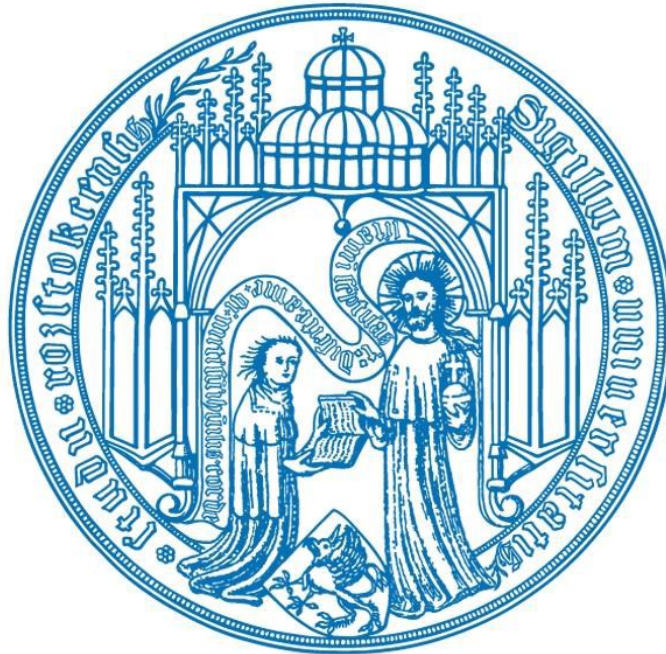


Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. univ. Brigitte Vollmar

Charakterisierung von potentiellen Tumorstammzellen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universität Rostock

vorgelegt von

Jonas Amme, geboren am 19. Juni 1989 in Kirchdorf a. d. Amper

Rostock, im Dezember 2016

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Hr. PD Dr. rer. nat. D. Zechner, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Hr. PD Dr. rer. nat. M. Linnebacher, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Hr. Prof. Dr. med. J. Weitz, Universitätsklinikum Dresden

Datum der Einreichung: 02.01.2017

Datum der Verteidigung: 26.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Glossar.....	I
Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1. Epidemiologie.....	1
1.1.2. Pathologie.....	1
1.1.3. Risikofaktoren.....	2
1.1.3.1. Modifizierbare und nicht modifizierbare Risikofaktoren.....	2
1.1.3.2. Diabetes mellitus Typ 2.....	2
1.1.3.3. Chronische Pankreatitis.....	3
1.1.4. Klinik und Diagnostik.....	4
1.1.4.1. Klinische Symptome.....	4
1.1.4.2. Bildgebende Verfahren.....	4
1.1.4.2.1. Sonographie und Computertomographie.....	4
1.1.4.2.2. Magnetresonanztomographie.....	5
1.1.4.2.3. PET/CT.....	6
1.1.5. Therapie.....	6
1.1.5.1. Chirurgische Therapie.....	6
1.1.5.2. Chemotherapie.....	7
1.1.5.3. Strahlentherapie.....	8
1.2. Tumorstammzellen.....	9
1.2.1. Tumorstammzellen im Fokus der Wissenschaft.....	9
1.2.2. Tumorstammzellhypothese.....	9
1.2.2.1. Historische Entwicklung der Tumorstammzellhypothese.....	9
1.2.2.2. Das hierarchische Modell der Tumorprogression.....	11

1.2.2.3.	Alternative Modelle der Tumorprogression	11
1.2.2.3.1.	Das stochastische Modell der Tumorprogression.....	11
1.2.2.3.2.	Das Interkonversionsmodell.....	12
1.2.3.	Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom.....	13
1.2.3.1.	Charakterisierung von Stammzellen im Pankreaskarzinom	13
1.2.3.2.	Definition von Stammzellen mittels Expression spezifischer Gene.....	13
1.3.	Zielstellung der Arbeit	14
2.	Material und Methoden.....	16
2.1.	Murine Adenokarzinomzelllinien und allgemeine Zellkultur	16
2.2.	Versuchstiere.....	17
2.3.	Durchführung der Tumorzellinjektion.....	17
2.4.	Anordnung der Experimente.....	18
2.5.	Bestimmung von Blutzucker und Blutentnahme	20
2.6.	Gewebeasservierung.....	20
2.7.	Bildgebung der Tumore mit Magnetresonanztomographie	21
2.8.	Analyse der MRT-Datensätze und Volumetrierung der Tumore	22
2.9.	Histologie.....	23
2.9.1.	Erstellung der histologischen Präparate	23
2.9.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
2.9.3.	Immunhistochemie für Paraffinschnitte	23
2.9.4.	Immunhistochemie für Kryoschnitte	25
2.9.5.	Histologische Auswertung.....	25
2.10.	Western Blot.....	26
2.10.1.	Vorbereitung der Zellen.....	26
2.10.2.	Bestimmung der Proteinmenge	26
2.10.3.	Auftrennung der Proteine anhand des Molekulargewichts.....	27

2.10.4.	Semi-Dry-Blot.....	28
2.10.5.	Blockierung, primäre und sekundäre Antikörper	28
2.10.6.	Ladungskontrolle der Gele	29
2.11.	Statistik.....	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Evaluation der Qualität unterschiedlicher Antikörper	31
3.2.	Eigenschaften der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I in vivo	33
3.2.1.	Anwachsrate der Tumore und Analyse des Blutbildes	33
3.2.2.	Analyse der Tumore mittels MRT.....	35
3.3.	Histomorphologische Eigenschaften der Zelllinien.....	37
3.4.	Charakterisierung des Stammzellkompartiments der Zelllinien.....	40
3.4.1.	Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP in den Pankreaskarzinomen.....	40
3.4.1.1.	Technische Optimierung der immunhistochemischen Antikörper	40
3.4.1.2.	Quantitative Analyse des Stammzellkompartiments der Tumore	42
3.4.2.	Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP in den Zelllinien.....	43
3.5.	Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf das Tumorstammzellkompartiment....	45
3.5.1.	Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf das Stammzellkompartiment der Tumore	45
3.5.2.	Einfluss von Diabetes auf das Tumorstammzellkompartiment der Zelllinien ...	47
3.6.	Einfluss von Gemcitabin auf das Tumorstammzellkompartiment.....	48
3.6.1.	Klonale Selektion durch Gemcitabin erhöht nicht die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP	48
3.6.2.	Kurzzeitstimulation mit Gemcitabin hat keinen Einfluss auf die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP.....	51
4.	Diskussion.....	55
4.1.	Bildgebung der Pankreastumore mittels MRT	55

4.2.	Syngenes orthotopes Karzinommodell des duktales Adenokarzinoms im Pankreas	56
4.3.	Einfluss von Diabetes auf Tumorstammzellen	58
4.3.1.	Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellage.....	58
4.3.2.	Einflussfaktor Insulin	58
4.3.3.	Einflussfaktor Glukose.....	60
4.4.	Einfluss von Pankreatitis auf Tumorstammzellen	63
4.4.1.	Einfluss der Inflammation auf Tumorstammzellen des Pankreas.....	63
4.4.2.	Mögliche Mechanismen	64
4.4.2.1.	ROS.....	64
4.4.2.2.	NF-kB.....	65
4.4.2.3.	Zytokine	66
4.5.	Einfluss von Gemcitabin auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment	66
4.5.1.	Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von ALDH1a1	66
4.5.2.	Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von CD133	68
4.5.3.	Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von GFAP	69
4.6.	Kritische Evaluation der Tumorstammzellhypothese beim Pankreaskarzinom	71
4.6.1.	Tumorstammzellen des Pankreas-Karzinom und die Modelle der Tumorprogression	71
4.6.2.	Einseitige Darstellung der Datenlage	72
4.7.	Klinische Relevanz und Ausblick.....	73
	Anhang.....	75
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	79
	Literaturverzeichnis.....	80
	Publikationsverzeichnis	101
	Thesen der Dissertation	102
	Selbstständigkeitserklärung	103

Glossar

ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
AML	akute myeloische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
CML	chronisch myeloische Leukämie
CT	Computertomographie
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
c-Met/ HGFR	hepatocyte growth factor receptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DM	Diabetes mellitus
DW-MRT	Diffusionsgewichtete Magnetresonanztomografie
ECOG-Performance Status	Eastern Cooperative Oncology Group-Performance Status
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESA	epithelial specific antigen
FA	flip angle
FACS	fluorescence activated cell sorting
FOLFIRINOX	Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin
FoV	field of view
Gem.	Gemcitabin
GEMM	genetically engineered mouse model
GFAP	glial fibrillary acidic protein
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-R	Insulin-like growth factor-receptor
IL	Interleukin
IPMN	intraductal papillary mucinous neoplasm
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting

MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MZN	muzinös zystische Neoplasie
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NOD	non-obese diabetic
PanIN	pancreatic intraepithelial neoplasia
PBS	phosphate buffered saline
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDX	patient-derived tumour xenograft
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PPW	Positiv-Prädiktive-Wert
ROI	Region of Interest
ROS	reactive oxygen species
SCID	severe combined immunodeficiency
TA	time of acquisition
TE	echo time
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TR	repetition time
TSE	turbospin echo
5-FU	5-Fluoruracil

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten und tödlichsten Tumoren weltweit. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sogenannte Tumorstammzellen einen wesentlichen Beitrag an der Tumorprogression, der Bildung von Metastasen, an Rezidiven und somit an der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms haben. Ziel dieser Studie war es, das potentielle Tumorstammzellkompartiment von drei murinen Adenokarzinomzelllinien zu untersuchen und den Einfluss von Diabetes, Pankreatitis und des Chemotherapeutikums Gemcitabin auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment zu analysieren.

Methodik: In einem syngenem Mausmodell wurden die Tumorzellen orthotop in das Pankreas injiziert. Das Tumorwachstum wurde mittels MRT im Verlauf des Versuchs bestimmt. Eine Cerulein-induzierten Pankreatitis und die Verwendung von adipösen Mäusen (B6.V-Lep^{ob/ob}) dienten zur Evaluation des Einflusses von Pankreatitis und Diabetes auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment mittels anti-ALDH1a1, anti-CD133 und anti-GFAP Antikörper. Die drei murinen Adenokarzinomzelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606l wurden *in vitro* bei unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose und Gemcitabin kultiviert. Anschließend wurde die Gen-Expression für ALDH1a1, CD133 und GFAP mittels Western Blot evaluiert.

Ergebnisse und Zusammenfassung: Der Diabetes führte zu einer signifikanten Reduktion von ALDH1a1⁺ Tumorzellen, jedoch hatte dies nur einen marginalen Einfluss auf die Anzahl CD133⁺ Tumorzellen. Die Pankreatitis hatte nur einen geringen Einfluss auf die Anzahl ALDH1a1⁺ Tumorzellen, führte jedoch zu einer moderaten Erhöhung der Anzahl CD133⁺ Tumorzellen. GFAP⁺ Zellen wurden wegen der nicht ausreichenden Färbung in der GFAP-Immunhistochemie nicht zur quantitativen Analyse des potentiellen Tumorstammzell-Kompartiments herangezogen. Die Exposition der drei Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606l gegenüber unterschiedlichen Glukosekonzentrationen zeigte *in vitro* keine signifikante Veränderung der Expression des ALDH1a1-Gens. Die Selektion Gemcitabin resistenter 6606PDA Zellklone oder eine vierundzwanzigstündige Inkubation von 6606PDA, 7265PDA oder 6606l Zellen mit Gemcitabin führte ebenfalls zu keiner signifikanten Änderung der Expression der ALDH1a1-, CD133- oder GFAP-Gene.

Abstract

Background: Pancreatic cancer is one of the most aggressive and lethal tumors worldwide. New scientific findings indicate, that so called cancer stem cells play an essential role when it comes to tumor-progression, building metastases, the chance of recurrence and therefore the overall bad prognosis of pancreatic cancer. The aim of this study was to investigate the potential cancer stem cell compartment in three murine cell lines of adenocarcinoma and to analyze the influence of diabetes, pancreatitis and of the chemotherapeutic gemcitabine on the compartment of potential cancer stem cells.

Methods: In a syngeneic mouse-model the tumor cells were orthotopically injected into the pancreas. In the course of the experiment tumor growth was determined by MRI. A cerulein-induced pancreatitis and the use of obese mice (B6.V-Lep^{ob/ob}) served to evaluate the influence of pancreatitis and diabetes on the potential cancer stem cell compartment. For the scientific evaluation, tumors were immunohistochemically processed using anti-ALDH1a1, anti-CD133 and anti-GFAP antibodies. The three murine cell lines of adenocarcinoma 7265PDA, 6606PDA and 6606I were grown in cell culture with different concentrations of glucose and gemcitabine. Afterwards the gene-expression for ALDH1a1, CD133 and GFAP was analyzed by Western Blot.

Results and Conclusion: Diabetes led to a significant reduction of ALDH1a1⁺ cancer cells, but had a minor effect on the number of CD133⁺ cancer cells. Pancreatitis only had little influence on the number of ALDH1a1⁺ cancer cells, but caused a moderate increase in the number of CD133⁺ cancer cells. Due to the non sufficient staining in the GFAP immunohistochemical analysis GFAP⁺ cancer cells were not used for the quantitative analysis of the potential cancer stem cell compartment. The exposition of the three cell lines 7265PDA, 6606PDA and 6606I towards different concentrations of glucose showed in vitro no significant change in the expression of the ALDH1a1-gene. The selection of gemcitabine-resistant clones from the 6606PDA cellline as well as the incubation of the 6606PDA, 7265PDA or 6606I cells with gemcitabine for 24 h did not lead to a significant change in the gene-expression for ALDH1a1, CD133 or GFAP.

1. Einleitung

1.1. Pankreaskarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Weltweit wird die jährliche Inzidenz des Pankreaskarzinoms auf über 300.000 Fälle geschätzt. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten gehört es mit dieser Neuerkrankungsrate zu den eher selteneren Krebserkrankungen [1]. Durch die hohe Letalität von nahezu 98% gehört es aber zu den sieben häufigsten Todesursachen bedingt durch Krebs weltweit [1]. Auch in Deutschland gehört das Pankreaskarzinom mit einem prozentualen Anteil von 3,3% bei den Männern und mit 3,8% bei den Frauen zu den weniger häufigen Krebserkrankungen [2]. Dennoch ist es auch in Deutschland mit einem prozentualen Anteil an allen Krebssterbefällen sowohl bei den Männern mit 6,6% und bei den Frauen mit 8,1% die viert-häufigste Todesursache bedingt durch Krebs [2]. Das mittlere Erkrankungsalter für das Pankreaskarzinom in Deutschland beträgt 71 Jahre für Männer und 75 Jahre für Frauen [2]. Seit Ende der 1990er Jahre sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten nahezu konstant. Aufgrund des demographischen Wandels, nämlich der immer älter werdenden Bevölkerung, kommt es zu einem Anstieg der absoluten Fallzahlen [3]. Eine Prognose für Deutschland schätzt 2016 die Neuerkrankungen auf 9100 Fälle bei den Männern und 9500 bei den Frauen [2].

1.1.2. Pathologie

Bei den malignen Erkrankungen des exokrinen Pankreas stellt das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) mit über 90 % die häufigste Entität dar [4]. Die Tumore sind vor allem im Pankreaskopf lokalisiert (60-70 %) und nur selten im Pankreaskörper oder Pankreasschwanz. Die meisten PDAC sind gut bis mäßig differenzierte Karzinome. Histologisch präsentieren sich diese Tumore durch gut differenzierte glanduläre Strukturen und ein die Tumorzellen umgebendes desmoplastisches Stroma. Maligne Zellen zeigen Zellkerne unterschiedlicher Größe und mit dem Grad der Entdifferenzierung nimmt die Anzahl der Mitose-Figuren zu. Drüsenformationen nehmen ab und können bei schlecht differenzierten PDAC oft gänzlich fehlen [4,5]. Zu den wichtigsten nicht invasiven

Vorläuferläsionen des PDAC gehören die intraepithelialen Neoplasien (PanIN), die intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien (IPMN) und die muzinös-zystischen Neoplasien (MZN) [4].

1.1.3. Risikofaktoren

1.1.3.1. Modifizierbare und nicht modifizierbare Risikofaktoren

Bei den Risikofaktoren des Pankreaskarzinoms kann man unterscheiden zwischen modifizierbaren und nicht-modifizierbaren (genetischen) Risikofaktoren. Zu den genetischen Erkrankungen, welche das Risiko für ein Pankreaskarzinom erhöhen, gehören z. B. das Lynch-Syndrom (8,6-fach), die familiäre adenomatöse Polyposis (4,5-6-fach), das familiäre typische multiple Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM) (47-fach), die Mukoviszidose (3,5-fach) und das Peutz-Jeghers-Syndrom (132-fach). Zu den wichtigsten modifizierbaren Risikofaktoren für ein Pankreaskarzinom zählen z. B. das Rauchen (1,5-2,2-fach), Alkohol (1,2-1,4-fach), Adipositas (1,5-2,8-fach), eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (1,4-fach), der Diabetes mellitus (DM) Typ 2 und die chronische Pankreatitis [6].

1.1.3.2. Diabetes mellitus Typ 2

Um mögliche Zusammenhänge und die Bedeutung des DM Typ 2 als Risikofaktor für ein Pankreaskarzinom zu ermitteln, gab es bis jetzt drei große Meta-Analysen (Everhart et al. 1995, Huxley et al. 2005, Ben et al. 2011) welche alle eine erhöhtes Risiko für ein Pankreaskarzinom bei bestehendem Diabetes mellitus feststellen konnten. In der neuesten Studie konnte gezeigt werden, dass eine Erkrankung an einem Diabetes mellitus Typ 2 das Risiko für ein Pankreaskarzinom deutlich erhöht (RR = 1,94; 95 % CI, 1,66–2,27).

Auf welche Art und Weise der Diabetes mellitus Typ 2 das Risiko für ein Pankreaskarzinom erhöht, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Bislang konnte man zeigen, dass eine Hyperglykämie [7] und Hyperinsulinämie [8] das Risiko für ein Pankreaskarzinom erhöhen. Des Weiteren stellt auch die Therapieform des Diabetes einen Risiko modulierenden Faktor dar. So verringert eine Therapie mit Metformin (AOR: 0,38, 95 % CI, 0,22-0,69) das Risiko,

wohingegen Insulin (AOR: 4,99, 95 % CI, 2,59-9,61) oder Insulinsekretagoga (AOR: 2,52, 95 % CI, 1,32-4,84) dieses deutlich erhöhen [9].

1.1.3.3. Chronische Pankreatitis

Bereits 1863 vermutete der deutsche Arzt R. L. K. Virchow, dass eine chronische Entzündung ursächlich für ein Karzinom sein könnte [10]. Diese Hypothese konnte für viele weitere Organsysteme bestätigt werden. Z. B. kann ein chronischer Reflux über eine Barrett-Metaplasie zum Karzinom der Speiseröhre führen, eine chronische Cholezystitis erhöht das Risiko für ein Gallenblasenkarzinom und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa erhöhen das Risiko für Darmkrebs [11]. So ist auch die Pankreatitis ein bedeutender Risikofaktor für das Pankreaskarzinom. Die Angaben zur Inzidenz einer chronischen Pankreatitis in den Industrienationen variieren stark und sie wird auf 4,05 bis 36,9/ 100.000 Einwohner geschätzt [12,13].

Während das durchschnittliche Lebenszeitrisiko für eine Pankreaskarzinom bei ca. 1 % liegt [14], erhöht die chronische Pankreatitis im Vergleich zur Normalbevölkerung das Risiko für ein Pankreaskarzinom um den Faktor 13 (RR: 13,3, 95 % CI, 6,1–28,9). Dieses Risiko ist besonders erhöht bei Patienten mit einer hereditären Pankreatitis (RR: 69,0, 95 % CI, 56,4–84,4). Dennoch entwickeln innerhalb von 20 Jahren nur etwa 5 % der Patienten mit einer chronischen Pankreatitis ein Pankreaskarzinom [15].

Eine Vielzahl von präklinischen Studien konnte den additiven Effekt von oxidativem Stress und Inflammation bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms nachweisen. Dieser wurde vor allem in Mäusen mit KRAS-Mutation untersucht und es konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von NSAR (Nicht-Steroidale-Antirheumatika) der circulus vitiosus, bestehend aus übermäßig viel exprimiertem KRAS und Inflammation, durchbrochen werden konnte [16,17]. KRAS ist auch beim Menschen in über 90 % der duktaalen Adenokarzinome des Pankreas durch Punktmutation verändert [18]. Der präventive Nutzen einer antiinflammatorischen Therapie beim Pankreaskarzinom liegt folglich nahe und wurde in einigen epidemiologischen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Einnahme von Acetylsalicylsäure für mindestens fünf Jahre das Risiko für ein Pankreaskarzinom um bis zu 75 % gesenkt werden konnte [19]. Auch für andere Nicht-Steroidale-Antirheumatika konnte

ein protektiver Effekt festgestellt werden. Die Einnahme von Coxiben und Oxycamen für mindestens fünf Jahre senkt das Risiko für ein Pankreaskarzinom um 20 bzw. 33 % [20].

1.1.4. Klinik und Diagnostik

1.1.4.1. Klinische Symptome

Frühe Tumorstadien des Pankreaskarzinoms zeigen meist keine Symptome. Diese sind auch in einem fortgeschrittenen Stadium klinisch meist sehr unspezifisch. Zu diesen Symptomen gehören Appetitlosigkeit, Dysphagie, dyspeptische Beschwerden, Übelkeit und Erbrechen, abdominelle Schmerzen und Distension, Blähungen, veränderte Stuhlgewohnheiten wie Obstipation und Diarrhoe, ein neu aufgetretener Diabetes, Ikterus, Gewichtsverlust, Brustschmerzen, Schulter- und Rückenschmerzen, Juckreiz, Abgeschlagenheit und Antriebslosigkeit [21]. In einer Fall-Kontroll-Studie von 2012 konnte man von einigen Symptomen den Positiv-Prädiktiven-Wert (PPW) für das Vorhandensein eines Pankreaskarzinoms ermitteln. Hierbei hatte der Ikterus alleine oder in Kombination mit anderen Symptomen den höchsten PPW von 21,6 bis 22,3 %. Der Verlust von Gewicht (nicht näher definiert) alleine oder in Kombination zeigte die zweithöchsten PPW's von 0,8 bis 2,7 % [22]. Die Symptome des Pankreaskarzinoms sind unspezifisch, aber es sollte als Differentialdiagnose stets in Betracht gezogen werden.

1.1.4.2. Bildgebende Verfahren

1.1.4.2.1. Sonographie und Computertomographie

Der transabdominelle Ultraschall ist bei ersten klinischen Anzeichen, insbesondere bei einem Ikterus, häufig das erste diagnostische Mittel zur Abklärung einer möglichen Raumforderung im Pankreas [23]. Die retroperitoneale Lage des Pankreas, die Konstitution der Patientinnen und Patienten und Faktoren, welche die Schallausbreitung stören (z. B. intraabdominelle Luft), können das Ergebnis der Sonographie stark beeinflussen [24]. Die Sonographie hat v. a. bei Tumoren >3 cm eine sehr hohe Sensitivität (90 %) und Spezifität (99 %) [25,26]. Nach der Sonographie stellt die Computertomographie mit der Verwendung von iodhaltigem Kontrastmittel ein weiteres Diagnoseverfahren zur Detektion eines Pankreaskarzinoms dar.

[27]. Hinsichtlich der Primärdiagnostik und Resezierbarkeit des Adenokarzinoms im Pankreas bietet das Spiral-CT eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität (91 % und 85 %) [28]. Um Tumorausdehnung, potentielle Metastasen und Resektabilität des Pankreaskarzinoms hinreichend zu beurteilen, wird die Bildgebung mittels des Endoskopischen Ultraschalls und der Multidetektor-Computertomographie empfohlen [29].

