). E-Cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multifaceted actor during EMT. *Cells* 9: 1040.

Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 76: 301–314.

Strickler JH, Satake H, George TJ, Yaeger R, Hollebecque A, Garrido-Laguna I, Schuler M, Burns TF, Coveler AL, Falchook GS, Vincent M, Sunakawa Y, Dahan L, Bajor D, Rha S-Y, Lemech C, Juric D, Rehn M, Ngarmchamnanrith G, Jafarinasabian P, Tran Q und Hong DS (2023). Sotorasib in *KRAS* p.G12C–mutated advanced pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 388: 33–43.

Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Oberyszyn TM und Hall BM (2009). Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 28: 2940–2947.

Literaturverzeichnis

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A und Bray F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 71: 209–249.

Tomasz M (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol.* 2: 575–579.

Usón PLS, Tolentino FDS, Santos VM, Rother ET und Maluf FC (2020). The impact of metastatic sites in advanced pancreatic adenocarcinoma, systematic review and meta-analysis of prospective randomized studies. *PLoS One* 15: e0230060.

Van Dam JL, Janssen QP, Besselink MG, Homs MYV, van Santvoort HC, van Tienhoven G, de Wilde RF, Wilmink JW, van Eijck CHJ und Groot Koerkamp B (2022). Neoadjuvant therapy or upfront surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer.* 160: 140–149.

Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH und Goggins M (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet.* 378: 607–620.

Vujasinovic M, Valente R, del Chiaro M, Permert J und Löhr J-M (2017). Pancreatic exocrine insufficiency in pancreatic cancer. *Nutrients* 9: 183.

Walter FM, Mills K, Mendonça SC, Abel GA, Basu B, Carroll N, Ballard S, Lancaster J, Hamilton W, Rubin GP und Emery JD (2016). Symptoms and patient factors associated with diagnostic intervals for pancreatic cancer (SYMPTOM pancreatic study): a prospective cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 1: 298–306.

Wang Y, Li F, Luo B, Wang X, Sun H, Liu S, Cui Y und Xu X (2009). A side population of cells from a human pancreatic carcinoma cell line harbors cancer stem cell characteristics. *Neoplasma* 56: 371–378.

Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B und Iacobuzio-Donahue CA (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467: 1114–1117.

Literaturverzeichnis

Yadav D und Lowenfels AB (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144: 1252–1261.

Zhang P, Goodrich C, Fu C und Dong C (2014). Melanoma upregulates ICAM-1 expression on endothelial cells through engagement of tumor CD44 with endothelial E-selectin and activation of a PKC α –p38-SP-1 pathway. *FASEB J.* 28: 4591–4609.

Zhang Z und Xu Y (2022). FZD7 accelerates hepatic metastases in pancreatic cancer by strengthening EMT and stemness associated with TGF- β /SMAD3 signaling. *Mol Med.* 28: 82.

7 Veröffentlichungen

7.1 Tagungsbeitrag

Postervortrag im Rahmen des 54th Meeting of the European Pancreatic Club *Online edition* (2022) in Kyiv unter dem Titel: „Characterization of adhesion and migratory abilities of epithelial and mesenchymal pancreatic cancer cell populations with different cancer stem cell properties“.

7.2 Publikationen

Group Young Researchers in Inflammatory Carcinogenesis (Aldag L*, Beckinger S*, Daunke T*, Philipp L-M*, Surrow A*, **Yesilyurt U-U***), Wandmacher AM, Mehdorn A-S und Sebens S (2021). The heterogeneity of the tumor microenvironment as essential determinant of development, progression and therapy response of pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 13: 4932.

*gleichberechtigte Erstautoren

Philipp L-M, **Yesilyurt U-U**, Surrow A, Künstner A, Mehdorn A-S, Hauser C, Gundlach J-P, Will O, Hoffmann P, Stahmer L, Franzenburg S, Knaack H, Schumacher U, Busch H und Sebens S (2024). Epithelial and mesenchymal-like pancreatic cancer cells exhibit different stem cell phenotypes associated with different metastatic propensities. *Cancers (Basel)* 16: 686.

8 Danksagung

Ich möchte mich von Herzen bei allen bedanken, die in vielfältiger Weise an dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Doktormutter, Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens, die das Forschungsvorhaben von Anfang an hervorragend begleitet hat. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hat durch ihr wissenschaftliches Engagement mein Interesse an der Forschung entfacht. Mit ihrer herzlichen Art sorgte sie stets dafür, dass in unserer Arbeitsgruppe eine wundervolle Stimmung herrschte und das Arbeiten nicht unter Kollegen, sondern unter Freunden stattfand.

Ich möchte mich außerdem bei Frau Dr. rer. nat. Lisa-Marie Philipp bedanken, die meine direkte Ansprechpartnerin und Betreuerin war. Ihre hervorragenden Vorarbeiten zu den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind der Grundstein für dieses Projekt aber auch für alle folgenden Projekte gewesen. Durch sie habe ich die Grundlagen des zellbiologischen Arbeitens in kürzester Zeit erlernt und dank ihrer ausgezeichneten Erklärungsfähigkeiten sehr schnell und effektiv selbstständig mein Forschungsprojekt vorangetrieben.

Für die Möglichkeit, Teile der Daten in einer Publikation zu veröffentlichen und im Rahmen der Posterpräsentation zu präsentieren, möchte ich meinen beiden Betreuern meinen besonderen Dank aussprechen.

Ich möchte mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Silje Beckinger und Frau Dr. rer. nat. Tina Daunke für ihre Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe und die ständige Verfügbarkeit bei Rückfragen bedanken. Ein ganz besonderes Dankeschön geht auch an Frau Dr. h.c. Dagmar Leisner und Sandra Ussat. Beide haben nicht nur mir, sondern der gesamten Arbeitsgruppe stets den Rücken freigehalten und sich um organisatorische Belange und die Abläufe im Labor gekümmert, sodass wir uns um unsere Forschungsprojekte widmen konnten.

Darüber hinaus danke ich meinen Kommilitonen Leon Aldag und Arne Surrow, mit denen ich nicht nur hervorragend im Rahmen unserer Promotionsvorhaben zusammengearbeitet, sondern auch die Herausforderungen des Medizinstudiums gemeistert habe.

Ich danke der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Ermöglichung dieses Promotionsvorhabens sowie für die finanzielle Unterstützung im Rahmen

des Promotionsstipendiums für medizinische Doktoranden der Medizinischen Fakultät. Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. Lisa-Marie Philipp und Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens für ihre Unterstützung bei der Vorbereitung meiner Bewerbung um das Stipendium.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meiner Freundin Frau Büsra Chasan, die mich zu jeder Zeit mit ihrem positiven Zuspruch, ihrem Rat und ihrer liebevollen Art unterstützt hat. Sie hat mir gezeigt, dass ich immer an meine Ziele glauben und alles in meiner Macht Stehende tun muss, um diese zu erreichen. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft und hoffe, dass wir noch viele weitere wundervolle Momente miteinander erleben können.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie von Herzen danken. Ohne ihre unermüdliche Unterstützung, ihren Glauben an mich und ihren stetigen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung von Pankreaskarzinomzellen mit unterschiedlichen Stammzeleigenschaften in metastasierungs-assoziierten Prozessen“

aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, unter der Betreuung von

Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe. Ich habe keine weiteren Quellen oder Hilfsmittel als die von mir aufgeführten benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend gekennzeichnet.

Ich versichere, weder diese noch eine andere Dissertation bereits an einer anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion eingereicht zu haben.