1.1.4.2.2. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie bietet neben der regulären MRT-Bildgebung auch die Möglichkeit zur Diffusionsgewichteten Magnetresonanztomografie (DW-MRI) und der Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP). Pankreaskarzinome stellen sich in einer Fett-supprimierten T1-Sequenz im Vergleich zum umgebenden Pankreasgewebe hypointens dar. In der T2-Sequenz kann das Pankreaskarzinom unterschiedliche Erscheinungsformen aufweisen [30]. Die geringere Strahlenbelastung, als z. B. beim CT, ist besonders entscheidend bei jungen Menschen und Patienten, welche regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen benötigen [31]. Im Vergleich zum CT hat das MRT eine bessere Auflösung des Weichteilgewebes, wodurch ein diagnostischer Vorteil bei kleinen (<2 cm) und isointensen Pankreaskarzinomen entsteht. Auch in dem Fall einer Kontraindikation für jodiertes Kontrastmittel, welches in der CT-Bildgebung verwendet wird, bietet die MRT mit Kontrastmitteln auf der Basis von Gadolinium eine zuverlässige Alternative [32]. Die Diffusionsgewichtete MRT, welche die Diffusion von Wassermolekülen (Brownsche Molekularbewegung) analysiert, bietet zusätzliche Möglichkeiten, wie z. B. die differentialdiagnostische Unterscheidung zwischen einem Pankreaskarzinom und einer Pankreatitis. Dennoch gibt es bis heute kein standardisiertes Verfahrensprotokoll und einen abschließenden Konsens über Vor- und Nachteile dieses Verfahrens werden zukünftige Studien ergeben [33,34]. Die MRCP ermöglicht die nicht-invasive Darstellung von Pankreas- und Gallengängen. Strikturen oder Erweiterungen können Hinweise auf mögliche Raumforderungen geben. Die MRCP ist heutzutage ein mit der ERCP vergleichbares Verfahren [30,35].

1.1.4.2.3. PET/CT

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein Verfahren zur Detektion von Stoffwechselprozessen. In der Kombination mit der CT, welches eine hohe Ortsauflösung hat und detailreiche Informationen zur Anatomie liefert, kann die Spezifität und Sensitivität dieses Verfahrens verbessert werden [36]. Eine Metaanalyse von 2014 konnte zeigen, dass die ¹⁸Fluor-Desoxyglukose PET und die ¹⁸Fluor-Desoxyglukose PET/CT bei der Diagnostik des Pankreaskarzinoms gegenüber den herkömmlichen Verfahren, wie CT und MRT, keinen diagnostischen Vorteil bieten [37]. Um für den Patienten die bestmögliche Versorgung zu gewährleisten, sollten jedoch alle Möglichkeiten der diagnostischen Verfahren in Betracht gezogen werden.

1.1.5. Therapie

1.1.5.1. Chirurgische Therapie

Die chirurgische Resektion des nicht metastasierten Pankreaskarzinoms stellt bis heute die einzig potentielle kurative Therapie dar [38,39]. Die National Comprehensive Cancer Network (NCCN) gibt Richtlinien vor, welche die Resezierbarkeit eines Pankreaskarzinoms in drei Kategorien einteilt: resezierbar, grenzwertige Resektabilität und nicht resezierbar. Hierbei spielen v. a. das Vorhandensein von Metastasen und die Tumordinfiltration von abdominalen Gefäßen eine entscheidende Rolle [40]. Im Falle eines Pankreaskopfkarcinoms erfolgt eine Partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple oder nach Traverso-Longmire, die sog. Pyloruserhaltende Partielle Duodenopankreatektomie. Hinsichtlich der Morbidität, Mortalität und Überlebensrate gibt es zwischen den beiden Verfahren keine signifikanten Unterschiede [41]. Für linksseitige Pankreaskarzinome (Korpus und Kauda) stellt die Pankreaslinksresektion, unter Mitnahme der Milz und des regionären Lymphabstromgebietes, die Therapie der Wahl dar. Aufgrund ihrer Lokalisation im Pankreas zeigen diese Tumore meist erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium klinische Symptome. Trotzdem ist bei radikaler Resektion die Prognose des Adenokarzinoms von Korpus und Kauda nicht schlechter als die des Pankreaskopfes [42]. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt für beide Tumorlokalisationen nach Resektion bei ca. 20 % [43].

1.1.5.2. Chemotherapie

Bis heute gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Effektivität einer neoadjuvanten Chemotherapie beim resektablen Pankreaskarzinom befassen [44]. Durch eine neoadjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder Gemcitabin/Cisplatin konnte die Rate an R0 Resektionen erhöht und die mittlere Überlebenszeit um 3- 5 Monate verlängert werden [45,46]. Dennoch sind diese Phase-II-Studien aufgrund ihrer geringen Teilnehmerzahl kritisch zu beurteilen. Kontrollierte randomisierte Studien, die auch neuere Chemotherapiekonzepte wie z. B. das FOLFIRINOX-Schema berücksichtigen, würden helfen, um in Zukunft diese Fragestellung besser beantworten zu können.

Der Vorteil einer adjuvanten Chemotherapie im Vergleich zu alleiniger chirurgischer Resektion des Tumors in Bezug auf das krankheitsfreie Intervall konnte bis jetzt in einigen Studien gezeigt werden [47–50]. Dieses konnte bei adjuvanter Chemotherapie um bis zu 6 Monate verlängert werden [47]. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug ca. 20 % bei den Patienten, welche eine adjuvante Chemotherapie erhielten und ca. 10 % bei denen, welche nur operiert wurden [47,48,50]. Der positive Effekt auf das mediane Gesamtüberleben nach adjuvanter Chemotherapie konnte sowohl für R0 und R1 resezierte Karzinome gezeigt werden (21,7 Monate bei R0 vs. 22,1 Monate bei R1) [47]. Vor- und Nachteile einer adjuvanten Therapie mit 5-Fluoruracil (5-FU) oder Gemcitabin (Gem.), als die beiden gebräuchlichsten Chemotherapeutika zur adjuvanten Behandlung des duktaalen Adenokarzinoms im Pankreas [48], wurden in einer kontrolliert randomisierten Studie der European Study Group for Pancreatic Cancer (ESPAC) im Jahr 2010 untersucht. Eingeschlossen in die Studie waren Patienten nach erfolgreicher makroskopischer Tumorresektion (R0 oder R1). Hinsichtlich der medianen Überlebenszeit (5-FU: 23,0 Monate, Gem.: 23,6 Monate), des krankheitsfreien Intervalls (5-FU: 14,1 Monate, Gem.: 14,3 Monate) und der Lebensqualität (erfasst anhand eines Fragenkatalogs) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungskonzepten festgestellt werden. Bei den Nebenwirkungen zeigte die Behandlung mit 5-FU deutlich mehr Stomatitiden und Fälle von Diarrhoe, bei der Behandlung mit Gemcitabin traten deutlich häufiger Veränderungen des Blutbilds auf. Für eine adjuvante Chemotherapie gelten beide Substanzen, bzw. deren Chemotherapieprotokolle, als vergleichbare und praktikable Optionen [51].

Der Nutzen einer palliativen Chemotherapie gegenüber einer rein supportiven Therapie beim lokal weit fortgeschrittenen, inoperablen oder metastasierten Pankreaskarzinom konnte schon früh erbracht werden [52,53]. Seit der Studie von Burris et al. gilt Gemcitabin als Chemotherapeutikum der ersten Wahl zur palliativen Behandlung des Pankreaskarzinoms [54]. Studien, welche die Kombination von Gemcitabin mit Cisplatin, Capecitabin oder Oxaliplatin untersuchten, konnten keine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit einer Gemcitabin-basierten-Kombinationstherapie mit diesen Chemotherapeutika gegenüber einer Gemcitabinmonotherapie zeigen [55–57]. Für die Kombination von Gemcitabin und Erlotinib, einem Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosinkinaseinhibitor, konnte jedoch eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie gezeigt werden [58]. Für das metastasierte Pankreaskarzinom bietet eine Kombinationschemotherapie aus Folinsäure, 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) eine zusätzliche und noch effektivere Therapiemöglichkeit als mit Gemcitabin alleine. Da dieses Regime aber generell mit mehr Nebenwirkungen verbunden ist, sollte im Vorfeld der ECOG-Performance-Status der Patienten kritisch evaluiert werden [59]. Des Weiteren ist die Kombination aus Gemcitabin plus nab- (nanoparticle-albumin-bound) Paclitaxel eine Therapieoption beim metastasierten Pankreaskarzinom, welche das Gesamt- und progressionsfreie Überleben signifikant verlängert [60].

1.1.5.3. Strahlentherapie

Der Nutzen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie wird bis heute kontrovers diskutiert. [61–63]. Eine aktuelle multizentrische Studie, welche den Einfluss der neoadjuvanten Radiochemotherapie untersucht, wird eventuell einen Beitrag zu dieser Fragestellung liefern [64]. Ebenso wie bei der neoadjuvanten Therapie gibt es für den Nutzen einer adjuvanten Radiochemotherapie keinen einheitlichen Konsens [50,65–67]. Neben der Chemotherapie kommt in der palliativen Therapie die Strahlentherapie v. a. bei der Symptom-Kontrolle zum Einsatz. Eine Indikation zur Bestrahlung stellen z. B. Schmerzen durch Nerveninfiltrationen oder die ossäre Metastasierung dar [68].

1.2. Tumorstammzellen

1.2.1. Tumorstammzellen im Fokus der Wissenschaft

Das Pankreaskarzinom hat bis heute auch bei adäquater Therapie eine sehr schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 8,5% [2] und in den letzten 10 Jahren konnten die Therapie und Prognose dieses Tumorleidens nicht verbessert werden [69]. Als Hauptverantwortliche für Therapieversagen und Tumorrezidive sind im Rahmen neuer Erkenntnisse aus der Tumorbilogie sogenannte Tumorstammzellen immer weiter in den Focus der Wissenschaft gerückt [70].

Die American Association for Cancer Research (AACR) definierte Tumorstammzellen als eine Subpopulation an Zellen innerhalb des Tumors, welche einerseits durch symmetrische Zellteilung die Eigenschaft zur Selbsterneuerung haben und andererseits auch die Fähigkeit besitzen, durch asymmetrische Zellteilung die zelluläre Heterogenität des ursprünglichen Tumors zu generieren und aufrecht zu erhalten [71].

Von unterschiedlichen Forschungsgruppen konnte beobachtet werden, dass durch das Vorhandensein von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom die Prognose und die 5-Jahres-Überlebensrate der Erkrankung erheblich reduziert wird [69,72,73]. Ein wesentlicher Faktor, der hierbei eine Rolle spielt, ist eine erhöhte Resistenz von Tumorstammzellen gegenüber einer Chemo- und Strahlentherapie [74,75]. Anhand von weiteren präklinischen Studien wird angenommen, dass v. a. Tumorstammzellen für die Invasivität und Metastasierung des Pankreaskarzinoms verantwortlich sind [76,77]. Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, inwieweit konventionelle Therapieverfahren neu überdacht werden müssen, um auch in Zukunft alle Zellen des Tumors therapeutisch zu erfassen und die Prognose des Pankreaskarzinoms nachhaltig zu verbessern.

1.2.2. Tumorstammzellhypothese

1.2.2.1. Historische Entwicklung der Tumorstammzellhypothese

Bereits 1941 diskutierte man die Theorie von Tumorstammzellen. In adulten Teratokarzinomen beobachtete man differenzierte und weniger differenzierte Zellen. Mitotische Aktivität war fast ausschließlich in wenig differenzierten Teratokarzinomzellen zu beobachten und man folgerte, dass diese Zellen für das Wachstum des Tumors verantwortlich sind [78]. Diese Theorie konnte später durch Lewis et al. bestätigt werden,

indem sie zeigten, dass einzelne multipotente Tumorzellen in der Lage waren, differenzierte Teratokarzinome zu bilden [79]. Parallel dazu trugen v. a. Erkenntnisse der Leukämieforschung zu einer Verdichtung der Tumorstammzelltheorie bei. Die Entdeckung des Philadelphia-Chromosom 1960 in der chronisch myelischen Leukämie (CML) lieferte erstmals den genetischen Beweis, dass neoplastische Veränderungen an eine bestimmte genetische Mutation gekoppelt waren und man vermutete einen klonalen Ursprung der CML [80]. Der Nachweis des Philadelphia-Chromosoms in allen anderen Zellen der Myelopoese, bestätigte die Vermutung, dass die CML aus einer abnormen, multipotenten hämapoetischen Vorläufer-Zelle entsteht [81,82]. Fialkow et al. konnten später den formalen Beweis für diese Vermutung erbringen. In einer Gruppe von Patientinnen, die an einer CML erkrankt und heterozygote Allelträger für das Gen der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) waren, wurde in Hautzellen, Erythrozyten und Granulozyten die Isoformen der G6PDH ermittelt. Beide Isoformen des Enzyms wurden zu etwa gleichen Anteilen in den Hautzellen analysiert. Erythrozyten und Granulozyten exprimierten jedoch nur eine Isoform der G6PDH. Dies war der Beweis dafür, dass Erythrozyten und Granulozyten eine gemeinsame Progenitor-Zelle haben und somit die CML einen klonalen Ursprung hat [83].

Die Isolation von Tumorstammzellen stellte lange Zeit eine große Herausforderung dar. Technische Innovationen, wie die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting /FACS) machten es erst möglich, Zellen anhand von immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen (engl. Cluster of Differentiation/ CD) zu selektionieren. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten Bonnet und Dick 1997 erstmals Tumorstammzellen in der akuten myeloischen Leukämie (AML) nachweisen [84]. Aufbauend auf den Erkenntnissen vorhergehender Studien [85,86] wurden $CD34^{++}CD38^{-}$ Zellen aus dem peripherem Blut von Patienten mit einer AML mittels FACS isoliert. Diese Zellen wurden NOD/SCID-Mäusen (NOD: engl. Non-Obese Diabetic, SCID: engl. Severe Combined Immunodeficiency) intravenös injiziert. Diese isolierte Subpopulation an Zellen konnte die zelluläre Heterogenität der ursprünglichen AML des Donators wieder herstellen. Außerdem konnten sie durch serielle Transplantation der $CD34^{++}CD38^{-}$ Zellen weitere AMLs in den Mäusen erzeugen. Durch diese Versuche konnten sie zeigen, dass die AML hierarchisch organisiert ist und dass deren Ursprung $CD34^{++}CD38^{-}$ Tumorstammzellen sind, welche die Fähigkeit zur symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung haben [84].

1.2.2.2. Das hierarchische Modell der Tumorprogression

Bis heute gibt es verschiedene Theorien der Tumorprogression. In dem hierarchischen Modell der Tumorprogression (Abbildung 1 A) sind Tumorstammzellen eine bestimmte zelluläre Untereinheit innerhalb des gesamten Tumors. Diese Zellen sind in der Lage sich selbst zu erneuern und differenzierte Tochterzellen zu erzeugen, welche wiederum kein Potential zur Selbsterneuerung haben. Die Möglichkeit, dass sich Tochterzellen mit limitiertem Wachstumspotential zu Tumorstammzellen mit unlimitiertem Wachstumspotential entwickeln, ist in diesem Modell ausgeschlossen. Die Tumorprogression ist ein unidirektionaler Prozess, welcher ausschließlich von Tumorstammzellen ausgeht. Um in der klinischen Praxis Tumorwachstum zu stoppen und Rezidive zu verhindern, ist es demnach unerlässlich, die Proliferation der Tumorstammzellen zu terminieren [87,88]. Das Modell der hierarchischen Tumorprogression stützt sich v. a. auf die Erkenntnisse der physiologischen und leukämischen Hämatopoese [89].

1.2.2.3. Alternative Modelle der Tumorprogression

1.2.2.3.1. Das stochastische Modell der Tumorprogression

Eine Alternative zu dem hierarchischen Modell bietet das stochastische Modell der Tumorprogression (Abbildung 1 B). In diesem Modell gilt die Annahme, dass jede Zelle innerhalb des Tumors das Potential hat, als Stammzelle zu fungieren. Durch zufällige, zusätzliche genetische oder epigenetische Veränderungen können Nicht-Tumorstammzellen das Potential einer Tumorstammzelle erlangen [87,88]. Ebenso wie beim hierarchischen Modell geht die weitere Tumorzellproliferation dann von Tumorstammzellen aus, sodass auch hier die Tumorprogression ein unidirektionaler Prozess ist. Das Stochastische Modell gründet sich auf die Beobachtung, dass Tumore [90,91] und Tumorstammzellen [92,93] eine große genetische Variabilität aufweisen können. Diese Erkenntnisse deuten auf einen multi-klonalen Entwicklungsprozess von Tumoren hin, mit genetisch verschiedenartigen Tumorstammzellen [94].

1.2.2.3.2. Das Interkonversionsmodell

Eine weitere Alternative der Tumorprogression ist das Interkonversionsmodell (Abbildung 1 C). Dieses Modell gründet sich auf der Annahme, dass der Tumorstammzell-Status nicht statisch und dauerhaft, sondern ein dynamischer und bidirektionaler Prozess ist [95]. Tumorzellen können abhängig vom Kontext zwischen einem „Stammzell-“ und „Nicht-Stammzell-Status“ wechseln [87]. Dieses Modell gründet sich auf der Beobachtung, dass aus selektionierten Nicht-Tumorstammzellen in vitro ebenso Tumorstammzellen wie Nicht-Tumorstammzellen entstehen konnten [96,97]. Faktoren bzw. Singaltransduktionswege, die hierbei eine Rolle spielen, sind die Aktivierung der Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) durch das Protein ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1) [98] oder des Wnt-Signalwegs durch den Transkriptionsfaktor NF-kB [99].

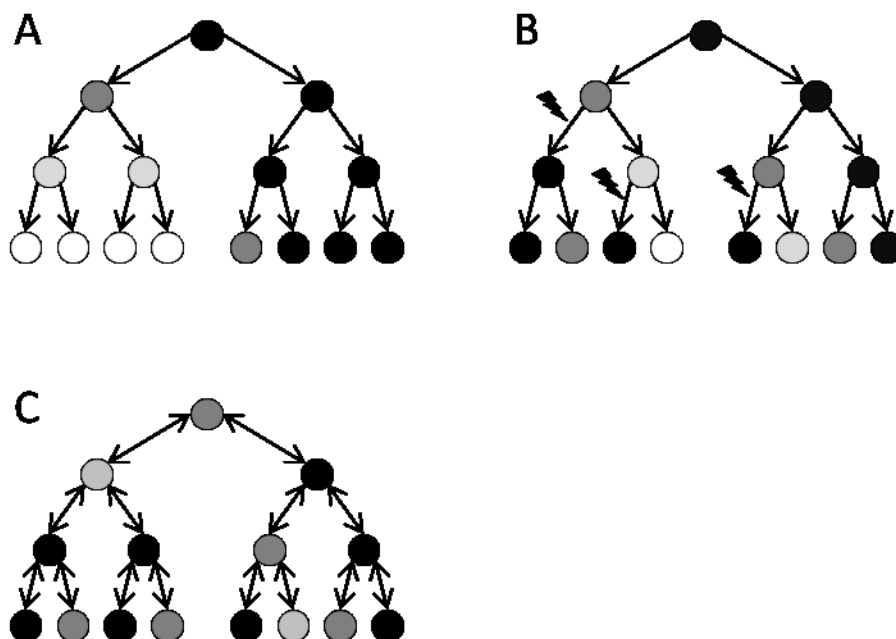


Abbildung 1: Modelle der Tumorprogression

(A) Hierarchisches Modell, (B) Stochastisches Modell und (C) das Interkonversionsmodell der Tumorprogression; schwarze Kreise: Tumorstammzellen; graue und weiße Kreise: Progenitor- und differenzierte Zellen; Pfeile: Richtung der Zelldifferenzierung; Blitze: zusätzliche genetische Veränderungen

1.2.3. Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom

1.2.3.1. Charakterisierung von Stammzellen im Pankreaskarzinom

Wie oben schon erwähnt, wurde der erste Nachweis von Tumorstammzellen in der AML erbracht. In soliden Tumoren gelang dies erstmals Al-Hajj et al. in Tumoren der Brust. Sie konnten zeigen, dass eine bestimmte Subpopulation an $ESA^+CD44^+CD24^{-/low}$ Zellen für die Progression des Brustkrebses verantwortlich war [100]. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen identifizierten Li et al. 2007 Tumorstammzellen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen humaner Pankreaskarzinome anhand der Expression von ESA, CD44 und CD24 sortiert. Die Tumorzellen wurden subkutan in NOD/SCID-Mäuse injiziert und es zeigte sich, dass $ESA^+CD44^+CD24^+$ Zellen im Vergleich zu $ESA^-CD44^-CD24^-$ Zellen ein 100-fach erhöhtes Potential hatten Tumore zu erzeugen. Durch histologische Analysen der neu generierten Tumore und serielle Transplantation der Tumorzellen konnte man die Fähigkeit zur Differenzierung und Selbsterneuerung der $ESA^+CD44^+CD24^+$ Zellen nachweisen und somit zeigen, dass es sich hierbei um Tumorstammzellen handelt [101].

1.2.3.2. Definition von Stammzellen mittels Expression spezifischer Gene

Bis heute gibt es verschiedene Oberflächenproteine, die zur Identifikation von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom verwendet werden. Dazu gehören ESA, CD44, CD24, CD133, ALDH und c-Met (Tabelle 1). Wie oben schon angeführt, waren Li et al. die ersten, welche $ESA^+CD44^+CD24^+$ Zellen als Tumorstammzellen klassifizieren konnten [101]. Hermann et al. konnten zeigen, dass im Vergleich zu $CD133^-$ Zellen nur $CD133^+$ Zellen in der Lage waren, Pankreaskarzinome zu generieren. Des Weiteren zeigten $CD133^+$ Zellen im Vergleich zu $CD133^-$ Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber Gemcitabin. Zusätzlich wurde die Beobachtung gemacht, dass eine bestimmte Subpopulation der Tumorstammzellen für die Bildung von Metastasen verantwortlich ist. Diese $CD133^+CXCR4^+$ Tumorstammzellen traten v. a. an der invasiven Front der Tumore auf. CXCR4 wurde nicht als Stammzellmarker klassifiziert, sondern als Identifikationsmerkmal für migrierende $CD133^+$ Tumorstammzellen [76]. Auch ALDH wird als Tumorstammzellmarker angesehen. Kim et al. konnten zeigen, dass die Expression von ALDH entscheidend für die Tumorgenese nach Zelltransplantation ist. Im Vergleich zu $ALDH^+$ Zellen konnten $ALDH^-$ Zellen signifikant weniger bis gar keine Tumore

generieren. Weiter stellten sie fest, dass in ihren Versuchen die Koexpression von CD133 das tumorigene Potential von ALDH⁺ Stammzellen herabsetzte. Diese Beobachtung widerspricht zwar den Erkenntnissen von Hermann et al., aber in der Studie von Kim et al. hatte der ALDH Status einen weitaus bedeutenderen Einfluss auf das Tumorstammzellpotential, als die Koexpression von CD133 [102]. Anhand der vermehrten Expression von c-Met konnten Li et al. Tumorzellen analysieren, die ein stark erhöhtes Potential hatten, Tumore zu bilden. Weiter konnten sie beobachten, dass durch die Inhibition von c-Met durch Cabozantinib (XL184) das Tumorstammzellwachstum stark reduziert und eine Metastasierung in vivo unterbunden wurde. Somit gilt c-Met ebenfalls als Tumorstammzellmarker im Pankreas [77]. Obwohl die Kriterien zur Identifikation von Tumorstammzellen in den eben aufgeführten Studien sehr heterogen sind, gelten dennoch ESA, CD44, CD24, CD133, ALDH und c-Met als anerkannte und gut etablierte Oberflächenproteine zur Identifikation von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom [103,104].

1.3. Zielstellung der Arbeit

Mit der Entdeckung von Tumorstammzellen änderte sich hinsichtlich der funktionellen Heterogenität von Tumorzellen der Blickwinkel auf Tumore. Um ein tiefer greifendes Verständnis für die zelluläre Zusammensetzung und potentiellen Einflüsse auf Tumorstammzellen im duktalem Adenokarzinom des Pankreas bezüglich der Tumorstammzellprogression zu gewinnen, war es das Ziel dieser Studie, das Tumorstammzellkompartiment von drei murinen Adenokarzinomzelllinien zu untersuchen. Des Weiteren war die Analyse von exogenen Einflüssen wie Diabetes, Pankreatitis und des Chemotherapeutikums Gemcitabin auf das Tumorstammzellkompartiment Gegenstand dieser Arbeit.

Tabelle 1: Oberflächenproteine zur Identifikation von Tumorstammzellen im Pankreas.

Membranprotein	Isolationsmethode	Anteil der positiven Zellen [%]	Transplantierte Zellen generieren einen Tumor	Serielle Transplantation	Erstmals beschrieben
ESA, CD44, CD24	FACS	0,2-0,8 ^a	100 ESA ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺ Zellen in 50% der Fälle	ist erfolgt	2007, Li et al. [101]
CD133	MACS	1-2 ^b	500 CD133 ⁺ Zellen in 80% d. F.	ist erfolgt	2007, Hermann et al. [76]
ALDH	FACS	2,6 ^c	100 ALDH ^{high} /CD133 ⁺ Zellen in 43% d. F.; 100 ALDH ^{high} /CD133 ⁻ Zellen in 100% d. F.	ist erfolgt	2011, Kim et al. [102]
c-Met	FACS	2-16 ^a	100 c-Met ^{high} Zellen in 35% d. F.	ist nicht erfolgt	2011, Li et al. [77]

a: in humanen Adenokarzinomen des Pankreas, b: in humaner Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl, c: in humanen duktalem Adenokarzinomen des Pankreas

2. Material und Methoden

2.1. Murine Adenokarzinomzelllinien und allgemeine Zellkultur

Die murinen Adenokarzinomzelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I stammen ursprünglich von der Arbeitsgruppe von Prof. Tuveson (University of Cambridge). Diese Zelllinien konnten aus einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (7265PDA, 6606PDA) bzw. der dazugehörigen Lebermetastase (6606I) aus genetisch veränderten C57BL/6J Mäusen isoliert werden. Die Karzinome entstanden durch gewebespezifische Veränderungen mittels dem Cre/loxP-System. Durch den Transkriptionsfaktor p48 ist die Expression des Onkogens KRAS^{G12D} innerhalb des Pankreas bei der 6606PDA und 6606I erhöht und führt zur Karzinogenese. Vermittelt durch den Transkriptionsfaktor Pdx1 exprimieren die Mäuse, aus denen die 7265PDA isoliert werden konnte, neben dem Onkogens KRAS^{G12D} auch eine Mutation des TP53-Tumorsuppressor-Gen (p53^{R172H}), was zur Entstehung eines Pankreaskarzinoms führte.

Die Zelllinien wurden im Labor unter standardisierten Bedingungen in einem Inkubator (BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland) kultiviert: 37 °C, 5 % CO₂, in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) mit zusätzlich 4.5 g/l Glukose, 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Biochrom GmbH). Das Plattieren beziehungsweise die Passagierung der Zellen für die Experimente erfolgte an einer NuAire 440- Sicherheitswerkbank (ibs tecnomara GmbH, Fernwald, Deutschland) unter sterilen Bedingungen. Nach Entfernen des Mediums wurde die Petrischale (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland, pH 7,4) gespült. Um die Zellen vom Boden der Petri-Schale zu lösen, wurden 2 ml Trypsin EDTA 0,5 g/l (Biochrom GmbH) auf die Zellen gegeben. Im Umkehrmikroskop (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurde der Adhäsionsverlust der Zellen kontrolliert und der Trypsinierungsvorgang durch das Auftragen von 10 ml Medium gestoppt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen (Greiner Bio-One) wurde diese für 3 min mit 335 g zentrifugiert (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und anschließend der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und deren Anzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet, welche ursprünglich von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) stammten und in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen weitergezüchtet wurden. In der chronischen Tierhaltung hatten sie einen künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h und freien Zugang zu Wasser und üblichem Laborfutter. Die Tiere verblieben in der chronischen Tierhaltung bis zum Ende des Versuchs. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug 199 Tage (Standardabweichung: ± 102 Tage). Alle Tierversuche entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz und der EU-Direktive 2010/63/EU.

2.3. Durchführung der Tumorzellinjektion

Pro Injektion wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen verwendet, welche in 10 μ l PBS suspendiert wurden. Dieser Zellsuspension wurde das gleiche Volumen an Matrigel (BD Bioscience, San José, Californien, USA) hinzugefügt, sodass PBS und Matrigel im Verhältnis 1:1 vermischt waren. Die Zellsuspension wurde in einem Mikrokoreaktionsgefäß auf Eis gelagert, da das Matrigel bei einer Temperatur $> 4^\circ\text{C}$ ein festes Hydrogel bildet und somit nicht mehr injiziert werden konnte. Die Anästhesie der Tiere für den operativen Eingriff erfolgte durch eine volatile Narkose mit 2,5 % Isofluran (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, Deutschland) 0,8 l/min O_2 und 1,6 l/min N_2O . Die Applikation von Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) verhinderte das Austrocknen der Kornea. Zur unmittelbaren postoperativen Analgesie erhielten die Tiere eine i. p. Injektion von 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland). Nach der Rasur des Abdomens wurde das Operationsgebiet mit Povidon-Iod-Lösung desinfiziert. Gelagert wurden die Tiere in Rückenlage, fixiert auf einer Wärmeplatte. Das Abdomen der Tiere wurde durch einen Rippenbogenrandschnitt rechts (Länge ca. 1,5 cm) eröffnet. Mit Wattestäbchen wurde die erste Duodenalschlinge mit dem darin liegenden Pankreasgewebe vorsichtig mobilisiert. Die Dünndarmschlinge wurde mit einer Pinzette behutsam in Position gehalten und 20 μ l der Tumorzellsuspension mit einer vorgekühlten ga22s 710 RN 100 μ l Spritze (Hamilton Spritze, Reno, Nevada, USA) in das Pankreas injiziert. Vor dem Herausziehen der Kanüle wurde diese ca. 30 Sekunden in der Einstichstelle gehalten, um das Aushärten des Matrigels zu

ermöglichen. Nach dem Herausziehen wurde die Einstichstelle mit einem sterilen Wattetupfer abgedeckt und nochmals ca. 20 Sekunden gewartet, um einen möglichen Rückfluss der Zellsuspension in den Bauchraum zu verhindern. Bei erfolgreicher Injektion war eine Blase innerhalb des Pankreas deutlich sichtbar. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte durch eine fortlaufende Fasziennaht mit einem 5-0 Vicrylfaden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) und eine Hautnaht aus Einzelköpfen mit einem 4-0 Polypropylenfaden (Johnson & Johnson Medical GmbH). Abschließend wurde die Wunde mit Providon-Iod desinfiziert. Die Mäuse wurden unter einer Wärmelampe positioniert und bis zum Erwachen aus der Narkose überwacht. Für die postoperative Analgesie und für potentielle Schmerzen bedingt durch den proliferierenden Tumor im Pankreaskopf wurden dem Trinkwasser 1000 mg/l Novaminsulfon (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) zugegeben. Diese wurde alle 24 h erneuert, da es sonst durch das Novaminsulfon bitter und für die Tiere ungenießbar geworden wäre.

2.4. Anordnung der Experimente

In dieser Arbeit gab es zwei unterschiedlich lange Versuchsansätze. Bei dem ersten (Abbildung 2 A) wurden die Mäuse eine Woche vor der Zellinjektion aus der SPF-Haltung in die chronische Tierhaltung gebracht. Die Zellinjektion fand an Tag 7 statt und an Tag 28 wurden die Tumore asserviert. Die erste Bildgebung der Tumore mittels MRT erfolgte an Tag 12 beziehungsweise 13 und an Tag 27 die zweite. Gewichtsmessungen der Tiere erfolgten, nachdem die Tiere in die chronische Tierhaltung kamen, an Tag 1 und im Verlauf des Experiments an den Tagen 7, 8, 9, 10, 15 und 28, um einen objektiven Parameter für ihren Allgemeinzustand zu haben. Wenn die Tiere mehr als 20 % ihres anfänglichen Körpergewichts verloren, wurden sie aus dem Versuch genommen. Der Blutzucker wurde an den Tagen 1, 15 und 28 bestimmt. Blutentnahmen zur weiteren Analyse erfolgten zu Beginn und am Ende der Experimente an Tag 1 und 28.

Beim zweiten Ansatz (Abbildung 2 B) wurden die Tiere ebenfalls eine Woche vor der Zellinjektion aus der SPF-Haltung in die chronische Tierhaltung gebracht. Die Zellinjektion fand an Tag 7 statt und an Tag 14 wurden die Tumore asserviert. Die Bildgebung der Tumore mittels MRT erfolgte an Tag 13. Gewichtsmessungen der Tiere erfolgten, nachdem die Tiere in die chronische Tierhaltung kamen, an Tag 1 und im Verlauf des Experiments an den Tagen

7, 8, 9, 10 und 14. Der Blutzuckermessungen und Blutentnahmen zur weiteren Analyse erfolgten zu Beginn und am Ende der Experimente an Tag 1 und 14.

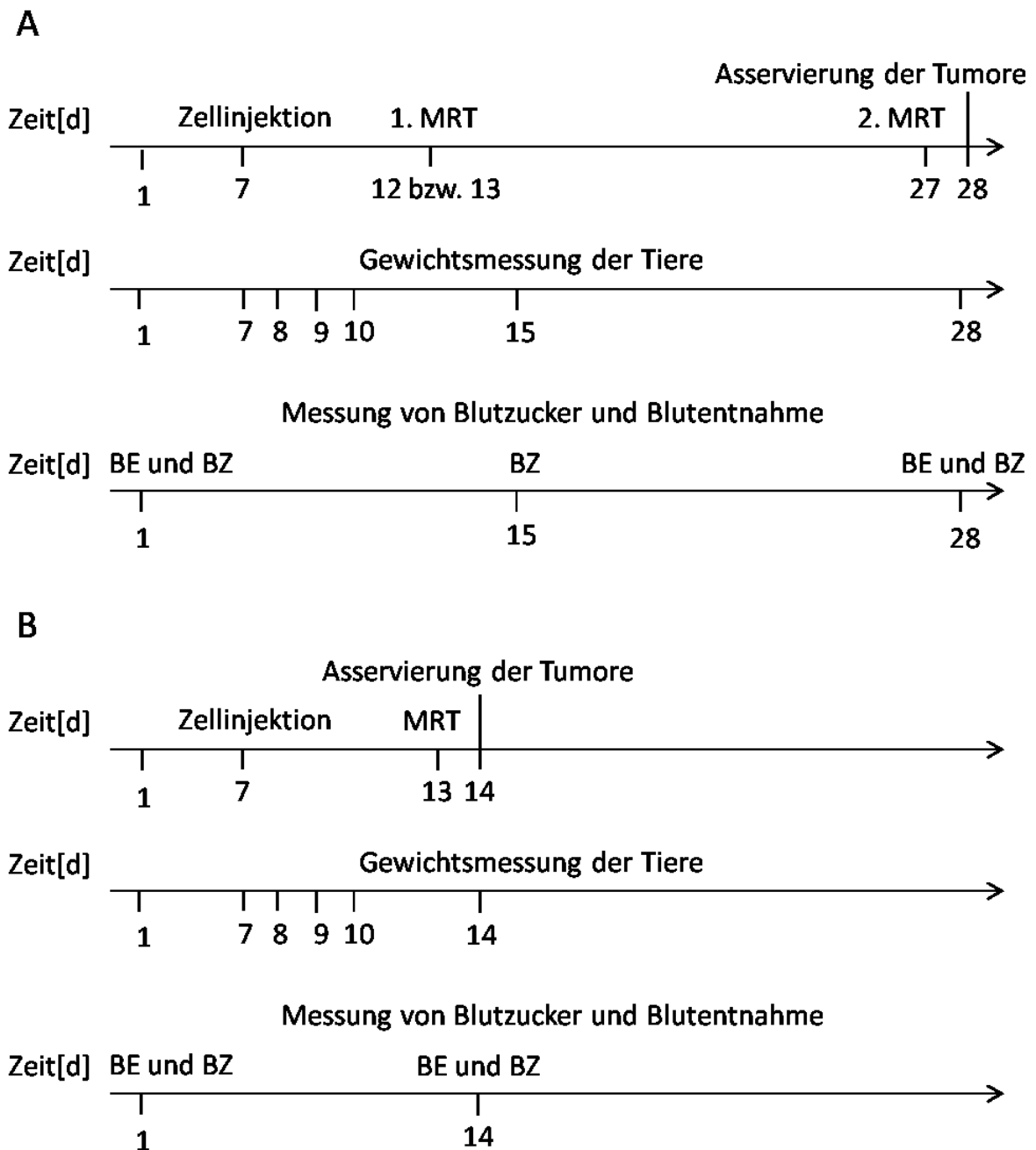


Abbildung 2: Anordnung der Interventionen in den in vivo Experimenten.

(A) erster Versuchsansatz mit Tumorasservierung an Tag 28, (B) zweiter Versuchsansatz mit Tumorasservierung an Tag 14, BE: Blutentnahme, BZ: Blutzucker-Messung.

2.5. Bestimmung von Blutzucker und Blutentnahme

Die Bestimmung der Blutglukose erfolgte durch einen Einstich mit einer Kanüle im distalen Drittel des Schwanzes. Von dem gewonnenen Kapillarblut wurde der erste Tropfen verworfen. Zur Blutzuckermessung wurden das Blutzuckermessgerät Contour (Bayer Vital GmbH) und die entsprechenden Sensoren verwendet. Um die circadiane Rhythmik zu beachten, fand die Blutzuckermessung stets zwischen sieben und neun Uhr morgens statt. An den Tagen der Tumor-Asservierung wurde der Blutzucker vor der Injektion der Ketamin-Xylazin-Narkose gemessen, da Ketamin den Stoffwechsel der Maus zu Gunsten einer hyperglykämischen Lage beeinflusst.

Zur Blutentnahme wurden die Tieren mit einem Gemisch aus 90 mg/kg Ketamin (bela-pharm, Vechta, Deutschland) und 7 mg/kg Xylazin (Bayer Vital GmbH) durch eine i. p. Injektion narkotisiert. Das Gemisch wurde in einem Verhältnis von 3:1 Ketamin zu Xylazin angefertigt. Die erforderliche Narkosetiefe wurde durch das Eintreten der ausgefallenen Nozizeption an Hinterläufen und Schwanz geprüft. Mit einer EDTA-beschichteten Kapillare wurden dann ca.150 µl bei den ersten und ca.500 µl bei der letzten Blutentnahme retrobulbär entnommen. In einer EDTA-Mikrovette (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) wurde das Blut aufgefangen. Das Differentialblutbild wurde mit dem Hämatologie-Analysegerät Sysmex KX 21 (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) erstellt. Das restliche Vollblut wurde mit einer GS-15 Zentrifuge (Beckmann Coulter GmbH) bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bei -20 °C für weitere Analysen konserviert. Zur Prävention einer Xerophthalmie wurde den Tieren nach der Blutentnahme Augensalbe (Bayer Vital GmbH) auf die Kornea appliziert.

2.6. Gewebeasservierung

Vor der Asservierung des Tumorgewebes wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus 90 mg/kg Ketamin (bela-pharm) und 7 mg/kg Xylazin (Bayer Vital GmbH) durch eine i. p. Injektion narkotisiert. Das Gemisch wurde in einem Verhältnis von 3:1 Ketamin zu Xylazin angefertigt. Die Tiere wurden durch Frakturieren der Halswirbelsäule getötet. Das Abdomen wurde durch einen medianen Längsschnitt durch die Bauchdecke und zwei laterale Querschnitte vom Hypogastrium ausgehend bis an die Rippenbögen heran eröffnet. Die T-

förmige Schnittführung ermöglichte somit eine vollständige Übersicht der Bauchhöhle und der darin gelegenen Organe. Durch Inspektion und Palpation erfolgte die Detektion des Tumors. Nach Durchtrennung des Ösophagus im Kardia-Bereich und Absetzen des Kolons vom Rektum wurde unter Zug am Kolon und Ileum das Mesenterium des Darms dargestellt und vom Retroperitoneum gelöst. Nach der Präparation des Pankreas konnte unter Ziehen am Duodenum das Organpaket bestehend aus Magen, Dünn- und Dickdarm, Pankreas und Milz im Ganzen reseziert werden. Der Pankreastumor und das Pankreas wurden freipräpariert und voneinander getrennt. Der Tumor und das Pankreas wurden separat gewogen und der Tumor wurde zweigeteilt. Das verbliebene Organpaket wurde auf einer Korplatte aufgespannt, das Mesenterium wurde auf Metastasen untersucht und anschließend vom Darm abpräpariert. Die Leber wurde entfernt und ebenfalls auf makroskopische Metastasen untersucht. Der rechte Leberlappen, das Mesenterium, eine Tumorthälfte und das Pankreas wurden zur histologischen Aufarbeitung in Histo-Kassetten (Jet Cassette II, Leica Mikrosysteme GmbH) positioniert und für mindestens 24 Stunden in einer 4 % Formaldehydlösung (Grimm med. Logistik GmbH, Torgelow, Deutschland) fixiert. Die zweite Tumorthälfte wurde zur histologischen Aufarbeitung in Tissue-Tek Cryomold (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) gegeben und mit Tissue-Tek (Sakura Finetek Europa B.V., Alpen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet. Diese Präparate wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur Aufbewahrung bei -20 °C in einem Tiefkühler gelagert. Der linke Leberlappen wurde für molekularbiologische Untersuchungen in 1,8 ml-Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig, Deutschland) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C konserviert.

2.7. Bildgebung der Tumore mit Magnetresonanztomographie

Die Bildgebung wurde mittels eines Kleintier-MRT (ClinScan 7,1 Tesla, 290 mT/m Gradientenfeldstärke, Bruker, Ettlingen, Deutschland) in Kombination mit einer Maus-Ganzkörperspule (Bruker, Ettlingen, Deutschland) verwendet. Für die Darstellung des Tumorgewebes wurde eine T2 gewichtete-TSE (turbospin echo) Sequenz eingesetzt (TR (repetition time): ca. 1250 ms; TE (echo time): 41,0 ms; FA (flip angle): 180 °; FoV (field of view): 40 mm × 40 mm; matrix: 240 × 320; Schichten 24, Schichtdicke: D = 0,7 mm, Gap

(Zwischenschichtabstand) 10 %, TA (time of acquisition): ca. 10 min). Für die Beurteilung der Tumore wurden hochauflösende Transversalschnitte mit einer Auflösung von 160 x 125 µm verwendet (TR: ca.1250 ms; TE: 41,0 ms; FA: 180 °; FoV: 40 mm x 40 mm; matrix: 240 x 320; Schichten 24, Schichtdicke: D = 0,7 mm, Gap 10 %, TA: ca. 10 min). Die Anästhesie der Tiere für den Eingriff erfolgte durch eine volatile Narkose, bestehend aus 2,5 % Isofluran (Actavis Deutschland GmbH & Co. KG) 0,8 l/min O₂ und 1,6 l/min N₂O. Die Narkosetiefe wurde mit einem Atem- und Herzfrequenzsensor (SA Instruments Inc., Stony Brook, New York, USA) überwacht. Die Applikation von Augensalbe (Bayer Vital GmbH) verhinderte das Austrocknen der Kornea. Die Mäuse wurden für die Untersuchung in Bauchlage auf einer MR-tauglichen Tierliege gelagert. Während der gesamten MRT-Messung wurde die Narkose aufrecht erhalten und die Vitalparameter Atemfrequenz und Puls wurden überwacht. Die MRT-Sequenzen wurden abhängig von der Atmung bei Expiration getriggert. Dies wurde mit einer Atemfrequenz von ca. 40 Atemzügen pro min realisiert. Um verdauungsabhängige Bewegungsartefakte zu minimieren, wurde den Tieren 12 h vor den MRT-Aufnahmen das Futter entzogen. Nach dem Aufenthalt im MRT wurden die Tiere unter einer Wärmelampe positioniert und bis zum vollständigen Aufwachen aus der Narkose überwacht.

2.8. Analyse der MRT-Datensätze und Volumetrierung der Tumore

Die Volumetrierung der Tumore erfolgte mit Hilfe des Programms 3D Slicer. Sie kann über die Internetseite www.slicer.org heruntergeladen werden. Die MRT-Datensätze wurden für unsere Auswertungen im DICOM-Format (Digital Imaging and Communications in Medicine) in das Programm importiert. Mithilfe der Programmfunktion ROI (Region of Interest) konnten der Tumor und seine umgebenden Strukturen näher eingegrenzt werden. Zum Volumetrieren der Tumore diente der „Paint Effect“. Hiermit wurde das Tumorgewebe in jeder Schnittebene der Bildgebung markiert. Nachdem man die zu analysierenden Flächen markiert hatte, konnte man mithilfe des Programms das Volumen des Tumors berechnen. Da sich die Tumore in der T2-gewichteten Bildgebung meist sehr hell darstellten, gingen wir von einem erhöhten Wassergehalt des neoplastischen Gewebes aus und setzten dessen Dichte gleich mit der von H₂O. Das errechnete Volumen [mm³] des Tumors entsprach demzufolge der Tumormasse [mg].

2.9. Histologie

2.9.1. Erstellung der histologischen Präparate

Die in Formaldehyd fixierten Tumore wurden in eine Histokinette überführt, welche dem Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzieht. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin (Verarbeitungstemperatur von 56-58 °C, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gebettet. Nach Aushärten des Paraffins wurde der Tumor in 4 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch Deutschland) geschnitten. Die Schnitte wurden in einem 40 °C warmen Wasserbad auf Adhäsionsobjektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland) übertragen. Das Trocknen erfolgte bei 64 °C in einem Laborofen.

2.9.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente der morphologischen Untersuchung des Gewebes. Hierzu wurde das Gewebe mithilfe eines Intermediums (X-TRA, MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) wieder entparaffiniert. Eine absteigende Ethanolreihe diente zur Rehydratation der Gewebeschnitte. Das Gewebe wurde anschließend für 5 Minuten in Leitungswasser überführt. Danach wurden die Objektträger für 5 Minuten in eine Hämatoxylinlösung nach Mayer gegeben. Für das Bläuen wurden die Präparate für 10 Minuten mit Leitungswasser versetzt. Im Anschluss wurden die Objektträger für 1 Minute in eine 0,5 % Eosin-Lösung gegeben und dann mit Leitungswasser abgespült. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und danach mit dem Intermedium zweimal gespült. Mithilfe des X-TRA-KITT (MEDITE GmbH) und eines Deckgläschens (24 x 32 mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden die Gewebeschnitte eingedeckt. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur waren die Präparate fertig zur histologischen Begutachtung.

2.9.3. Immunhistochemie für Paraffinschnitte

Für die Immunhistochemie wurde das Gewebe mithilfe des Intermediums (X-TRA, MEDITE GmbH) wieder entparaffiniert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte durch eine absteigende Ethanolreihe rehydratisiert und zum Schluss für mindestens 5 min in

Leitungswasser gelegt. Zum Lösen der Formaldehydkreuzverbindungen wurden die Präparate für sieben Minuten bei 700 W in einer Mikrowelle in der Target Retrieval Solution (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) erhitzt und danach beim Abkühlen der Puffer mit destilliertem Wasser bis zu seiner ursprünglichen Konzentration wieder aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Objektträger mehrmals mit Leitungswasser gespült. Um falsch-positive Signale bei der Aldh1a1, CD133 und GFAP-Immunhistochemie zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase mittels der Peroxidase-Blocking Solution (Dako Deutschland GmbH) geblockt. Diese Lösung wurde auf die Gewebeschnitte für 5 Minuten gegeben. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit Leitungswasser gewaschen. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu verringern, wurde auf die Objektträger für 30 min Protein Block Serum-Free (Dako Deutschland GmbH) gegeben. Für die CD133-Immunhistochemie wurde dem Protein Block Serum-Free noch zusätzlich 0,02 mg/ml des Ziege anti-Maus Antikörpers (ab6668, Abcam) hinzugefügt. Die GFP-Immunhistochemien wurden vor der Blockierung der endogenen Peroxidase noch zusätzlich mit jeweils 100 µl Peroxidaseblock für 5 min versetzt. Pro Präparat wurde jeweils 100 µl des primären Antikörpers (Tabelle 2, siehe Anhang) auf den Gewebeschnitt gegeben und dieser dann über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die ungebundenen primären Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Nun wurden jeweils 100 µl der sekundären Antikörper-Lösung (Tabelle 2, siehe Anhang) auf die Präparate für etwa 40 Minuten gegeben. Für alle Antikörperverdünnungen wurde das Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako Deutschland GmbH) verwendet. Anschließend wurden die Objektträger erneut mit Leitungswasser gespült. Um die Färbereaktion zu induzieren, wurden pro Gewebeschnitt je 100 µl der Chromogen-Lösung auf das Präparat gegeben. Hierfür wurde flüssiges DAB⁺ (Dako Deutschland GmbH) verwendet. Jetzt wurde unmittelbar eine Stoppuhr gestartet und die Färbereaktion des Präparats unter dem Mikroskop (Axiostar plus, Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung beobachtet. Als die adäquate Färbeintensität eingetreten war, wurde die Reaktion durch eine Spülung mit Leitungswasser abgebrochen und die Zeit gestoppt. Die gemessene Zeit wurde entsprechend für alle anderen Präparate angewandt. Um zusätzlich den Farbkontrast zu erhöhen, wurde im gegebenen Fall noch eine Hämalaun-Gegenfärbung mit einer Lösung nach Mayer durchgeführt. Zum Bläuen wurden die Objektträger für 10 min in lauwarmem Leitungswasser gelagert. Anschließend wurden

die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und danach mit Intermedium (X-TRA, MEDITE GmbH) zwei Mal gespült. Mithilfe des X-TRA-KITT (MEDITE GmbH) und eines Deckgläschens (24x 32 mm, Gerhard Menzel GmbH) wurden die Gewebeschnitte eingedeckt. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur waren die Präparate fertig zur histologischen Begutachtung.

2.9.4. Immunhistochemie für Kryoschnitte

Das kryoasservierte Tumorgewebe wurde mit einem Kryo-Mikrotom (Leica Mikrosysteme GmbH) in 6 µm dünne Scheiben geschnitten. Nach dem Aufbringen der Gewebeschnitte auf Adhäsionsobjektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH) wurden die Präparate bei Raumtemperatur mehrere Stunden getrocknet. Im Anschluss wurden die Präparate mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS), welche zu 4 % Paraformaldehyd enthielt, für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Objektträger zweimal mit PBS gespült. Die reaktiven Gruppen des Gewebes wurden mit einer 50 mM Ammoniumchloridlösung für 10 Minuten blockiert und anschließend wieder zwei Mal mit PBS gespült. Zur Demaskierung von Antigenen wurden die Objektträger für 15 Minuten mit einer PBS-Lösung, welche zu 0,3 % Saponin enthielt, versetzt. Danach erfolgte abermals eine Spülung mit PBS. Nun wurden pro Präparat 100 µl des primären Antikörpers (Tabelle 2, siehe Anhang) auf den Objektträger mit Gewebeschnitt gegeben und dieser dann über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte der Immunhistochemie für die Kryoschnitte entsprachen ab hier exakt den weiteren Arbeitsschritten der Immunhistochemie für die Paraffinschnitte, welche oben bereits genannt wurden.

Eine Übersicht von allen in der Histologie verwendeten Antikörpern findet sich unter Tabelle 2 im Anhang.

2.9.5. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung und Analyse der Tumore auf Tumorstammzellen erfolgte unter Verblindung mithilfe des Mikroskops (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) bei einer 40-fachen Vergrößerung. Mithilfe eines Zählgitterokulars wurden in der gesamten Zirkumferenz des Tumors 10 zufällig ausgewählte Gesichtfelder auf ALDH1a1⁺, GFAP⁺ oder CD133⁺ Zellen

ausgezählt. Dabei hatten die analysierten Gesichtsfelder einen Mindestabstand von 100 µm zum Tumorrand. Tumorzellen wurden als positiv gewertet, wenn sie eine deutliche und stärkere Braunfärbung durch die Antikörper als die umliegenden Zellen zeigten. Weitere histologische Auswertungen erfolgten ebenfalls am Mikroskop (Olympus Corporation).

2.10. Western Blot

Der Western Blot diente der semiquantitativen Analyse verschiedener Zellproteine. Durch Elektrophorese wurden die Proteine anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen. Auf dieser konnten die Proteine durch das Auftragen von primären und sekundären Antikörpern sichtbar gemacht werden. Die entstandenen Proteinbanden repräsentierten die unterschiedlich starke Gen-Expression der untersuchten Zellproteine.

2.10.1. Vorbereitung der Zellen

Die untersuchten Zelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Für den Western Blot wurden pro well einer 6-well-Platte 1×10^5 Zellen in 2 ml Medium für mindestens 48 h kultiviert. Zur Analyse der Zellen wurde das Medium entfernt und anschließend die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der wells zu lösen, wurden auf diese zunächst 200 µl Lysispuffer (Zusammensetzung des Lysispuffers in Tabelle 3, siehe Anhang) gegeben und anschließend wurden diese mittels eines Zell-Schabers mechanisch vom Boden der wells gelöst. Pro 10 ml Lysispuffer war eine Tablette Phosphostop (PhosSTOP™, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) enthalten. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C eingefroren, um es für weitere Analyseschritte zu konservieren.

2.10.2. Bestimmung der Proteinmenge

Nach dem Auftauen wurden die Proteinlysate für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden in einer auf 4 °C vorgekühlten 5804R-Zentrifuge (Eppendorf GmbH, Wesseling, Deutschland) für 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Die Proteinbestimmung

erfolgte im Dreifachansatz und mittels des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG). Dazu wurde der Überstand im Verhältnis 1:10 mit Aqua Bidest verdünnt und jeweils 12,5 µl dieser Lysat-Verdünnung in eine Aussparung einer 96-well-Platte gegeben. Der Standard der Proteinbestimmung wurde im Doppelansatz durchgeführt. Hierzu dienten unterschiedliche Konzentrationen (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 µg/µl) und zwei blanko-Proben mit H₂O. Für den Standard der Proteinbestimmung wurden 12,5 µl des Standard und 100 µl eines BCA-Cu²⁺- Gemisches (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in jeweils eine Aussparung einer 96-well-Platte gegeben. Die Proben wurden bei 37 °C auf einem Schüttler und unter Schutz vor UV-Strahlung (Abdeckung mit Alufolie) für 30 Minuten inkubiert. Der Proteingehalt [µg/µl] wurde im Sunrise-ELISA-Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) mittels Absorptionsspektrometrie bei 563 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve. Nun konnte das zu entnehmende Lysat-Volumen für die später benötigte Proteinmenge errechnet werden.

2.10.3. Auftrennung der Proteine anhand des Molekulargewichts

Anschließend wurden die Proben mit entsprechenden Mengen und Konzentrationen von Proteinladepuffer (PP) versetzt, um in 40 µl gleiche Anteile von Proteinmenge und Proteinladepuffer zu bekommen. (6x PP besteht aus: 3,75 ml Tris pH 6,8; 1,2 g SDS Natriumdodecylsulfat; 6,85 g Glycerin; 231,3 mg DTT Dithiothreitol; 0,3 ml Bromphenolblau; 10 ml Aqua dest). Zur Denaturierung wurden die Proteinlysate für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend drei Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Anhand des zu erwartenden Molekulargewichts des Antikörpers wurden unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen für das Trenngel (Zusammensetzung eines Trenngels in Tabelle 4, siehe Anhang) gewählt (ALDH1a1 bei 55 kDa: 10 %; GFAP bei 50 kDa: 12 %; CD133 bei 100-130 kDa: 8 %; CD133 Dresden bei 100-130 kDa: 8%). Die Acrylamidkonzentration für das Sammelgel (Zusammensetzung eines Sammelgels in Tabelle 5, siehe Anhang) betrug standardmäßig 5 %. Zuerst wurde das Trenngel zwischen die formgebenden Glasplatten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen und anschließend zum Schutz vor Austrocknung und Blasenbildung mit ca. 500 µl Isopropanol bedeckt. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel darüber gegeben. Für die Taschen der zu analysierenden Proteinlysate wurde in das Sammelgel ein

Probenkamm eingesetzt, welcher nach Polymerisation des Gels wieder entfernt wurde. Das fertige Gel wurde mit den Glasplatten in die MiniPROTEAN-Elektrophoreseeinheit (Bio-Rad Laboratories GmbH) gesetzt und mit Laufpuffer pH 8,3 (Tris 30,3 g; Glycin 144 g; SDS 10 g) befüllt, bis die Taschen vollständig mit Puffer bedeckt waren. Die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und durchliefen bei einer Spannung von 20 mA das Sammelgel. Die Auftrennung der Proben anhand ihres unterschiedlichen Molekulargewichts erfolgte im Trenngel bei einer Spannung von 40 mA. Als Stromquelle wurde das Power Pac 300 (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet. Als Längenstandard diente ein peqGold-Proteinmarker IV (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland).

2.10.4. Semi-Dry-Blot

Anschließend wurde der Semi-Dry-Blot vorbereitet. Hierzu wurden 3 mm CHR-Blottingpapiere (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in Kathodenpuffer (Tris 25 mM; Glycin 40 mM 0,751 g; Methanol 20 % 200 ml), 2 Blottingpapiere in Anodenpuffer I (Tris 300 mM 34,34 g; Methanol 20 % 200 ml) und ein Blottingpapier in Anodenpuffer II (Tris 25 mM 34,34 g; Methanol 20 % 200 ml) versetzt. Die Immobilon®-P Transfer Membran (Merck Millipore/ © Merck KGaA) wurde für mehrere Sekunden in Methanol 100 % gelegt, danach für zwei Minuten in Aqua Bidest gegeben und anschließend in Anodenpuffer II für mindestens 5 Minuten equilibriert. Im Semi-Dry-Blotter (PEQLAB Biotechnologie GmbH) wurden die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge zwischen Anode und Kathode gelegt: zwei Blottingpapiere mit Anodenpuffer I, darauf ein Blottingpapier mit Anodenpuffer II, hierauf die Membran, dann das Gel und abschließend drei Blottingpapiere mit Kathodenpuffer. Für das Blotting eines Gels wurde eine Spannung von 137 mA für 1 h 45 min mittels eines Standard Power Pack P25 (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) angelegt. Danach wurde die Membran aus der Blot-Vorrichtung entfernt und kurz mit TBST (Tris Buffered Saline with Tween 20) gespült.

2.10.5. Blockierung, primäre und sekundäre Antikörper

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde für ALDH1a1 eine BSA-Lösung 2,5 %, hingegen für GFAP und CD133 Milchpulver 5 % verwendet. Der Vorgang

erfolgte für eine halbe Stunde bei 37 °C. Anschließend wurden die primären Antikörperlösungen (Liste der verwendeten primären Antikörper in Tabelle 6, siehe Anhang) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor dem Auftragen des sekundären Antikörpers (Liste der verwendeten sekundären Antikörper in Tabelle 6, siehe Anhang) wurden die Membranen gewaschen, dreimal für 10 Minuten in TBST und danach zweimal für 15 Minuten in TBS (Tris Buffered Saline) gewaschen. Die sekundären Antikörper verblieben 1h bei Raumtemperatur auf der Membran. Anschließend wurden die Membranen wieder nach dem obigen Schema mit TBST und TBS gewaschen, dreimal für 10 Minuten in TBST und danach zweimal für 15 Minuten in TBS. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde eine 1:50 verdünnte Pierce ECL-2-Reagenz (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG) auf die Membranen aufgetragen und für fünf Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinexpression wurde in einem ChemiDocXRS-System (Bio-Rad Laboratories) durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht und abschließend fotografisch festgehalten. Um die gebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST und danach zweimal für 15 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran erst für 15 Minuten bei 37 °C und dann für 15 min bei Raumtemperatur gestrippt (Stripp-Puffer: 25 mM Glycin, 1 % SDS pH 2). Es erfolgte wieder der übliche Waschvorgang und die Membranen wurden dann für 30 min bei 37 °C mit 2,5 % BSA geblockt.

2.10.6. Ladungskontrolle der Gele

Zum Nachweis von β -Aktin wurde nach dem Blocken der Membran mit BSA-Lösung 2,5 % der Primärantikörper bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit TBST und TBS wurde der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur belassen. Nach dem Waschen mit TBST und TBS wurde die β -Aktin Expression mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Es wurde, wie schon oben beschrieben, eine 1:50 verdünnte Pierce ECL-2-Reagenz (Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG) auf die Membrane aufgetragen und für fünf Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Proteinbanden mittels des ChemiDocXRS-System (Bio-Rad Laboratories) visualisiert und fotografisch dokumentiert.

2.11. Statistik

Die Boxplots stellen den Median, das 25. und 75. Quantil dar. Die Whisker repräsentieren das 10. und 90. Quantil. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney rank-sum test berechnet. Bei mehrfachen Vergleichen wurde die Akkumulation des α -Fehlers mithilfe der Bonferroni-Korrektur berücksichtigt. Wenn p geteilt durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche $\leq 0,05$ war, wurden die Unterschiede als signifikant bezeichnet. Wenn p geteilt durch die Anzahl sinnvoller Vergleiche $\leq 0,08$ war, wurden die Unterschiede als Tendenz bezeichnet. Mithilfe des Programms SigmaPlot 12 (Systat Software, Inc., San Jose, Kalifornien, USA) wurden die Daten auf signifikante Unterschiede getestet, die Spearman Rank Order Correlation berechnet und alle abgebildeten Diagramme erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Evaluation der Qualität unterschiedlicher Antikörper

Zur technischen Optimierung und Validierung der Antikörper-Färbeeigenschaften wurden initial in verschiedenen Gewebearten die immunhistochemischen Eigenschaften der Antikörper gegen ALDH1a1, CD133 und GFAP getestet. In der Immunhistochemie des Duodenums reicherten v. a. die Enterozyten der Darmzotten den anti-ALDH1a1 Antikörper an (Abbildung 3 A). Die ALDH1a1-Immunhistochemie ohne Zugabe des Primärantikörpers zeigte keine Färbung der beschriebenen Zellen, was die Abhängigkeit der Färbung vom Primärantikörper bewies (Abbildung 3 B). Im Pankreasgewebe wurden v. a. die Azinuszellen des exokrinen Pankreas gefärbt (Abbildung 3 C). Auch hier konnte ohne Zugabe des anti-ALDH1a1 Antikörpers die Abhängigkeit der Färbung vom Primärantikörper bewiesen werden (Abbildung 3 D). Zur Validierung der korrekten Färbereigenschaften von CD133 wurde das Gewebe von Niere und Gehirn verwendet. In der Niere reicherten ausschließlich die Epithelzellen der proximalen Nierentubuli den anti-CD133 Antikörper an (Abbildung 3 E). Durch das Weglassen des Primärantikörpers konnte für die Niere die Abhängigkeit der Färbereaktion vom anti-CD133 Antikörper gezeigt werden (Abbildung 3 F). In der Immunhistochemie des Gehirns zeigten die Ependymzellen der Ventrikel eine positive Färbereaktion (Abbildung 3 G). Durch das Weglassen des Primärantikörpers konnte auch hier für das Gehirn die Abhängigkeit der Färbereaktion vom anti-CD133 Antikörper gezeigt werden (Abbildung 3 H). Die Immunhistochemie mit dem anti-GFAP Antikörper zeigte eine deutliche Färbung der Astrozyten im Frontallappen des Gehirns (Abbildung 3 I), wohingegen dies in der Negativkontrolle nicht zu beobachten war (Abbildung 3 J).

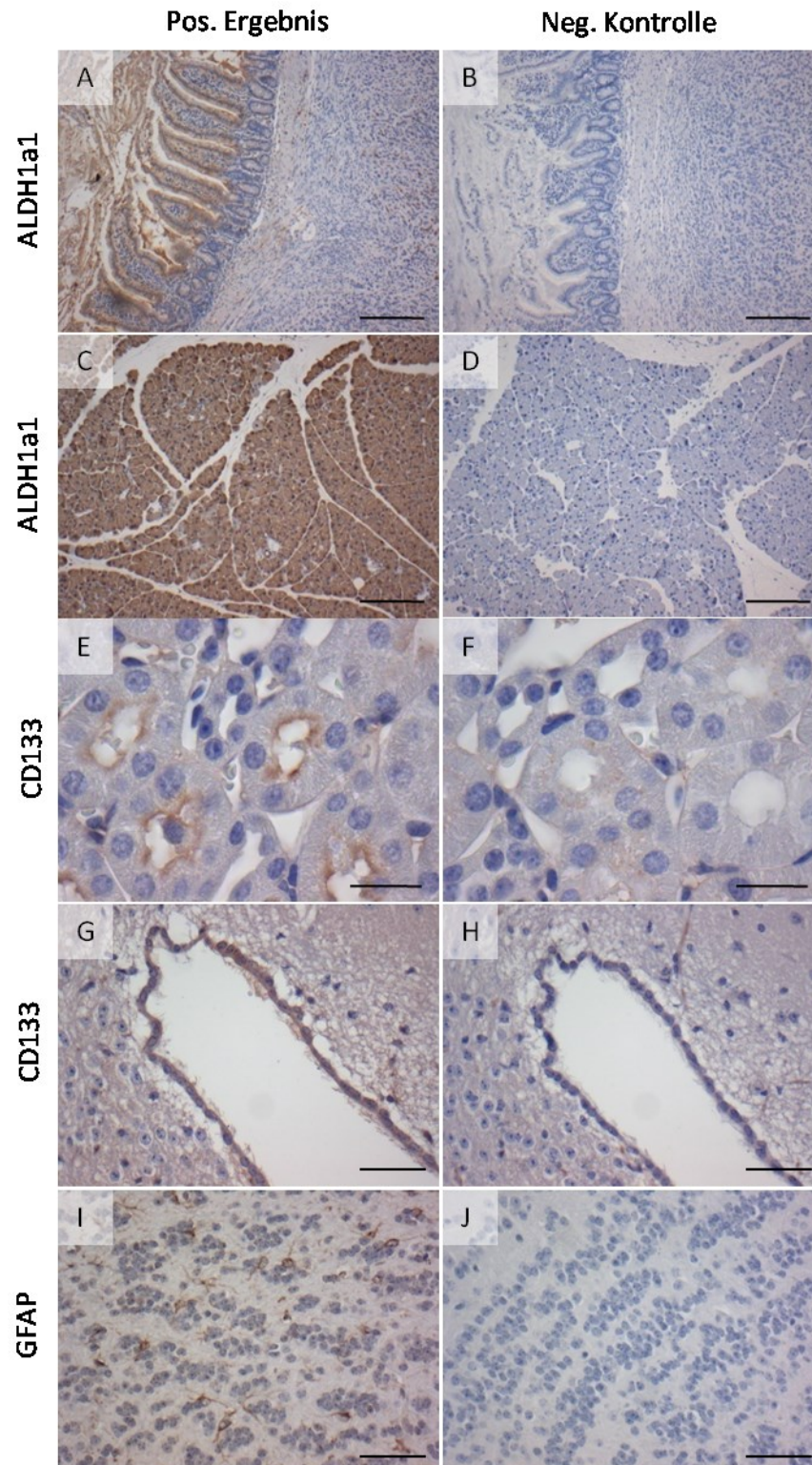


Abbildung 3: Evaluation der Qualität unterschiedlicher Antikörper.

Immunhistochemie des Duodenums (A, B) und Pankreas (C, D) mittels anti-ALDH1a1 Antikörper (A, C) bzw. ohne Primärantikörper (B, D). Antikörperfärbung der proximalen Tubuli der Niere (E, F) und Ependymzellen im Gehirn (G, H) mittels anti-CD133 Antikörper (E, G) bzw. ohne Primärantikörper (F, H). Immunhistochemie im Frontallappen des Gehirns

mittels anti-GFAP Antikörper (I) bzw. ohne Primärantikörper (J). Die Balken entsprechen 200 μm (A- D), 30 μm (E, F) und 50 μm (G-J).

3.2. Eigenschaften der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606l in vivo

3.2.1. Anwachsrate der Tumore und Analyse des Blutbildes

Nach der in vivo Injektion der Karzinomzellen zeigten diese unterschiedliche Anwachsrate. An Tag 28 konnte bei der 7265PDA 1 Tumor von 11 Zellinjektionen asserviert werden, bei der 6606PDA 6 von 6 und bei der 6606l 5 von 6. Somit hatte die 7265PDA eine Tumoranwachsrate von 9 %, die 6606PDA von 100 % und die 6606l eine Anwachsrate von 83 % (Abbildung 4 A). Im Verlauf der Tumorprogression wurde die Lipase im Blutplasma bestimmt. Zwischen den Versuchstieren gab es keine signifikanten Unterschiede der Lipase-Werte zu Beginn (Daten nicht abgebildet) und Ende des Versuches (Abbildung 4 B). Eine Erhöhung der Plasma-Lipase-Werte, wie sie im Rahmen einer Begleitpankreatitis beim Pankreaskarzinom häufig zu beobachten ist, konnten wir in unseren Versuchen nicht feststellen. Auch im Blutbild fanden sich keine Hinweise auf eine manifeste Inflammation. Bei der 7265PDA nahmen sowohl die Leuko-, Lympho-, Mono- und Granulozyten im Laufe des Experimentes ab. Bei der 6606PDA nahmen ebenfalls die Leuko- und Lymphozyten im Verlauf des Versuches ab. Die Mono- und Granulozyten stiegen minimal an. Bei der 6606liver stiegen die Lymphozyten im Verlauf des Experiments ebenfalls minimal an, die Leuko-, Mono- und Granulozyten zeigten eine Abnahme im Verlauf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Analyse des Blutbildes.

	Leukozyten [10 ⁹ Zellen/l] zu Versuchsbeginn (Tag 1)	Leukozyten [10 ⁹ Zellen/l] bei Asservierung (Tag 28)	Lymphozyten [10 ⁹ Zellen/l] zu Versuchsbeginn (Tag 1)	Lymphozyten [10 ⁹ Zellen/l] bei Asservierung (Tag 28)	Mono- und Granulozyten [10 ⁹ Zellen/l] zu Versuchsbeginn (Tag 1)	Mono- und Granulozyten [10 ⁹ Zellen/l] bei Asservierung (Tag 28)
7265PDA						
Mittelwert	8,9	7,1	6,3	5,5	2,5	1,6
Standard- abweichung	1,0	1,8	1,2	1,5	0,9	0,6
Median	8,9	6,6	6,2	5,3	2,5	1,5
Interquan- tilenabstand	0,9	1,6	1,0	1,4	1,4	1,0
6606PDA						
Mittelwert	10,0	8,0	8,1	5,5	2,0	2,5
Standard- abweichung	2,6	2,9	2,5	1,6	0,9	1,4
Median	10,2	7,4	8,6	5,3	2,0	2,1
Interquan- tilenabstand	1,6	3,1	2,9	1,1	0,7	2,0
6606liver						
Mittelwert	9,7	8,5	5,0	5,6	4,6	2,7
Standard- abweichung	3,4	2,7	4,5	0,9	4,1	2,1
Median	9,1	8,2	4,8	5,7	2,8	2,1
Interquan- tilenabstand	4,3	2,6	3,7	0,9	2,8	2,4

3.2.2. Analyse der Tumore mittels MRT

Für die Analyse der Tumore standen zwei Verfahren zur Verfügung. Zum einen wurde das Gewicht der Tumore nach der Asservierung mittels einer handelsüblichen Feinwaage bestimmt. Zum anderen wurde das Tumolvolumen mittels MRT und der Software 3D Slicer analysiert. Der Vergleich zeigte eine starke lineare Korrelation der beiden Messverfahren ($r: 0,821$, Abbildung 4 C). Geringfügige Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den beiden Messmethoden ließen sich am ehesten durch das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Neoplasien erklären. In den meisten Fällen wurden die Pankreaskarzinome durch eine fibrotische Schicht umgeben und hatten eine zentrale Nekrosezone. Diese Tumore zeigten ein verdrängendes Wachstumsverhalten und konnten sehr eindeutig gegen angrenzende nicht-karzinomatöse Strukturen abgegrenzt werden (Abbildung 4 D). Im Gegensatz dazu gab es aber auch Tumore, die keine zentrale Nekrosezone zeigten und sich in der Bildgebung mittels MRT sehr schwer gegen das umliegende Gewebe abgrenzen ließen (Abbildung 4 E). Auch die Größe der Karzinome hatte einen starken Einfluss auf die Genauigkeit bei der Analyse der MRT-Datensätze. Die Ausdehnung größerer Tumore war leichter, die Ausdehnung kleinerer Tumor schwieriger zu beurteilen.

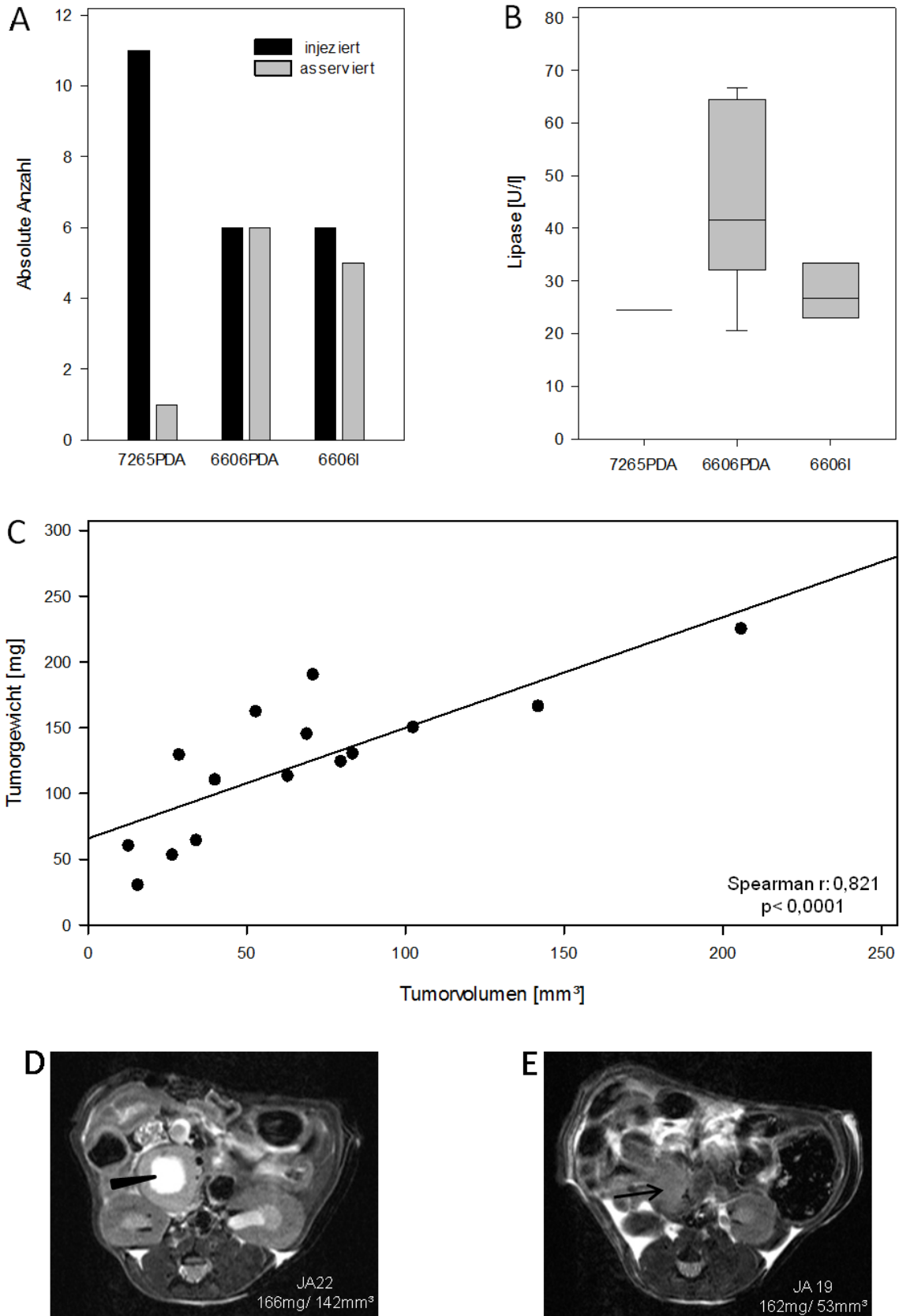


Abbildung 4: Eigenschaften der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I in vivo.

(A) Vergleich der Anzahl der orthotopen Zellinjektionen im Vergleich zur Anzahl der angewachsenen Tumore an Tag 28. (B) Vergleich der Lipase Werte im Blut am Tag 28. (C) Korrelation von Tumorgewicht und Tumorumfang. (D) Beispiel für einen in der MRT gut abzugrenzenden Tumor und eine zentrale Nekrosezone (Pfeilspitze). (E) Beispiel für einen in der MRT schlecht abzugrenzenden Tumor und keine zentrale Nekrosezone (Pfeil). Die Anzahl der evaluierten Tiere betrug $n = 1$ (7265PDA), $n = 6$ (6606PDA) und $n = 4$ (6606I) in Abbildung B. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen in Abbildung B waren nicht signifikant. Spearman Rangkorrelationskoeffizient in Abbildung C: $r = 0,821$.

3.3. Histomorphologische Eigenschaften der Zelllinien

Um die histomorphologischen Eigenschaften der unterschiedlichen Tumore genauer zu beurteilen, wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologische Schnitte der Tumore aufbereitet. Untersuchungsgegenstand waren tubulär-glanduläre Strukturen und das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein einer fibrotischen Schicht um die Tumore. Des Weiteren wurden die Neoplasien zu einem frühen Zeitpunkt des Wachstums (asserviert an Tag 14) und zu einem späteren Zeitpunkt (asserviert an Tag 28) untersucht, um etwaige Unterschiede im Verlauf der Tumorprogression zu beobachten. Zum frühen Zeitpunkt der Tumorprogression konnte man beobachten, dass sich bei allen Tumoren der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I noch keine vollständige fibrotische Schicht um den Tumor gebildet hatte (Abbildung 5 A- C). Dies zeichnete sich dadurch aus, dass Tumorzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Zellen des Pankreasgewebes vorhanden waren. Weiter fanden sich an dieser Übergangszone etliche Leukozyten, sodass man diesen Bereich auch als inflammatorische Transformationszone zwischen Tumor- und Pankreasgewebe bezeichnen könnte. Lokal zeigte sich eine durch das Tumorstadium induzierte inflammatorische Reaktion, welche aber in den Blutanalysen nicht zu beobachten war (siehe Tabelle 7). Zum späteren Zeitpunkt der Tumorprogression wurde auch das Auftreten von tubulär-glandulären Strukturen in den Tumoren evaluiert. Die Drüsenformationen, als Charakteristikum eines duktales Adenokarzinoms im Pankreas, konnten bei den Tumoren der 7265PDA in einem von einem Fall, bei den Tumoren der 6606PDA in 2 von 6 und in den Tumoren der 6606I in 4 von 5 Fällen nachgewiesen werden (Abbildung 5 D- F). Im Verlauf der Tumorprogression bildete sich in zunehmendem Maße eine fibrotische Schicht um die

Tumore. Der Tumor der 7265PDA war in der histologischen Begutachtung an Tag 28 bereits vollständig von einer fibrotischen Schicht umgeben. Die gestrichelte Linie zeigt die schmalste Ausbreitung der fibrotischen Schicht (Abbildung 5 G). Die Tumore der 6606PDA zeigten in 3 von 6 Fällen noch Stellen, an denen das Karzinom nicht vollständig von Fibroblasten ähnlichen Zellen umgeben war. Bei den Tumoren der 6606I konnte dies in 1 von 5 Fällen beobachtet werden (Abbildung 5 H, I). Dennoch war die Ausbildung einer fibrotischen Schicht um die Tumore zum späteren Zeitpunkt der Asservierung in allen Fällen stark ausgeprägt. Die gestrichelte Linie zeigt die größte Ausbreitung der fibrotischen Schicht (Abbildung 5 J- L). Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Adenokarzinome der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I im Verlauf der Tumorphyse mittels einer fibrotischen Schicht gegen das umliegende Pankreasgewebe zunehmend abgrenzten. Epitheliale Strukturen als Ausdruck eines gut bis mäßig differenzierten Adenokarzinoms konnten in allen drei Zelllinien nachgewiesen werden.

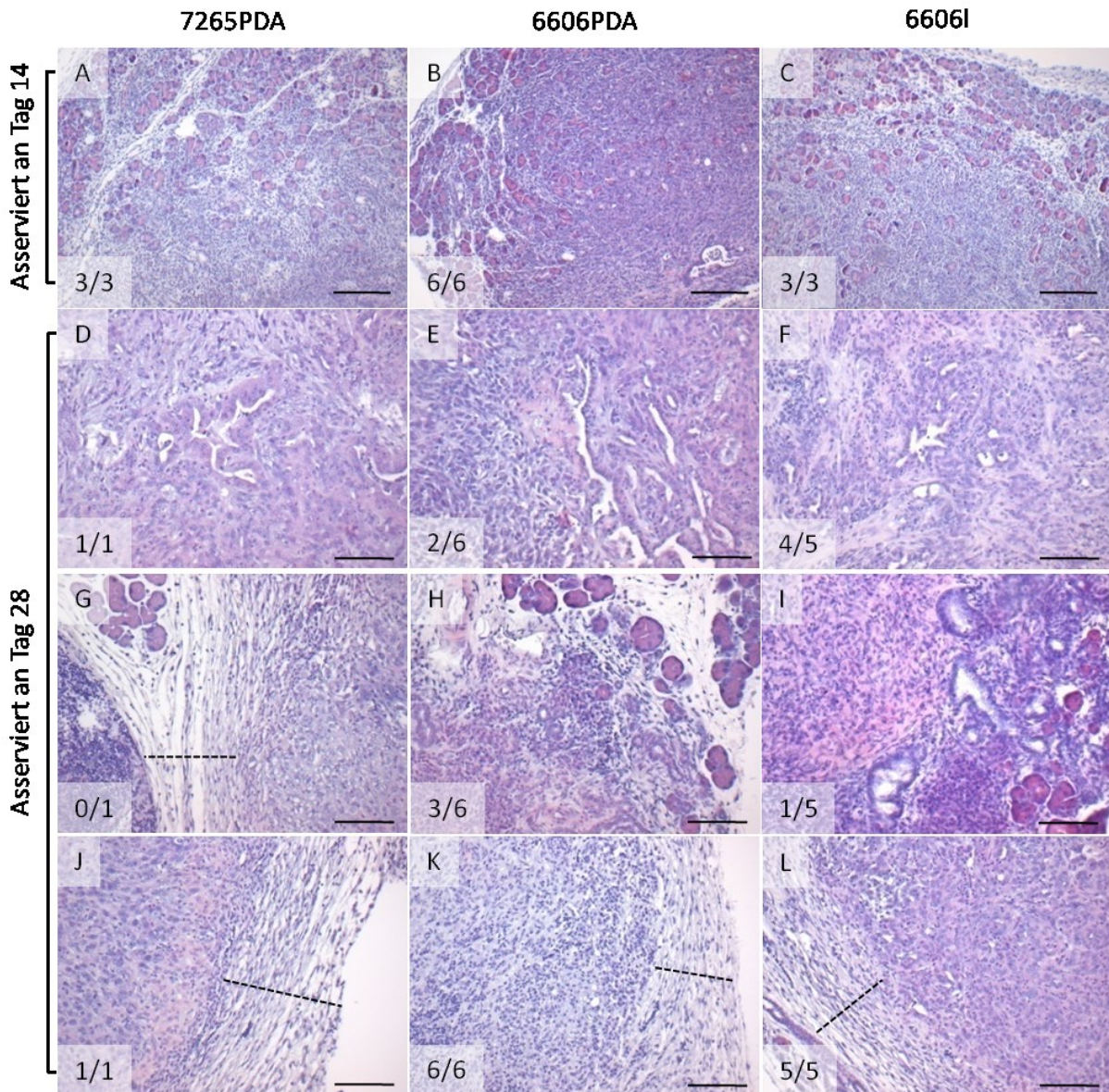


Abbildung 5: Histomorphologische Eigenschaften der Zelllinien.

Direkte Übergangszone von Pankreas- zu Tumorgewebe in (A) 7265PDA, (B) 6606PDA und (C) 6606I. Epitheliale Strukturen innerhalb des Tumors bei (D) 7265PDA, (E) 6606PDA und (F) 6606I. Direkte Übergangszone von Pankreas- zu Tumorgewebe in (G) 7265PDA, (H) 6606PDA und (I) 6606I. Fibrotische Schicht um den Tumor bei (J) 7265PDA, (K) 6606PDA und (L) 6606I. Tumore der Abbildungen A- C wurden an Tag 14 asserviert, Tumore der Abbildungen D- L an Tag 28. Ziffern repräsentieren das Verhältnis von vorhandenem Merkmal (im Zähler) bei der Anzahl der untersuchten Tumore (im Nenner). Die gestrichelte Linie demonstriert die Ausbreitung der fibrotischen Schicht. Die Balken entsprechen 200 μm (A- C) und 100 μm (D- L).

3.4. Charakterisierung des Stammzellkompartiments der Zelllinien

3.4.1. Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP in den Pankreaskarzinomen

3.4.1.1. Technische Optimierung der immunhistochemischen Antikörper

Um das Färbeverhalten der Antikörper gegen ALDH1a1, CD133 und GFAP in den Tumoren zu beurteilen, wurden entsprechende Immunhistochemien angefertigt. Die immunhistochemischen Färbungen der 7265PDA-Tumore mittels anti-ALDH1a1 (Abbildung 6 A) und anti-CD133 (Abbildung 6 B) Antikörpern zeigten positiv gefärbte Tumorzellen, die im Vergleich zu den umliegenden nicht gefärbten Tumorzellen gut zu unterscheiden waren. Die immunhistochemische Färbung der 7265PDA-Tumore mittels anti-GFAP Antikörper (Abbildung 6 C) zeigten keine ausreichende Färbung von Tumorzellen, um diese von umliegenden nichtgefärbten Tumorzellen zu unterscheiden. Ähnliche Eigenschaften zeigten die Immunhistochemien der 6606PDA und 6606liver. In den Immunhistochemien der 6606PDA-Tumore mittels anti-ALDH1a1 (Abbildung 6 D) und anti-CD133 (Abbildung 6 E) Antikörpern konnten gefärbte von nicht-gefärbten Tumorzellen eindeutig unterschieden werden. Dies war jedoch in der immunhistochemischen Färbung der Tumore mittels anti-GFAP Antikörpern nicht möglich (Abbildung 6 F). Auch in den Immunhistochemien der 6606l-Tumore mittels anti-ALDH1a1 (Abbildung 6 G) und anti-CD133 (Abbildung 6 H) Antikörpern ließen sich gefärbte von nicht gefärbten Tumorzellen unterscheiden, wohingegen diese Unterschiede in der immunhistochemischen Färbung der 6606l-Tumore mittels anti-GFAP Antikörpern ebenfalls nicht eindeutig waren (Abbildung 6 I). Durch das Weglassen der Primärantikörper für ALDH1a1 (Abbildung 6 J), CD133 (Abbildung 6 K) und GFAP (Abbildung 6 L) wurden die Zellen nicht gefärbt, was die Abhängigkeit vom Primärantikörper bewies. In den Immunhistochemien der 7265PDA-, 6606PDA- und 6606l -Adenokarzinome mittels anti-ALDH1a1 (Abbildung 6 A, D, G) und anti-CD133 (Abbildung 6 B, E, H) waren eindeutig positiv gefärbte Zellen zu erkennen und somit schienen diese Immunhistochemien als geeignet, um eine quantitative Analyse des Tumorstammzellkompartiments durchzuführen. In den Immunhistochemien der 7265PDA-, 6606PDA- und 6606l -Adenokarzinome mittels anti-GFAP Antikörper waren die Braunfärbungen der Zellen nicht intensiv genug, um eindeutige Unterschiede zwischen potentiellen Tumorstammzellen und den umliegenden Tumorzellen abzugrenzen (Abbildung 6 C, F, I). Das Färbeverhalten der GFAP-Immunhistochemien konnte im weiteren Verlauf nicht mehr optimiert werden und somit wurde in den anschließenden

immunhistochemischen Färbungen der Tumore von GFAP als potentiellstem Stammzellmarker im duktalem Adenokarzinom des Pankreas abgesehen.

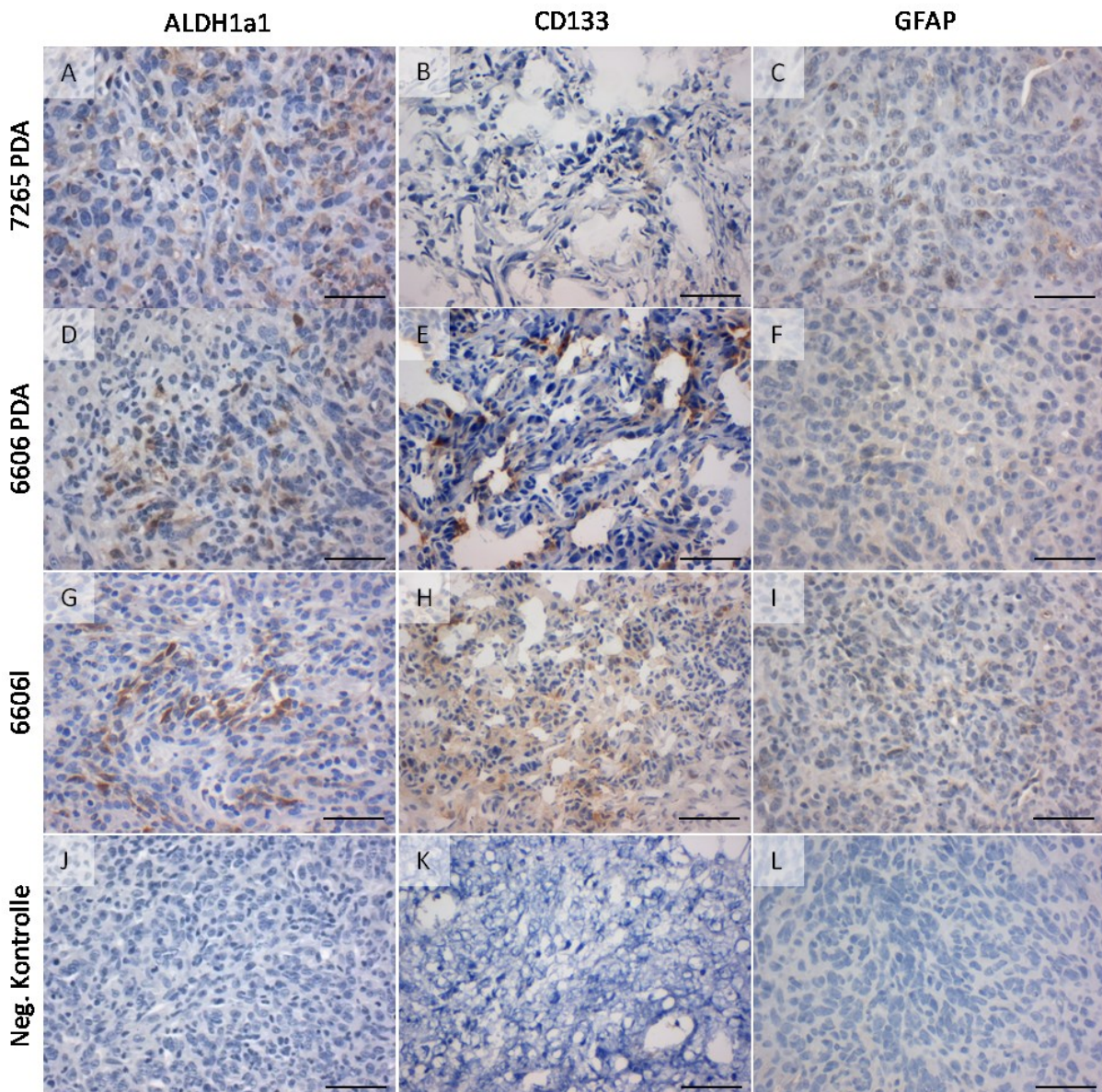


Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse von Pankreaskarzinomen

Immunhistochemie der 7265PDA- Tumore mittels (A) anti- ALDH1a1- (B) anti- CD133- und (C) anti- GFAP- Antikörper. Immunhistochemie der 6606PDA- Tumore mittels (D) anti-ALDH1a1- ,(E) anti- CD133- und (F) anti- GFAP- Antikörper. Immunhistochemie der 6606liver-generierten Tumore mittels (G) anti- ALDH1a1-, (H) anti- CD133- und (I) anti- GFAP- Antikörper. (J, K, L) Negativkontrollen der Immunhistochemien ohne Primärantikörper . Die Balken entsprechen 50 µm.

3.4.1.2. Quantitative Analyse des Stammzellkompartiments der Tumore

Unter dem Mikroskop wurden die Immunhistochemien mittels anti- ALDH1a1 Antikörper der Tumore begutachtet und die ALDH1a1⁺ Zellen gezählt. Zwischen den 6606PDA- und den 6606I- Tumoren gab es hinsichtlich der Anzahl an Tumorstammzellen keine signifikanten Unterschiede. Der statistische Vergleich der 6606PDA und der 6606liver mit der 7265PDA war aufgrund der geringen n- Zahl nicht sinnvoll (Abbildung 7 A). Ebenso wurden die immunhistochemischen Färbungen der Tumore mittels anti- CD133 Antikörper unter dem Mikroskop analysiert und die CD133⁺ Zellen gezählt. Hier gab es zwischen den Gruppen deutliche Unterschiede an CD133⁺ Zellen. Der statistische Vergleich der Gruppen war aber auch hier aufgrund der geringen n- Zahl nicht sinnvoll (Abbildung 7 B).

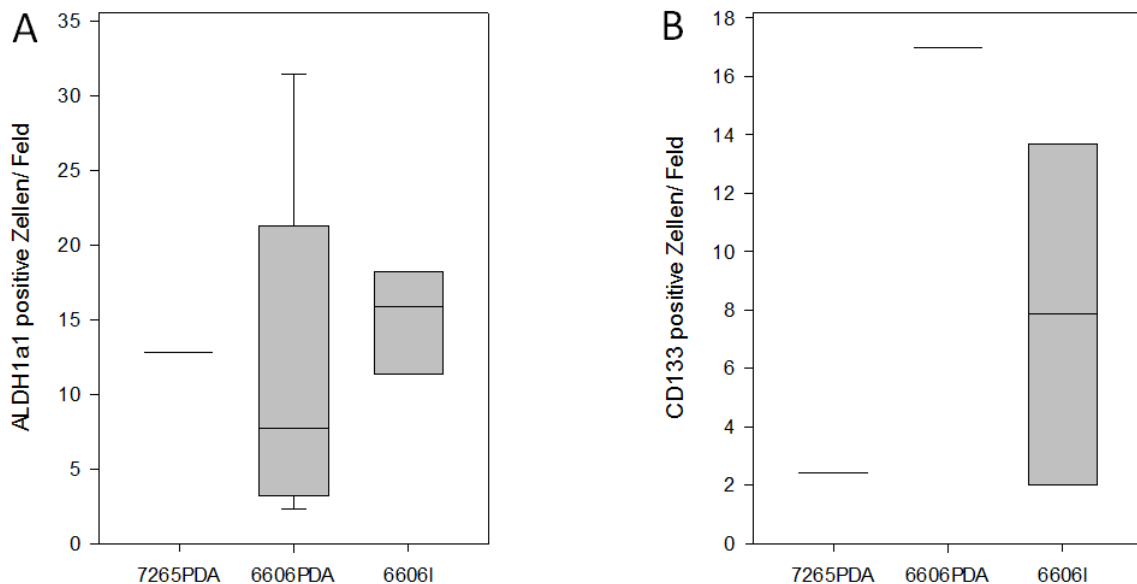


Abbildung 7: Quantitative Analyse des Stammzellkompartiments der Tumore.

Vergleich der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I in Bezug auf (A) ALDH1a1⁺ Zellen und (B) CD133⁺ Zellen, Tumore asserviert an Tag 28. Die Boxplots zeigen den Median, das 25. und 75. Perzentil in Form der Box und das 10. und 90. Perzentil in Form der Whisker. Die Anzahl der evaluierten Tiere betrug n = 1 (7265PDA), n = 6 (6606PDA) und n = 4 (6606I) in Abbildung A und n = 1 (7265PDA), n = 1 (6606PDA) und n = 2 (6606I) in Abbildung B. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen in Abbildung A und B waren nicht signifikant.

3.4.2. Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP in den Zelllinien

Um weitere Rückschlüsse auf das Tumorstammzellkompartiment der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I zu ziehen, wurde die Expression von ALDH1a1 mittels Western Blot semiquantitativ gemessen. Da es sich bei 7265PDA, 6606PDA und 6606I um wenig erforschte und beschriebene Zelllinien handelt, wurde die Expression von ALDH1a1 in der Panc02, als eine sehr gut beschriebene Zelllinie, zusätzlich analysiert, um einen Anhaltspunkt für das Expressionsniveau von ALDH1a1, GFAP und CD133 zu haben. Niere und Gehirn wurden als Positivkontrolle mitgeführt (Abbildung 8 A). Für ALDH1a1 zeigte sich bei allen Zelllinien und den Positivkontrollen eine eindeutige Bande bei 55 kDa. Des Weiteren kann eine zusätzliche Bande bei ähnlichem Molekulargewicht wie ALDH1a1 bei der 7265PDA, 6606PDA, 6606I und Niere bzw. eine Verbreiterung der Bande bei der Lauffront des Gehirns beobachtet werden. Hierbei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um ALDH1a3, einer Isoform der Aldehyd-Dehydrogenasen (Abbildung 8 A). Verglichen mit der 7265PDA und der 6606I exprimierte die 6606PDA am meisten ALDH1a1 (Abbildung 8 B), aber am wenigsten ALDH1a3 (Abbildung 8 C). Diese Unterschiede waren gering und nicht signifikant. Im Western Blot für GFAP zeigte sich in allen Zelllinien und im Gehirn als Positivkontrolle eine deutliche Bande bei 50 kDa (Abbildung 8 D). Beim Vergleich der drei Zelllinien zeigte die 6606PDA die stärkste Expression von GFAP. Diese Unterschiede waren jedoch geringfügig und nicht signifikant (Abbildung 8 E). Bei der Expressionsanalyse von CD133 konnte lediglich bei der 6606I und der Positivkontrolle eine eindeutige Bande bei 130 kDa beobachtet werden. Die Zelllinien 7265PDA und 6606PDA zeigten in allen vier durchgeführten Western Blots keine quantifizierbare Expression von CD133. Für die 6606I konnte in den von uns durchgeführten Western Blots eine Expression von CD133 ($X = 0,47$; $STABW = \pm 0,96$) nachgewiesen werden. Diese war aber im Vergleich zur Expression von CD133 in der Niere in den einzelnen Western Blots sehr variabel. In dem hier gezeigten Western Blot exprimiert die 6606I 2,2-fach so stark CD133 wie die Niere (Abbildung 8 F).

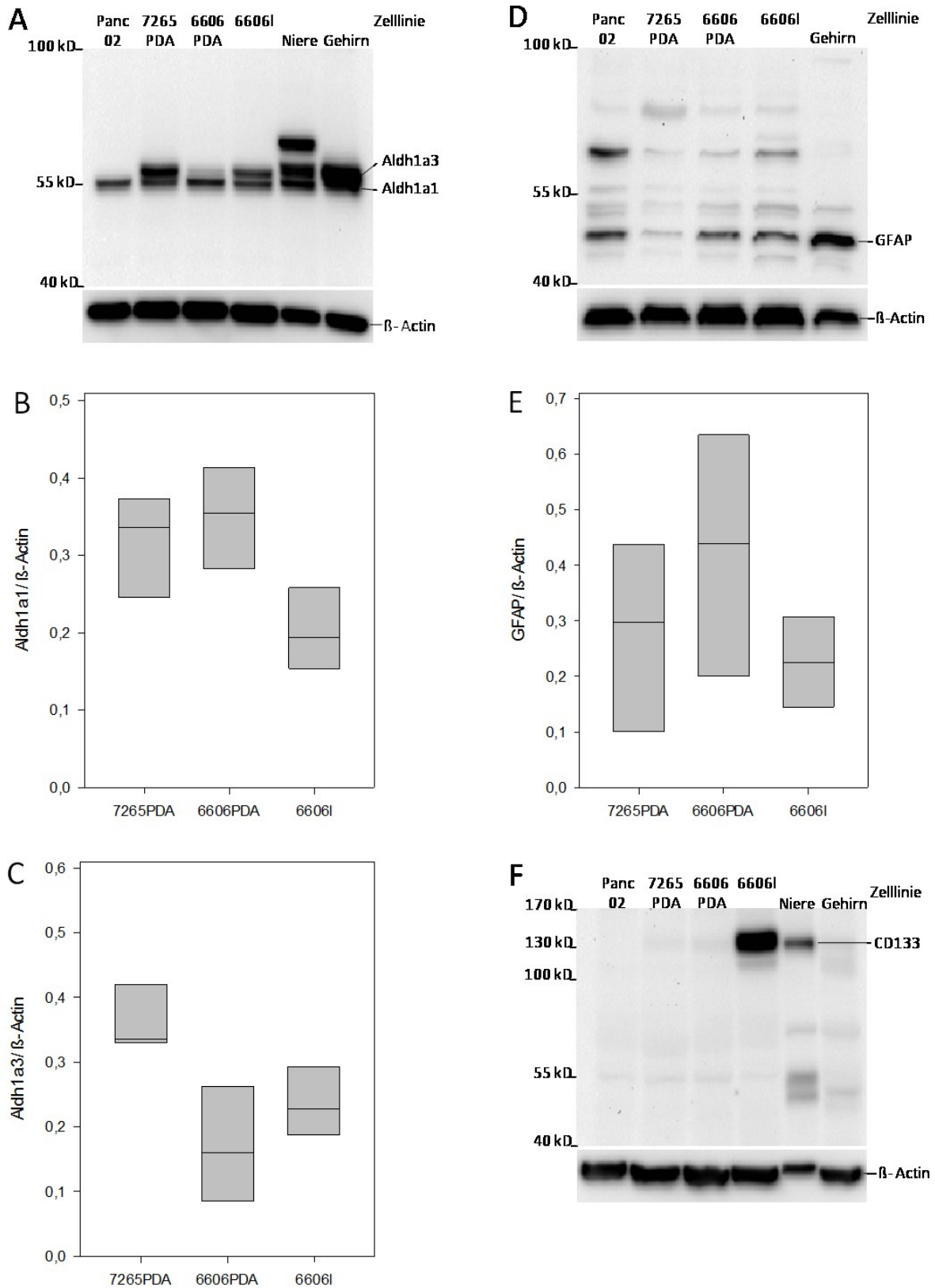


Abbildung 8: Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP der Zelllinien im Vergleich.

(A) Expressionsanalyse von ALDH1a1 und ALDH1a3 in den Zelllinien Panc02, 7265PDA, 6606PDA und 6606I mittels Western Blot. Im Vergleich exprimiert 6606PDA am meisten (B)

ALDH1a1 und am wenigsten (C) ALDH1a3. (D) Expressionsanalyse von GFAP in den Zelllinien Panc02, 7265PDA, 6606PDA und 6606l mittels Western Blot. (E) Im Vergleich exprimiert 6606PDA am meisten GFAP. (F) Expressionsanalyse von CD133 in den Zelllinien Panc02, 7265PDA, 6606PDA und 6606l mittels Western Blot. Niere und Gehirn dienten als Positivkontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen in Abbildung B, C und E waren nicht signifikant.

3.5. Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf das Tumorstammzellkompartiment

3.5.1. Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf das Stammzellkompartiment der Tumore

In einer vorausgegangen Studie von T. Radecke [105] konnte man den proliferationsfördernden Einfluss des Diabetes mellitus auf das Pankreaskarzinom zeigen. Eine Cerulein induzierte Pankreatitis hingegen hatte nur einen moderaten Einfluss auf das Wachstum des Tumors. In Anlehnung an diese Erkenntnisse kam die Frage auf, inwieweit die Faktoren Diabetes mellitus und eine Pankreatitis das Tumorstammzellkompartiment im duktales Adenokarzinom des Pankreas beeinflussen. Hierfür wurden die Tumore aus der oben genannten Studie verwendet. Die Tumorzellinjektion in jener Studie erfolgte auf analoge Weise wie in der hiesigen, durch eine syngene, orthotope Zellinjektion der 6606PDA in das Pankreas und einer Asservierung der 6606PDA generierten Tumore nach drei Wochen [105]. Verwendet wurden diabetische, adipöse obese Mäuse und normoglykämie, schlanke lean Mäuse. Mittels repetitiver Cerulein-Injektion wurde bei beiden Mausstämmen in je einer Kohorte eine chronische Pankreatitis induziert, sodass vier Vergleichsgruppen entstanden (lean Cerulein, lean Sham, obese Cerulein, obese Sham).

Es wurden immunhistochemische Färbungen der Tumore mittels anti-ALDH1a1 und anti-CD133 Antikörper erstellt und die Anzahl der positiv gefärbten Zellen unter dem Mikroskop evaluiert. Die Auswertung der Immunhistochemien mittels anti-ALDH1a1 Antikörper zeigte, dass die nicht-diabetischen Tiere mit einer Pankreatitis (lean Cerulein) signifikant mehr ALDH1a1⁺ Zellen in den Tumoren aufwiesen als die diabetischen Tiere mit einer Pankreatitis (obese Cerulein). Weiter stellte sich heraus, dass alle nicht-diabetischen Mäuse

(lean Sham und lean Cerulein) mehr ALDH1a1⁺ Zellen aufwiesen als alle diabetischen Mäuse (obese Sham und obese Cerulein), jedoch waren diese Differenzen nicht signifikant. Zusammenfassend konnten wir beobachten, dass eine diabetische Stoffwechsellage die Anzahl an ALDH1a1⁺ Zellen reduziert und somit einen hemmenden Einfluss auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment im Pankreaskarzinom hatte (Abbildung 9 A).

Die Auswertung der Immunhistochemien mittels anti- CD133 Antikörper zeigte ein etwas anderes Bild. Die diabetische Stoffwechsellage der Tiere hatte nur minimalen Einfluss auf die Anzahl an CD133⁺ Zellen. Jedoch wurde die Anzahl von CD133⁺ Zellen durch die Pankreatitis etwas erhöht. Obwohl die beschriebenen Unterschiede nicht signifikant waren, zeigte diese Auswertung, dass die Pankreatitis einen geringfügig positiven Effekt auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment im Pankreaskarzinom hatte (Abbildung 9 B).

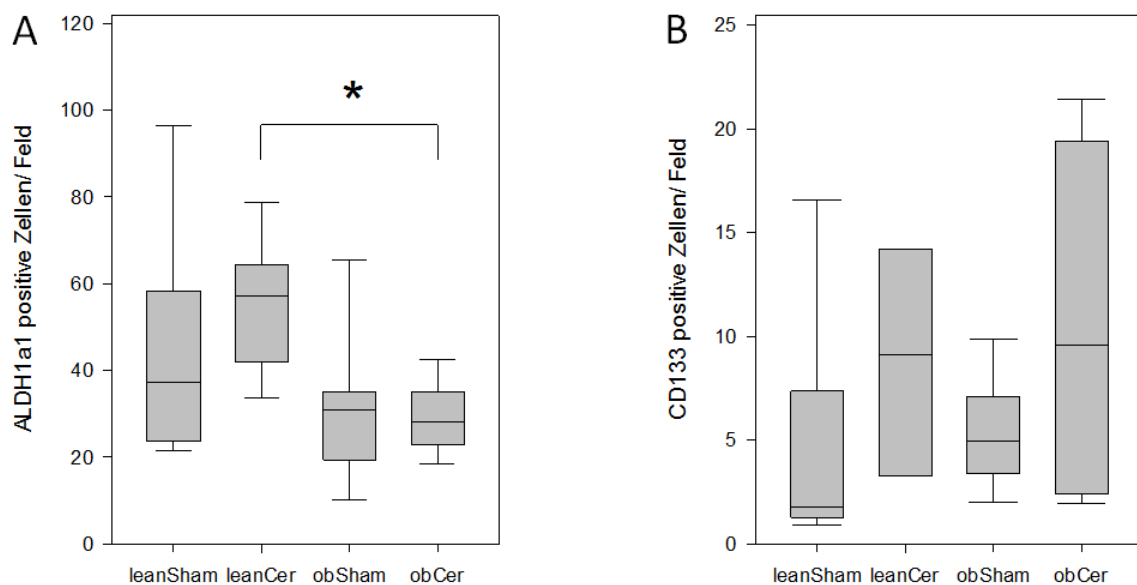


Abbildung 9: Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf das Stammzellkompartiment der Tumore.

Vergleich der Gruppen lean Sham, lean Cerulein, obese Sham, obese Cerulein in Bezug auf die Anzahl an (A) ALDH1a1⁺ und (B) CD133⁺ Zellen. Die Boxplots zeigen den Median, das 25. und 75. Perzentil in Form der Box und das 10. und 90. Perzentil in Form der Whisker. Die Anzahl der evaluierten Tiere betrug n = 9 (lean Sham), n = 9 (lean Cerulein), n = 9 (obese Sham), n = 10 (obese Cerulein) in Abbildung A und n = 5 (lean Sham), n = 4 (lean Cerulein), n

= 6 (obese Sham), n = 6 (obese Cerulein) in Abbildung B. Signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen sind mit * gekennzeichnet, p = 0,003.

3.5.2. Einfluss von Diabetes auf das Tumorstammzellkompartiment der Zelllinien

Um den Einfluss von Glukose auf die Expression von ALDH1a1 in den Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I zu evaluieren, wurden die Zelllinien jeweils unter einer erhöhten (4,5 g/l) und verminderten (0,5 g/l) Glukosekonzentration kultiviert. In allen drei Zelllinien konnte sowohl bei einer erhöhten als auch verminderten Glukose- Exposition eine deutliche Bande von ALDH1a1 im Western Blot beobachtet werden (Abbildung 10 A). Zusätzlich war bei allen Vergleichsgruppen eine zweite Bande zu detektieren, wobei es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um ALDH1a3 handelte. Als Referenz und Bezugszelllinie für das Expressionsniveau von ALDH1a1 und ALDH1a3 wurde die 6606PDA + 4,5 g/l verwendet. Die Vergleichsgruppen 7265PDA + 4,5 g/l, 7265PDA + 0,5 g/l und 6606PDA + 0,5 g/l exprimierten äquivalente Mengen an ALDH1a1 und ALDH1a3 wie die 6606PDA + 4,5 g/l. Im Vergleich dazu exprimierten die 6606I + 4,5 g/l und 6606I + 0,5 g/l Glukose deutlich weniger ALDH1a1 und ALDH1a3. Weiter fiel auf, dass in allen Vergleichsgruppen die Expression der ALDH1a3 stärker war als die von ALDH1a1. Dennoch hatte die Änderung der Glukosekonzentration in allen drei Zelllinien keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression von ALDH1a1 und ALDH1a3 (Abbildung 10 A).

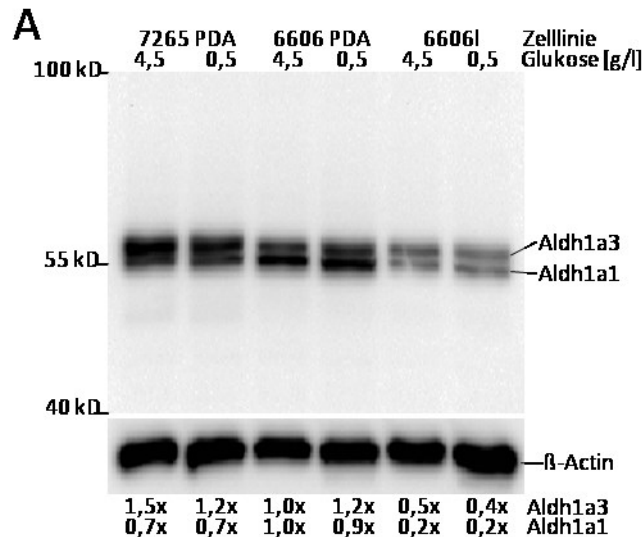


Abbildung 10: Einfluss der Glukosekonzentration auf die ALDH1 Expression.

(A) Expressionsanalyse von ALDH1a1 und ALDH1a3 in den Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I mittels Western Blot. Adenokarzinomzelllinien wurden jeweils unter einer erhöhten (4,5 g/l) und verminderten (0,5 g/l) Glukosekonzentration kultiviert. Als Referenz für das Expressions-Niveau diente 6606PDA + 4,5 g/l. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Die Exposition der Zelllinien zu unterschiedlich hohen Glukosekonzentration im Kulturmedium hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von ALDH1a1 und ALDH1a3.

3.6. Einfluss von Gemcitabin auf das Tumorstammzellkompartiment

3.6.1. Klonale Selektion durch Gemcitabin erhöht nicht die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand war der Einfluss des Chemotherapeutikums Gemcitabin auf das Tumorstammzellkompartiment. Durch Zugabe von Gemcitabin zu der Kultur der Zelllinie 6606PDA gelang es, drei verschiedene Gemcitabin-resistente Klone zu kultivieren. Die Klone A11, F8 und F11 waren bis zu einer Konzentration von 1 µM Gemcitabin im Zellkulturmedium gegen das Chemotherapeutikum resistent. Mittels Western Blot wurde die Expression von ALDH1a1 der Zelllinie 6606PDA und ihren Gemcitabin-resistenten Klonen A11, F8 und F11 ermittelt. Hiermit konnte in allen Zelllinien und dem Gehirn, welches als Positivkontrolle diente, bei 55 kDa eine klare Bande für ALDH1a1

ermittelt werden. Zusätzlich fand sich wieder eine weitere Bande, bei der es sich am wahrscheinlichsten um ALDH1a3 handelte (Abbildung 11 A).

Das Expressionsniveau von ALDH1a1 in der 6606PDA und ihren Klonen zeigte kaum Unterschiede und war annähernd gleich (Abbildung 11 B). Der Klon F11 exprimierte etwas weniger ALDH1a3 als die anderen Klone und die 6606PDA, aber dennoch waren die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen nicht signifikant (Abbildung 11 C).

Mittels des Western Blots für GFAP konnte in allen Zelllinien und der Positivkontrolle Gehirn eine Bande für GFAP bei 50 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 11 D). Auch hier zeigten sich beim Vergleich der 6606PDA mit ihren Gemcitabinresistenten Klonen A11, F8 und F11 nur marginale Unterschiede in der Expression von GFAP (Abbildung 11 E). Im Western Blot für CD133 konnte zwar in der Positivkontrolle Niere eine Bande bei 130 kDa nachgewiesen werden, aber auch nach mehreren Ansätzen keine Bande für CD133 in den Tumorzelllinien (Abbildung 11 F).

Eine Langzeitselektion mit bis zu 1 μ M Gemcitabin konnte in diesen Versuchen keine vermehrte Expression von ALDH1a1, GFAP oder CD133 induzieren und hatte somit keinen Einfluss auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment.

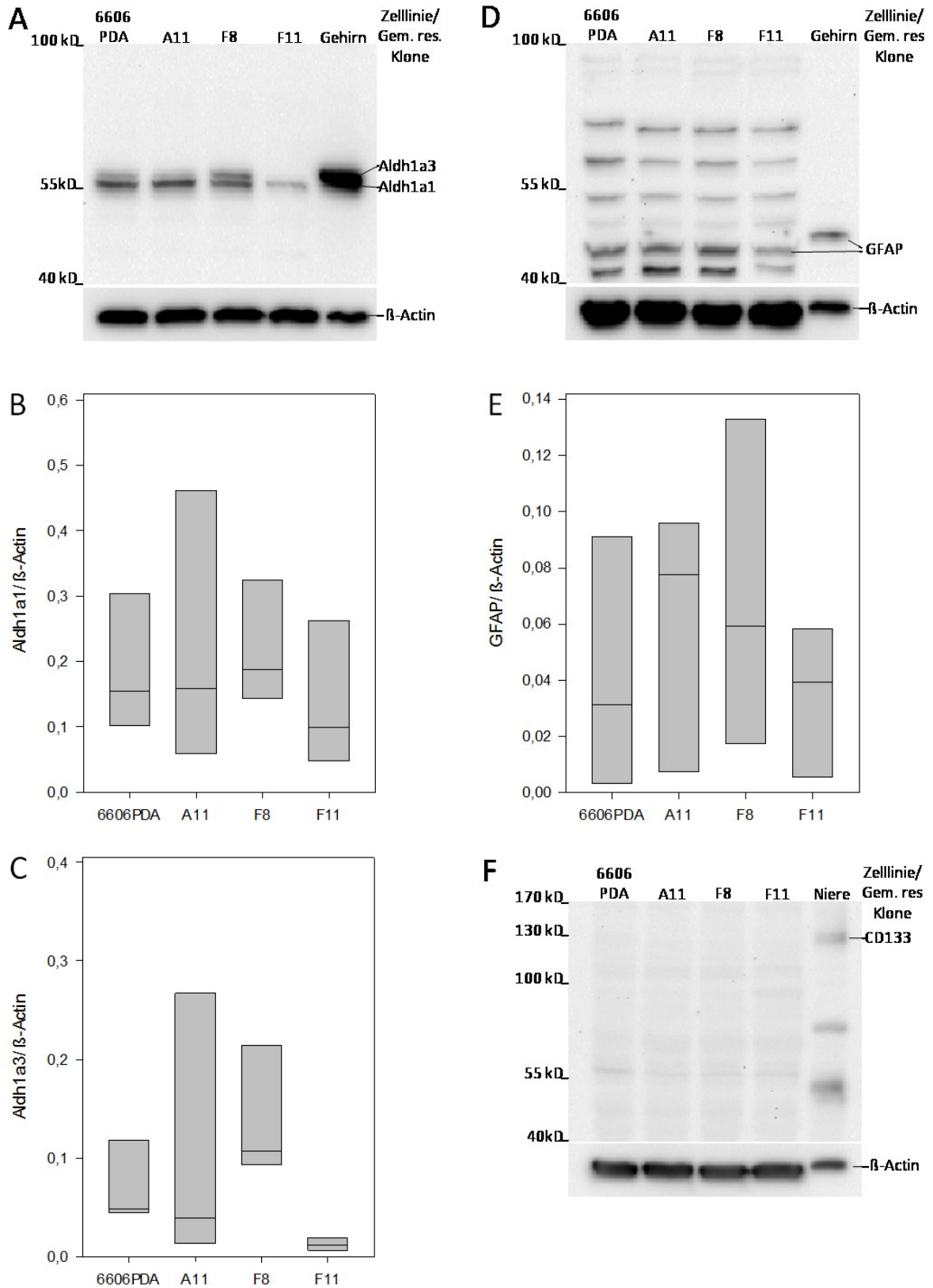


Abbildung 11: Selektion durch Gemcitabin erhöht nicht die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP.

(A) Expressionsanalyse von ALDH1a1 und ALDH1a3 in der Zelllinie 6606PDA und den Gemcitabin-resistenten Klonen A11, F8 und F11 mittels Western Blot. Die Klone exprimieren nicht mehr (B) ALDH1a1 und (C) ALDH1a3 als die 6606PDA Zellen. (D) Expressionsanalyse von GFAP in der Zelllinie 6606PDA und den Klonen A11, F8 und F11 mittels Western Blot. (E) Die Klone exprimieren nicht mehr GFAP als die 6606PDA. (F) Expressionsanalyse von CD133 in der Zelllinie 6606PDA und den Klonen A11, F8 und F11 mittels Western Blot. Expression von CD133 ist in keiner der Vergleichsgruppen quantifizierbar. Gehirn und Niere dienten als Positivkontrolle, β -Aktin als Ladekontrolle. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen in Abbildung B, C und E waren nicht signifikant (n = 4).

3.6.2. Kurzzeitstimulation mit Gemcitabin hat keinen Einfluss auf die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP

Zusätzlich zur Langzeitstimulation mit Gemcitabin wurde auch eine Kurzzeitstimulation der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I mit dem Chemotherapeutikum untersucht. Die Zelllinien wurden für 24 Stunden einer Gemcitabinkonzentration von 0,1 μ M exponiert und anschließend wurde die Expression von ALDH1a1 der Zelllinien mit und ohne vorausgegangener Gemcitabin-Exposition analysiert (Abbildung 12 A). Hier zeigte sich in allen Vergleichsgruppen eine Bande bei 55 kD, und eine weitere für ALDH1a3 (Abbildung 12 A). Die 7265PDA exprimierte sowohl mit als auch ohne vorausgegangener Gemcitabinstimulation mehr ALDH1a1 als die anderen Vergleichsgruppen. Dieser Unterschied wies keine Signifikanz auf. Die Stimulation mit Gemcitabin induzierte in keiner der Zelllinien eine vermehrte Expression von ALDH1a1 (Abbildung 12 B). Auch bei der Expression von ALDH1a3 zeigte die 7265PDA sowohl mit als auch ohne vorausgegangener Gemcitabinstimulation eine vermehrte Expression des Gens gegenüber den anderen Vergleichsgruppen. Dieser Unterschied wies jedoch ebenfalls keine Signifikanz auf. Die kurzzeitige Stimulation mit Gemcitabin induzierte in allen drei Zelllinien einen moderaten Anstieg der Expression von ALDH1a3, jedoch war dieser Effekt nicht signifikant (Abbildung 12 C). In dem Western Blot für GFAP zeigte sich bei allen Zelllinien und der Positivkontrolle Gehirn eine eindeutige Bande bei 50 kDa (Abbildung 12 D). Die Expression von GFAP war zwischen allen Vergleichsgruppen annähernd gleich stark und die Stimulation mit Gemcitabin konnte keine vermehrte Expression von GFAP induzieren (Abbildung 12 E). Im

Western Blot für CD133 konnte nur in der Positivkontrolle Niere und der 6606l mit und ohne Gemcitabinstimulation eine Bande für CD133 bei 130 kD nachgewiesen werden. Demzufolge blieb ein Vergleich der Zelllinien aus. Die Gemcitabinstimulation induzierte bei der 6606l eine Abnahme der Expression von CD133 um 30 % (Abbildung 12 F). Zusammenfassend hatte die 24-stündige Stimulation der Zelllinien mit 0,1 µM Gemcitabin keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP und somit keinen Einfluss auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment.

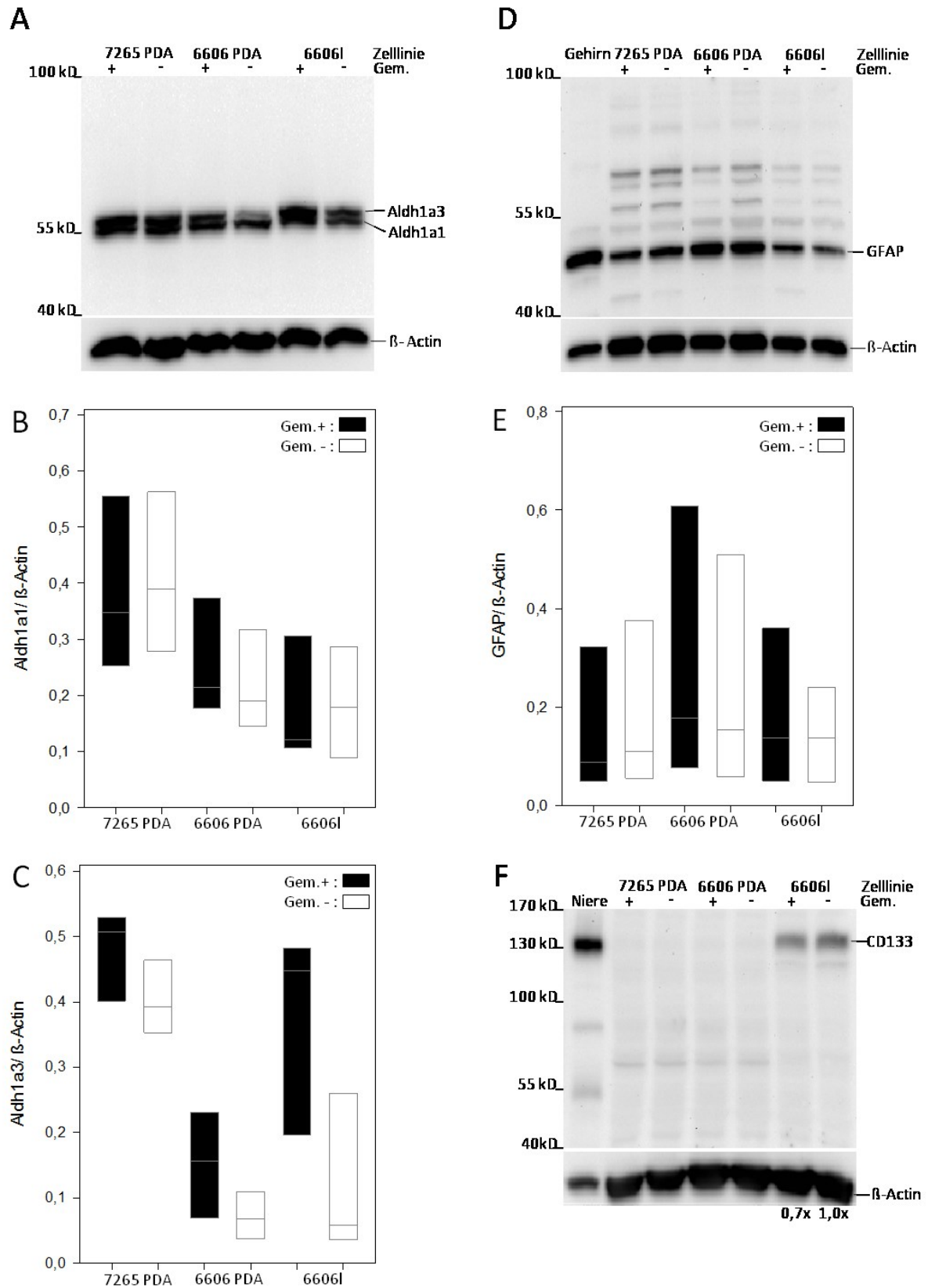


Abbildung 12: Kurzzeitstimulation mit Gemcitabin hat keinen Einfluss auf die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP.

(A) Expressionsanalyse von ALDH1a1 und ALDH1a3 mittels Western Blot in den Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606l, mit und ohne Gemcitabin-Stimulation über 24 h. Gem.-Stimulation beeinflusst nicht die Expression von (B) ALDH1a1, aber verstärkt moderat die Expression von (C) ALDH1a3. (D) Expressionsanalyse von GFAP mittels Western Blot in den Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606l, mit und ohne Gemcitabin-Stimulation über 24 h. (E) Gem.-Stimulation beeinflusst nicht die Expression von GFAP. (F) Expressionsanalyse von CD133 mittels Western Blot in den Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606l, mit und ohne Gemcitabin-Stimulation über 24 h. (E) Gem.-Stimulation vermindert die Expression von CD133 um den Faktor 0,7 in der 6606l. CD133 ist in den anderen Vergleichsgruppen nicht quantifizierbar. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen in Abbildung B, C und E waren nicht signifikant (n = 6).

4. Diskussion

4.1. Bildgebung der Pankreastumore mittels MRT

In der Bildgebung der Tumore mittels MRT zeigten sich sowohl gut als auch schlecht abgrenzbare und zu beurteilende Neoplasien. Diese Schwierigkeiten äußerten sich darin, dass das errechnete Tumolvolumen, ermittelt durch Analyse und Auswertung der MRT-Datensätze und die gewogene Tumormasse, bestimmt nach Resektion der Neoplasie am Tag der Asservierung, nicht immer zu 100 % übereinstimmten. Dennoch konnten wir mit einem Korrelationskoeffizienten r mit 0,821 bei $p < 0,0001$ eine starke lineare Korrelation der beiden erhobenen Messwerte beobachten. Auch in einer anderen Studie konnte man zeigen, dass die Tumorummetrierung anhand von MRT-Datensätzen mit der Massenbestimmung der Tumore nach Resektion eine starke lineare Korrelation zeigte [106].

Wie eben schon angeführt, stößt die MRT bei der Visualisierung von Pankreaskarzinomen an ihre Grenzen. Es handelt sich hierbei vor allem um kleine und isointense Pankreaskarzinome, welche erhebliche Schwierigkeiten darstellen [30]. Auch in der klinischen Praxis musste man immer wieder feststellen, dass die präoperative Bildgebung mittels MRT nicht immer mit der tatsächlichen Ausdehnung des Adenokarzinoms im Pankreas übereinstimmte [107]. Im Gegensatz zum menschlichen Pankreas ist das murine Pankreas in seiner Form und Ausbreitung nicht so eindeutig definiert. Es liegt locker verteilt im Mesenterium des proximalen Dünndarms. Das Pankreas der Maus ist außerdem bis zu 1000mal kleiner als jenes des Menschen [108]. Die ellipsoiden bis kugelförmigen Pankreastumore hatten einen Durchmesser von ca. 0,5 bis 1cm. Die Anatomie des murinen Pankreas und die Größe der duktaalen Adenokarzinome waren wesentliche Faktoren, welche die Bildgebung mittels MRT erschwerten. Durch die hohe räumliche Auflösung des 7 Tesla MRT und die geringe Schichtdicke von 0,7mm konnte diesen Umständen aber adäquat begegnet werden. Darüber hinaus stellen bei der Bildgebung des Pankreas atemabhängige Bewegungsartefakte einen limitierenden Faktor dar [109], was in unseren Untersuchungen mittels einer atemabhängig getriggerten Sequenz auf ein Minimum reduziert werden konnte. Für die Volumetrierung der Tumore diente die freiverfügbare Open Source Softwareplattform 3D Slicer. Dies ist eine etablierte Software zur Visualisierung und Verarbeitung von MRT- bzw. CT-Datensätzen und wurde bislang von einigen Forschungsgruppen zur Volumetrierung von Tumoren verwendet [110–112].

Neben der Magnetresonanztomographie gibt es bis heute in der Forschung eine Reihe von nicht-invasiven bildgebenden Verfahren, wie z. B. die Computertomographie, die Positronen-Emissions-Tomography oder die Biolumineszenz [113]. Mit ihrer hohen räumlichen Auflösung, der guten Darstellung von Weichteilen, der nicht vorhandenen Strahlenbelastung [32] und der geringen Abhängigkeit des Verfahrens vom Untersucher, wie z. B. im Falle der Sonographie [24], bietet die MRT gegenüber anderen nicht-invasiven bildgebenden Verfahren viele Vorteile. Für die DWI konnte man zeigen, dass sie zum Teil genauere Ergebnisse über Größe und Ausbreitung des Pankreas und des duktales Adenokarzinoms im Pankreas liefert als konventionelle MRT-Sequenzen [114,115]. Die entscheidenden Vorteile eines nicht-invasiven bildgebenden Verfahrens waren für uns, dass wir Veränderungen, wie z. B. die Tumorprogression im longitudinalen Verlauf des Tierexperiments, beobachten und somit die Anzahl an Versuchstieren stark reduzieren konnten.

4.2. Syngenes orthotopes Karzinommodell des duktales Adenokarzinoms im Pankreas

Bis heute gibt es eine Vielzahl an Tiermodellen, mit deren Hilfe man versucht, neue Erkenntnisse über das duktales Adenokarzinom des Pankreas zu gewinnen. Dennoch bietet das von uns verwendete syngene und orthotope Mausmodell eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Methoden.

Durch die orthotope Injektion der Karzinomzellen können Tumore in einem naturnahen Milieu wachsen und wichtige Einflussfaktoren auf das Tumorwachstum, wie z. B. die Interaktion zwischen Tumor und Stroma, werden berücksichtigt. Faktoren, deren Einfluss auf das Pankreaskarzinom aktuell diskutiert werden, sind z. B. Karzinom-assoziierte-Fibroblasten und die extrazelluläre Matrix. Von diesen beiden wird angenommen, dass sie unter anderem verantwortlich sind für die Promotion von Metastasen, die Sekretion von Tumorwachstum-stimulierenden-Faktoren oder die Resistenz des Tumors gegenüber Chemo- und Strahlentherapie [116]. Pankreatische Sternzellen, welche das kollagene Stroma des Pankreaskarzinoms produzieren [117], haben ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf die Tumorprogression und den Prozess der Metastasierung beim Pankreaskarzinom [118,119]. Die heterotope Transplantation von Tumoren oder Tumorzellen ist im Vergleich zur orthotopen Transplantation schneller und technisch einfacher durchzuführen. Sie ist auch für

die Versuchstiere mit weniger operativen Risiken und postoperativen Komplikationen verbunden. Das Wachstum lässt sich bei einer heterotopen Lage des Karzinoms, in der Regel subkutan, durch einfaches Messen, wie z. B. mit einer Schublehre, leicht bestimmen. In unserem Modell haben wir dies durch ein aufwändigeres Verfahren, der Bildgebung mittels MRT, realisiert.

Mit Hilfe der orthotopen syngenesischen Tumorzell-Injektionen konnten wir mit hoher Verlässlichkeit (Tumor-take-rate: 7265PDA (9%), 6606PDA (100%), 6606I (83%)) und in relativ kurzer Zeit (21 Tage) PDAs reproduzierbar generieren. Im Vergleich dazu kann die Entstehung eines Karzinoms in einem GEMM (genetically engineered mouse model) Wochen bis Monate dauern [120,121]. Bei unseren verwendeten Tumor-Zelllinien handelt es sich um Zellen, welche initial in einem GEMM generiert, isoliert und anschließend kultiviert werden konnten [120–122]. Folglich können wir davon ausgehen, dass wir ein Tiermodell verwendeten, welches bei der Entstehung des PDAC gängige genetische Veränderungen wie eine Mutation des Kras und wichtige Progenitor-Läsionen wie PanInNs aufweist [120] und somit ein geeignetes und zeiteffizientes Modell darstellt.

Bei der Verwendung von humanen Karzinomzelllinien ist bei der Implantation in einen murinen Empfänger eine Immundefizienz die Voraussetzung, um keine Abstoßungsreaktion des Transplantats zu induzieren [123]. Die Verwendung von immunkompetenten Mäusen ist ein weiterer großer Vorteil unseres Modells. Das Immunsystem nimmt auf die Progression des Pankreaskarzinoms in vielerlei Hinsicht einen großen Einfluss [124] und diese Wechselwirkungen könnten bei der Verwendung von immunkompromittierten Mäusen nur eingeschränkt oder überhaupt nicht beurteilt werden. Zusätzlich sind immundefiziente Mäuse im Vergleich zu den von uns verwendeten C57BL/6-Mäusen sehr anfällig für Infektionen und postoperative Komplikationen, was die Arbeit mit immunkompromittierten Tieren deutlich erschwert [125].

Bis heute gibt es eine Vielzahl an etablierten Pankreaskarzinomzelllinien [126]. Viele von diesen, wie z. B. die Panc1, werden in der Wissenschaft schon seit mehreren Jahrzehnten verwendet [127]. Hierbei ist bekannt, dass es durch wiederholte Passagierung der Zelllinien zu Kontaminationen mit anderen Zelllinien kommen kann [126]. Im Gegensatz dazu verwendeten wir sehr neuartige Karzinomzelllinien, welche bislang wenig charakterisiert und

passagiert wurden, wodurch unter anderem das Risiko einer potentiellen Kontamination mit einer anderen Zelllinie reduziert ist.

4.3. Einfluss von Diabetes auf Tumorstammzellen

4.3.1. Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellaage

Der Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen zeichnet sich im Anfangsstadium durch eine periphere Insulinresistenz und eine kompensatorische Hyperinsulinämie aus. Die im Krankheitsverlauf weiter fortschreitende periphere Insulinresistenz, mit einem immer größeren Bedarf an Insulin, führt letztendlich zur Betazell dysfunction mit Hypoinsulinämie und erhöhten Blutzuckerwerten (Nüchternblutzucker ≥ 126 mg/dl) [128,129]. Die verwendeten Tiere (B6.V-Lep^{ob/ob}) zur Untersuchung des Einflusses einer diabetischen Stoffwechsellaage auf das Stammzellkompartiment der Pankreaskarzinome (Abbildung 9 A und B) unterscheiden sich zu Patienten mit Diabetes Typ 2 in zwei wesentlichen Punkten. Die Hyperglykämie als Kennzeichen eines Diabetes mellitus Typ 2 ist in den B6.V-Lep^{ob/ob} Mäusen nur vorübergehend und mild ausgeprägt. Mit maximalen Blutzuckerwerten ca. drei Monate nach Geburt der Tiere beginnen diese danach konstant zu sinken [130] und sind bei Ende der in vivo Versuche (Tag 26) vergleichbar mit dem der Kontrolltiere [105]. Die Inselzellen der Tiere bestehen fast vollständig aus Betazellen und verlieren lebenslang nicht an Funktionalität, was zu einer dauerhaften Hyperinsulinämie führt [130]. Die C-Peptid Konzentrationen der B6.V-Lep^{ob/ob} Mäuse sind dementsprechend bis um das 10-fache erhöht [131]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die diabetische Stoffwechsellaage der verwendeten Tiere primär durch eine Hyperinsulinämie und sekundär durch eine milde Hyperglykämie gekennzeichnet ist.

4.3.2. Einflussfaktor Insulin

In den untersuchten Tumoren konnten wir beobachten, dass die diabetische Stoffwechsellaage der Tiere zu einer signifikanten Reduktion der ALDH1a1⁺ Zellen führte (Abbildung 9 A). Die Hyperinsulinämie hatte auf die Expression von CD133 nur einen minimalen Einfluss (Abbildung 9 B).

Über den Einfluss von Insulin auf Tumorstammzellen oder Stammzellen ist nur sehr wenig bekannt. Bei einer klinischen Studie konnte die Beobachtung gemacht werden, dass Neugeborene, deren Mütter an einem Schwangerschaftsdiabetes erkrankt waren, im Nabelschnurblut eine erhöhte Anzahl an hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen aufwiesen. Die Autoren gingen davon aus, dass dies mit dem exogen zugeführten Insulin im Rahmen der Therapie des Schwangerschaftsdiabetes zusammenhängen würde [132], was vermuten lässt, dass Insulin einen proliferationsfördernden Einfluss auf Stammzellen hat. Wie schon oben erwähnt, konnten weitere Studien, welche den direkten Einfluss von Insulin auf Tumorstammzellen, Stammzellen im Allgemeinen oder auf die Genexpression von ALDH1a1 bzw. CD133 untersuchen, zum aktuellen Zeitpunkt nicht gefunden werden.

Insulin bindet jedoch nicht nur an die zwei Isoformen seines Rezeptors (Insulinrezeptor A und B), sondern kann auch bei hinreichender Konzentration an den Insulin-like growth factor 1 Rezeptor (IGF-1R) binden und diesen aktivieren. [133]. Des Weiteren fungieren der Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und der Insulin-like growth factor 2 (IGF-2) als Liganden des IGF-1R. Es konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen den IGF-1R exprimieren und eine Inhibition dieses Rezeptors zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt [134]. Bislang gibt es jedoch nur eine Studie, die den Stellenwert des IGF-1R bei Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms untersuchte. In der Studie von Urtasun et al. wurde mittels NVP-AEW541 und Lapatinib sowohl der IGF-1R und der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)/Her-2 gehemmt. Somit lässt sich aus dieser Studie nicht der isolierte Effekt einer IGF-1R-Hemmung auf Tumorstammzellen ableiten. Dennoch postulieren die Autoren, dass eine kombinierte Hemmung der beiden Rezeptoren die Therapieresistenz von Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms gegenüber Gemcitabin aufhebt und somit einen neuen Ansatzpunkt der Tumorthherapie darstellt [135].

In Tumorstammzellen anderer Tumorentitäten ist die Signaltransduktion des IGF1-R ein besser erforschtes Themengebiet und bis heute konnten einige Studien die besondere Relevanz dieses Rezeptors für Tumorstammzellen zeigen [136]. Tumorstammzellen des Brustkrebses exprimieren bis zu fünf Mal so viel IGF-1R wie Nicht-Tumorstammzellen. Die Inhibition des IGF-1R führt zur Abnahme der Anzahl an Tumorstammzellen und einer Aufhebung von Tumorstammzelleigenschaften. Dies äußert sich zum einen durch eine verminderte Fähigkeit Mammosphären zu bilden und zum anderen führte die Inhibition des

IGF-1R zu einer verminderten Tumorgenität und somit zu einer Einschränkung der Selbsterneuerung von Tumorstammzellen in vivo [137]. Im Adenokarzinom der Lunge korrelierte eine vermehrte Expression des IGF-1R mit der vermehrten Expression von Tumorstammzellmarkern. Durch eine Inhibition des IGF-1R wurde ebenfalls die Fähigkeit zur Sphäroid-Bildung in vitro und das Selbsterneuerungspotential der Tumorstammzellen in vivo gemindert [138]. Weiter gilt der IGF-1R als wichtiger Ansatzpunkt zur Überwindung der Therapieresistenz bei Tumorstammzellen. So zeigen Chemotherapie-resistente Tumorstammzellen des Kolonkarzinoms eine vermehrte Expression des IGF-1R, sind aber bei Inhibition des Rezeptors sehr viel sensibler gegenüber einer Chemotherapie als Nicht-Tumorstammzellen [139].

Wie die oben genannten Studien zeigen konnten spielt der IGF-1R bei der Proliferation des Pankreaskarzinoms, bei Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms und Tumorstammzellen anderer Tumorentitäten eine wichtige Rolle. Vor dem Hintergrund, dass Insulin auch als Ligand des IGF-1R fungieren kann, würde man nach diesen Erkenntnissen bei einer Hyperinsulinämie eher eine Zunahme von Tumorstammzellen bzw. eine vermehrte Genexpression von Tumorstammzellen assoziierten Proteinen im Pankreaskarzinom erwarten. Obwohl die Ergebnisse von anderen Forschungsgruppen stark auf diesen Effekt hindeuten, konnten wir eine vermehrte Genexpression von ALDH1a1 und CD133 in unseren Versuchen nicht beobachten.

4.3.3. Einflussfaktor Glukose

Die Hyperglykämie zeigte eine signifikante Reduktion der ALDH1a1⁺ Zellen der Tumore in unseren in vivo Versuchen (Abbildung 9 A). Auf die Genexpression von CD133 hatte die Hyperglykämie in vivo keinen erkennbaren Einfluss (Abbildung 9 A). Um die beobachteten Unterschiede genauer zu analysieren, wurden die drei murinen Adenokarzinomzelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I in vitro bei einer erhöhten und verminderten Konzentration an Glukose kultiviert. Die Expression von ALDH1a1 wurde anschließend im Western Blot analysiert. Die Änderung der Glukosekonzentration im Kulturmedium hatte bei allen drei Zelllinien in vitro keinen nennenswerten Einfluss auf die Expression von ALDH1a1 (Abbildung 10 A).

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts lieferte Otto Warburg bedeutende Erkenntnisse zum Glukosestoffwechsel in Tumorgewebe. Seine wahrscheinlich bekannteste Entdeckung war, dass Tumore sich unabhängig vom Sauerstoffangebot zur Energiegewinnung der anaeroben Glykolyse bedienen. Diese Beobachtung wurde später auch als der „Warburg-Effekt“ bezeichnet [140]. Auch im Pankreaskarzinom konnte man anhand von proteomischer Analytik feststellen, dass wichtige Enzyme der Glykolyse, wie die Glycerinaldehyd- 3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Triosephosphatisomerase (TPI) oder die Enolase 1 (ENO1), vermehrt exprimiert werden [141], was vermuten lässt, dass der Glukosestoffwechsel auch hier eine entscheidende Rolle spielt. Ebenso hat der Glukosemetabolismus bei Tumorstammzellen im Vergleich zu Nicht-Tumorstammzellen einen erhöhten Stellenwert [142] und wird vorzugsweise zur Energiegewinnung genutzt [143].

In einer Studie von Shibuya et al. [144] konnte gezeigt werden, dass in Pankreas-Karzinomzellen durch die Hemmung der intrazellulären Glukoseaufnahme durch WZB117, ein selektiver Inhibitor des Glukose Transporters 1 (GLUT1) [145], in vitro die Expression von CD133 um bis zu 78% reduziert und die sphere-forming-capacity der Pankreas-Karzinomzellen drastisch vermindert wird [144]. Weiter zeigten mit WZB117 vorbehandelten Pankreas-Karzinomzellen bei der Transplantation in vivo eine verminderte Tumorgenität im Vergleich zu nicht behandelten Karzinomzellen [144]. Ein weiteres Charakteristikum von Tumorstammzellen des Pankreas ist die erhöhte Resistenz gegenüber Gemcitabin. Isayev et al. konnten zeigen, dass durch die Inhibierung des Glukosestoffwechsels mittels 3-Bromopyruvat (3BP), einem Inhibitor der GAPDH [146] und Hexokinase [147], der zytostatische Effekt von Gemcitabin auf Pankreaskarzinomzellen deutlich verstärkt wird [148]. Im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin wurden mittels der Kombination aus Gemcitabin und 3BP eine signifikante Reduktion der Zellviabilität, der sphere-forming capacity und der Expression von Tumorstammzellmarkern wie ALDH1, c-Met und CD44 erreicht. Mit dieser Medikamenten-Kombination vorbehandelte Zellen waren nicht in der Lage nach in vivo Transplantation Tumore zu generieren, was in einer Tumoranwachsrate von 0 resultierte [148]. Diese Erkenntnisse weisen stark darauf hin, dass der Glukosemetabolismus bzw. die Inhibition dessen bei Tumorstammzellen und Nicht-Tumorstammzellen des Pankreas eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Proliferation, Selbsterhaltung, Tumorgenität und Chemoresistenz sowohl in vitro als auch in vivo spielt.

Auf die Frage, inwieweit ein erhöhtes oder vermindertes Glukoseangebot in vitro einen Einfluss auf Tumorstammzellen hat, konnten, wie oben schon angeführt, Shibuya et al. ebenfalls interessante Beobachtungen machen. Die Arbeitsgruppe analysierte mittels Western Blot die Expression von Tumorstammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren in der Zelllinie Panc-1, einer epithelialen Karzinomzelllinie des menschlichen Pankreas. Hier führte eine Reduktion der Glukosekonzentration im Kulturmedium zu einer verminderten Expression der Tumorstammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren Sox2 und Nanog, hingegen eine Erhöhung der Glukosekonzentration zu einer vermehrten Expression. Bei Analyse der Zellen mittels FACS zeigte sich, dass die Zelllinien, welche bei einer verminderten Glukosekonzentration kultiviert wurden, ca. 75% weniger CD133⁺ Zellen enthielten wie jene, die einer erhöhten Glukosekonzentration exponiert waren. Ähnliche Unterschiede in der Expression von Tumorstammzell-assoziierten Transkriptionsfaktoren und Oberflächenproteinen zeigte die Analyse einer Karzinomzelllinie des Ovars (A2780) und des Gehirns (GS-Y03) [144]. Auch die Exposition einer Karzinomzelllinie eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NCI-H460) zu unterschiedlichen Glukosekonzentrationen konnte zeigen, dass eine verminderte Glukosekonzentration mit einer verminderten Expression von ALDH1 einhergeht [142], welche analog wie die ALDH1a1 beim Pankreaskarzinom als Tumorstammzellmarker beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gilt [149]. Die Ergebnisse dieser Forschungsgruppen zeigen, dass sich die Expression von Tumorstammzell-assoziierten Oberflächenproteinen proportional zum Glukoseangebot verhält.

Einen solchen Effekt konnten wir in unseren in vitro Versuchen nicht beobachten und somit sind unsere Daten nicht konsistent mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. Ein wesentlicher Unterschied und somit möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz unserer Daten mit der Literatur ist die Expositionsdauer der Zelllinien zu einer verminderten bzw. erhöhten Glukose-Konzentration im Kulturmedium. So kultivierten andere Forschungsgruppen ihre Zellen über 168 Stunden [144], wir hingegen nur über 24 Stunden. In Bezug auf die Glukose-Konzentration im Kulturmedium verwendeten wir vergleichbare Mengen an Glukose, [144] um diesen Effekt zu induzieren.

Aktuell konnten keine Studien gefunden werden, welche in vivo den direkten Zusammenhang einer Hyperglykämie und Tumorstammzellen des Pankreas untersuchten. Auch in Bezug auf andere Tumorentitäten ist über diesen Zusammenhang nur wenig

bekannt. Micucci et al. [150] konnten zeigen, dass durch eine hyperglykämie Stoffwechsellage größere und entdifferenziertere Tumore entstehen. Dieser Effekt der vermehrten Tumorgenität wurde auf entartete broncho-alveoläre-Stammzellen, also nicht Tumorstammzellen im klassischen Sinne, sondern physiologische, bösartig entartete Stammzellen der Lunge, zurückgeführt. Somit zeigen auch hier unsere Ergebnisse ein anderes Bild als die Ergebnisse von Micucci et al.. Als möglicher Erklärungsversuch für diese Diskrepanz könnte man die diabetische Stoffwechsellage unserer Versuchstiere in Betracht ziehen. Wie schon oben angeführt ist diese primär durch eine Hyperinsulinämie und erst sekundär durch eine moderate Hyperglykämie gekennzeichnet. Micucci et al. verwendeten in ihren Versuchen zur Induktion der chronischen Hyperglykämie Streptozocin, was zu einer signifikanten Erhöhung der Blutzuckerkonzentration bei den Versuchstieren führte und somit wahrscheinlich zu der erhöhten Tumorgenität des Adenokarzinoms der Lunge [150].

4.4. Einfluss von Pankreatitis auf Tumorstammzellen

4.4.1. Einfluss der Inflammation auf Tumorstammzellen des Pankreas

In den von uns untersuchten Tumoren hatte die Cerulein-induzierte Pankreatitis nur einen minimalen Einfluss auf die Anzahl an ALDH1a1⁺ Zellen. Für CD133 zeigte sich hier ein anderes Bild. Hier waren in den Tumoren der mit Cerulein behandelten Tiere mehr CD133⁺ Zellen zu finden als in der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren nicht signifikant, stellen aber die Frage in den Raum, ob eine Cerulein-induzierte Pankreatitis die Proliferation von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom begünstigt.

Bei der Recherche in PubMed konnte lediglich eine Studie gefunden werden, welche den Zusammenhang einer Pankreatitis und Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms untersucht. In der Studie von Mohammed et al. wurde der Einfluss einer antiinflammatorischen Therapie mittels Licefelone, einem Inhibitor der Cyclo- und Lipooxygenase, auf das Tumorstammzellkompartiment und die Tumorprogression des Pankreaskarzinoms bei Mäusen mit einer Cerulein-induzierten Pankreatitis untersucht. Sie konnte zeigen, dass eine antiinflammatorische Therapie die Genexpression von Tumorstammzell-assoziierten-Proteinen deutlich reduziert und dass die Tumorprogression des duktales Adenokarzinoms in über 95% der Fälle gestoppt werden konnte. Die Autoren

dieser Studie postulieren, dass der COX/LOX-Inhibitor Licefelone ein spezifischer Inhibitor von Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms ist [151]. Diese Ergebnisse lassen aber auch den Rückschluss zu, dass Inflammation das Wachstum von Tumorstammzellen begünstigt. Weitere Anhaltspunkte für diese Theorie gibt ebenfalls die von uns durchgeführte Cerulein-induzierte Pankreatitis.

4.4.2. Mögliche Mechanismen

Durch repetitive Injektionen von supraphysiologischen Konzentrationen an Cerulein wurde in den von uns untersuchten Mäusen eine chronische Pankreatitis induziert. Die sich wiederholenden Episoden einer akuten Pankreatitis, welche letztendlich in der Atrophie, Fibrose und chronischen Entzündung des Organs resultieren, entsprechen sowohl histomorphologisch als auch klinisch der Genese einer chronischen Pankreatitis [152,153]. Wichtige Komponenten der Induktion und Progression der Cerulein-induzierten Pankreatitis sind reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species/ ROS), der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die Zytokine IL (Interleukin)-1b, IL-6, IL-8 und TNF (Tumornekrosefaktor)- α [154]. Cerulein induziertes ROS entsteht v. a. durch Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen in den Azinus Zellen des Pankreas [155]. NF- κ B aktiviert die proinflammatorischen Zytokine IL-1b, IL-6, IL-8 und TNF- α , welche eine entscheidende Rolle beim inflammatorischen Prozess der Pankreatitis spielen [154]. Indem ROS den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, gilt der oxidative Stress als hauptverantwortlich für die Zytokin-Produktion [155]. IL-1b und TNF- α gelten als die wesentlichen Faktoren, welche den systemischen inflammatorischen Prozess initiieren und aufrecht erhalten [154]. Zusammenfassend könnte man sagen, dass ein potentieller Einfluss auf Tumorstammzellen in diesem Modell der Pankreatitis am wahrscheinlichsten von den oben genannten Faktoren ausgeht.

4.4.2.1. ROS

Bei neuronalen Stammzellen und Stammzellen des hämatopoetischen Systems konnte beobachtet werden, dass diese im Vergleich zu ihren Progenitorzellen niedrigere Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies aufweisen. Eine Erhöhung des

intrazellulären Gehalts an reaktiven Sauerstoffspezies führt zur Seneszenz, Apoptose, einem verminderten Selbsterneuerungspotential und somit zum Verlust wichtiger Stammzeleigenschaften [156]. Auch bei Tumorstammzellen konnte beobachtet werden, dass sie im Vergleich zu regulären Tumorzellen einen verminderten Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies aufweisen. Gleichzeitig ist in Tumorstammzellen die Expression von Genen und Transkriptionsfaktoren, welche an der Reduktion von oxidativem Stress in der Zelle beteiligt sind, deutlich erhöht. Z. B. ist die Genexpression der Glutathionsynthase (GSH-S) und der Glutamatcysteinylgase (GCL) in Tumorstammzellen signifikant erhöht. Diese Enzyme sind maßgeblich an der Synthese von Glutathion beteiligt, einem wichtigen zellulären Reduktionsmittel und Antioxidans. Weiter zeigen die Tumorstammzellen eine Überexpression des Transkriptionsfaktors FoxO1 [157], welcher in Stammzellen als wichtiger Regulator von oxidativem Stress gilt [158]. Da Tumorstammzellen bessere Kompensationsmechanismen von oxidativem Stress besitzen, könnte man davon ausgehen, dass ihr Zellmetabolismus und Wachstum in einer Situation, in der übermäßig viel reaktive Sauerstoffspezies vorhanden sind, weniger beeinträchtigt wird als in Nicht-Tumorstammzellen, bzw. dass Tumorstammzellen dadurch gegenüber Nicht-Tumorstammzellen einen Überlebensvorteil haben und somit stärker proliferieren können.

4.4.2.2. NF- κ B

Da NF- κ B sensitiv auf Oxidantien reagiert, erfolgt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors unmittelbar durch die vermehrt vorliegenden reaktiven Sauerstoffspezies [155]. Es konnte gezeigt werden, dass in Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms der NF- κ B-Signaltransduktionsweg ca. 2.5-fach so stark ausgeprägt ist wie in Nicht-Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms [159]. Außerdem spielt der Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Tumorstammzeleigenschaften im Pankreaskarzinom. Eine Inhibierung von NF- κ B führt z. B. zum Verlust der Fähigkeit Klone zu bilden oder Sphäroide zu formen [160]. Auch in Tumorstammzellen des Prostata- [161] und Mammakarzinoms [162] ist die Aktivität des NF- κ B höher als in regulären Karzinomzellen und eine Behandlung mit Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), einem spezifischen Inhibitor des NF- κ B, hemmt das Wachstum von Tumorstammzellen [162].

4.4.2.3. Zytokine

In Tumorstammzellen des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich (engl., head and neck squamous cell carcinoma/ HNSCC) stimuliert IL-6 das Wachstum, das Selbsterneuerungspotential und die Expression von Tumorstammzell-assoziierten Oberflächenproteinen. Eine Blockierung des IL-6-Rezeptors und Aufhebung des Zytokin-vermittelten Effekts führt zu gegenteiligen Effekten [163]. Auch im Glioblastom [164] und Mammakarzinom [165] ist der fördernde Einfluss von IL-6 auf Tumorstammzellen beschrieben. Des Weiteren spielen auch IL-8 und TNF-alpha eine wichtige Rolle beim Wachstum und Erhalt der Stammzeleigenschaften [166,167].

Die oben angeführten Studien zeigen, dass NF-kB, IL6, IL8 oder TNF-alpha wichtige Einflussfaktoren im Metabolismus von Tumorstammzellen sind. Sie leisten einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften von Karzinomzellen bzw. fördern diese Eigenschaften. Eine Inhibierung dieser Faktoren ist mit dem verminderten Wachstum von Tumorstammzellen bzw. dem Verlust von Tumorstammzell-spezifischen Eigenschaften verbunden. Vor dem Hintergrund, dass in dem von uns verwendeten Pankreatitis-Modell mittels Cerulein diese Mediatoren stark erhöht sind, könnte man davon ausgehen, dass dies zur Stimulation von Tumorstammzellen führt, was ein Erklärungsansatz für eine erhöhte Anzahl an CD133⁺ Zellen wäre. Dem gegenüber steht der geringe Einfluss der Cerulein-induzierten Pankreatitis auf die Anzahl an ALDH1a1⁺ Zellen in unseren Versuchen. Zusammenfassend können wir sagen, dass ein fördernder Einfluss einer Cerulein-induzierten Pankreatitis sehr wahrscheinlich ist, wir aber aufgrund unserer heterogenen Ergebnisse diesen Effekt aktuell nicht bestätigen können.

4.5. Einfluss von Gemcitabin auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment

4.5.1. Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von ALDH1a1

Um den Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von ALDH1a1 zu evaluieren, wurden die Karzinomzellen gegenüber diesem Chemotherapeutikum exponiert. Durch eine langfristige Exposition konnten von der Zelllinie 6606PDA die 1 µM Gemcitabin-resistenten Klone A11, F8 und F11 selektiert werden. Diese Klone exprimierten trotz ihrer Resistenz gegenüber

dem Chemotherapeutikum nicht mehr ALDH1a1 oder ALDH1a3 als die Zelllinie 6606PDA (Abbildung 11 A, B, C). Auch eine kurzzeitige Exposition der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606liver gegenüber 0,1 μ M Gemcitabin über 24 h führte zu keiner signifikant vermehrten Expression der Aldehyd-Dehydrogenasen (Abbildung 12 A, B, C). Der Einfluss von Gemcitabin auf die Gen-Expression von ALDH1a1 im Pankreaskarzinom wurde bislang in einigen präklinischen Studien sowohl in vivo als auch in vitro untersucht [168–171]. Hier konnte gezeigt werden, dass durch eine längerfristige Selektion der Pankreastumorzellen eine vermehrte Gen-Expression von ALDH1a1 induziert wird [168]. Eine kurzzeitige Stimulation der Tumorzellen mit Gemcitabin wurde in den Studien nicht untersucht. Hinsichtlich der Langzeitselektion stehen unsere Beobachtungen im Gegensatz zu den Erkenntnissen anderer Forschungsgruppen, hinsichtlich der Kurzzeitstimulation konnten keine vergleichbaren Studien gefunden werden.

Beim Vergleich verschiedener Karzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass diese unterschiedlich viel ALDH1a1 exprimieren. So exprimiert z. B. die MIAPaCa-2 um ein Vielfaches mehr an ALDH1a1 als die Zelllinien AsPC-1, Capan-1, Colo-357, BxPC-3, HPDE6-C7 oder PANC-1 [168]. Auch in resezierten Pankreaskarzinomen des Menschen konnte festgestellt werden, dass sich die Anzahl an ALDH1a1⁺ Zellen in den verschiedenen Resektaten bis um den Faktor 12,5 unterscheidet [171]. Es könnte der Fall sein, dass es sich bei der 7265PDA, 6606PDA und 6606l um Karzinomzelllinien handelt, deren Expressionsniveau an ALDH1a1 primär sehr gering ist. Verglichen mit der Panc02 exprimieren diese Zelllinien jedoch ähnliche Mengen an ALDH1a1 (Abbildung 8 A).

Abgesehen von der absoluten Menge an ALDH1a1 stand bei unserer Untersuchung jedoch die relative Menge an ALDH1a1 im Vordergrund, welche nach der Exposition zu Gemcitabin exprimiert wurde. Duong et al. konnten durch eine längerfristige Selektion der MIAPaCa-2 über mehrere Wochen und bei kontinuierlich steigenden Konzentrationen bis zu 0,5 μ M Gemcitabin-resistente Klone kultivieren, die deutlich mehr ALDH1a1 exprimierten als die Kontroll-Zelllinie [168]. Die in unseren Versuchen generierten Klone waren zwar bis 1 μ M Gemcitabin resistent, wiesen aber im Vergleich zur 6606PDA keine vermehrte Expression von ALDH1a1 auf. Wir können also davon ausgehen, dass bei der langfristigen Selektion der Karzinomzellen hinsichtlich der Selektionszeit und der Menge an Gemcitabin von uns eine ausreichende Dauer und Konzentration gewählt wurde, um einen messbaren Effekt zu

induzieren. Dennoch stimmen unsere Ergebnisse nicht mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen überein.

Der Effekt, dass Gemcitabin eine vermehrte Expression von ALDH1a1 induziert, konnte auch bei in vivo Versuchen gezeigt werden [169–171]. In einer anderen Studie konnte festgestellt werden, dass nach Resektion und immunhistochemischer Aufarbeitung humaner Pankreaskarzinome die Anzahl an ALDH1a1⁺ Zellen durch eine adjuvante Chemo- oder Radiochemotherapie mit Gemcitabin, im Vergleich zur nicht erfolgten adjuvanten Therapie mit Gemcitabin, signifikant erhöht war [172]. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass die Exposition des Tumors gegenüber Gemcitabin in einem Organismus nicht konstant und gleichmäßig ist und dass andere Faktoren wie z. B. die Perfusion des Tumors und das Mikromileu der Tumorzellen einen erheblichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Karzinomzellen haben können [173]. Somit sind diese in vivo generierten Ergebnisse bzw. klinischen Beobachtungen nicht direkt mit unseren in vitro Daten vergleichbar, unterstreichen aber die Theorie, dass Gemcitabin die Gen-Expression von ALDH1a1 fördert.

4.5.2. Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von CD133

In der Expressionsanalyse von CD133 mittels Western Blot konnte lediglich in der 6606l eine valide Bande für CD133 beobachtet werden. Eine Exposition mit Gemcitabin führte zu einer Abnahme der Expression von ca. 30 %. In den anderen Zelllinien 7265PDA und 6606PDA konnte keine Bande für CD133 detektiert werden. Gemcitabin vermochte auch hier nicht die Expression von CD133 zu induzieren. Auch in den Gemcitabin-resistenten Klonen A11, F8 und F11 konnte keine Expression von CD133 nachgewiesen werden. Unsere Beobachtungen stehen hiermit im Gegensatz zu den Ergebnissen von anderen Forschungsgruppen. Diese konnten eine deutliche Zunahme der Expression von CD133 durch die Exposition der Karzinomzellen gegenüber dem Chemotherapeutikum Gemcitabin beobachten [174–179]. Pan et al. und Dosch et al. waren die einzigen, die durch Gemcitabin-Exposition der Karzinomzellen keine Veränderung der CD133-Expression beobachten konnten [170,180]. Jedoch beschreibt keiner der Autoren eine Abnahme von CD133 wie in unseren Versuchen.

Für den fehlenden Nachweis von CD133 im Western Blot könnte analog zu ALDH1a1 das Karzinomzelllinien-spezifische Expressionsniveau an CD133 sein. So konnte man zeigen, dass

unterschiedliche primäre Karzinome und kultivierte Karzinomzelllinien des Pankreas unterschiedlich viel CD133 exprimieren [175,177,178]. Auch in unseren Analysen konnten wir feststellen, dass die 6606l im Vergleich zu 7265PDA oder 6606PDA deutlich mehr CD133 exprimiert. Dies ist jedoch genauso wie ALDH1a1 keine hinreichende Erklärung für die ausgebliebene Zunahme an CD133 durch die Stimulation mit Gemcitabin. Da in der Niere, welche als Positivkontrolle fungierte, eine Bande für CD133 nachzuweisen war, können wir aber davon ausgehen, dass der Western Blot technisch funktionierte.

Für die kurzzeitige Stimulation wurde von den anderen Forschungsgruppen 0,3-10 μM Gemcitabin über 24-48 h verwendet [175,179]. In der Langzeitstimulation verwendeten diese aber ebenfalls über mehrere Wochen 1 μM Gemcitabin [179]. Die geringere Menge an Gemcitabin von nur 0,1 μM und die mögliche zu kurze Expositionsdauer von 24 h könnte ein Grund für die ausbleibende Mehr-Expression von CD133 in unseren Versuchen sein, in denen die Karzinomzellen nur kurzzeitig gegenüber Gemcitabin exponiert waren. Hinsichtlich der Menge an Gemcitabin im Kulturmedium und der Expositionsdauer der Karzinomzellen in der längerfristigen Selektion sind unsere Methoden jedoch vergleichbar mit den Methoden der anderen Forschungsgruppen. Studien, welche den Einfluss von Gemcitabin auf die Gen-Expression von CD133 in vivo oder im Rahmen von klinischen Studien untersuchen, konnten zum aktuellen Zeitpunkt nicht gefunden werden.

4.5.3. Einfluss von Gemcitabin auf die Expression von GFAP

Saures Gliafaserprotein (engl. Glial fibrillary acidic protein/ GFAP) ist das wichtigste Intermediärfilament in Astrozyten und bildet den Hauptbestandteil ihres Zytoskeletts. Klassischerweise ist GFAP ein Marker für Astrozyten, es ist aber auch bei akuten Schäden des ZNS, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder bei altersbedingten Veränderungen des ZNS erhöht [181]. Des Weiteren gilt GFAP als Marker für neuronale Stamm- und Progenitorzellen [182–184]. Auch bei malignen Erkrankungen des ZNS wie z. B. dem Glioblastoma multiforme konnten Zellen beobachtet werden, die sowohl Eigenschaften von Tumorstammzellen aufweisen als auch überproportional viel GFAP exprimieren. Demzufolge wird GFAP als potentieller Tumorstammzellmarker des Glioblastoms diskutiert [185,186].

Des Weiteren gilt z. B. CD133 wie bei Tumoren des Pankreas als Tumorstammzellmarker beim Glioblastom [187]. Da sich in einigen Karzinomen die Oberflächenproteine zur Identifizierung von Tumorstammzellen überschneiden und nicht auf einzelne Tumorentitäten limitiert sind [188], haben wir GFAP in unsere Versuche mit integriert, um zu evaluieren, ob es sich hierbei möglicherweise um einen neuen Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom handelt. Die drei Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I exprimierten alle drei annähernd gleiche Mengen an GFAP. Die kurzzeitige Stimulation mit 0.1µM Gemcitabin hatte keine Induktion von GFAP zur Folge. Auch die von der 6606PDA abstammenden Klone A11, F8 und F11, welche über mehrere Wochen gegenüber steigenden Konzentrationen an Gemcitabin bis zu 1µM im Kulturmedium exponiert waren, exprimierten nicht mehr GFAP als die 6606PDA. Weiter stellte die immunhistochemische Färbung der Tumore mittels anti-GFAP Antikörper erhebliche Schwierigkeiten dar. Anders als bei den Immunhistochemien mittels anti-ALDH1a1 und anti-CD133 Antikörpern gelang es uns mittels des anti-GFAP Antikörpers nicht, Tumorzellen eindeutig und ausreichend zu färben. Aufgrund dieser technischen Schwierigkeiten und der nicht eindeutigen Identifizierung der Tumorzellen mittels anti-GFAP Antikörper konnten potentielle Tumorstammzellen, welche GFAP exprimierten, quantitativ nicht analysiert werden.

GFAP wurde bis jetzt als Stammzellmarker im Pankreaskarzinom noch nicht beschrieben. Auch konnte bei der Recherche in PubMed keine Studie gefunden werden, die den Einfluss von Gemcitabin auf GFAP⁺ Stammzellen des Glioblastoms untersucht. Der zytostatische und antiproliferative Effekt von Gemcitabin auf Tumorstammzellen des Glioblastoms ist jedoch bekannt [189]. Unter der Annahme, dass GFAP einen potentiellen neuen Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom darstellen könnte, wäre es durchaus plausibel gewesen, einen Effekt von Gemcitabin auf die Expression von GFAP zu beobachten. Ob hierdurch die Expression von GFAP vermehrt oder vermindert bzw. der Anteil an GFAP⁺ Zellen erhöht oder erniedrigt wird, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Unsere Ergebnisse können zum aktuellen Zeitpunkt mit keinen publizierten Daten verglichen werden. Der Zusammenhang zwischen GFAP und Tumorstammzellen des Pankreas bleibt fraglich und es bedürfte weiterer Untersuchungen, um diese Fragestellung zu beantworten.

4.6. Kritische Evaluation der Tumorstammzellhypothese beim Pankreaskarzinom

4.6.1. Tumorstammzellen des Pankreas-Karzinom und die Modelle der Tumorprogression

Im klassischen Sinne gelten Tumorstammzellen als eine definierte zelluläre Untergruppe innerhalb einer Neoplasie, von welcher das Wachstum und die Proliferation des Tumors ausgehen [88]. Das hierarchische Modell, mit Tumorstammzellen an der Spitze der zellulären Hierarchie, ist wohl das erste und prominente Modell, um die Proliferation von Tumorstammzellen zu erklären [88,89]. In seriellen Xenotransplantationsversuchen von humanen Adenokarzinomen des Pankreas konnte gezeigt werden, dass diese Tumore (F0) und ihre Folgegenerationen (bis F7) eine sehr hohe genomische Stabilität aufweisen (analysiert wurden die Gene für KRAS, P53, SMAD4, BRAF und BRCA2, durchschnittlicher Pearson Korrelationskoeffizient von 96%) [190]. Diese Beobachtungen sprechen am ehesten für eine hierarchische Organisation und Progression von Tumorstammzellen im duktalem Adenokarzinom im Pankreas. Dennoch gibt es bis heute keine eindeutige Aussage in der Literatur, welche Tumorstammzellen des Pankreas-Karzinoms einem bestimmten Modell der Tumorprogression zuordnen.

Ebenso konnte man bei Tumorstammzellen auch beobachten, dass diese ebenfalls eine große genomische Heterogenität aufweisen können [92,93]. Hier bietet das stochastische Modell der Tumorprogression, welches besagt, dass der Tumorstammzell-Status durch zufällige, zusätzliche genetische oder epigenetische Veränderungen induziert werden kann, einen Erklärungsversuch [87,88]. Weiter konnte man zeigen, dass aus selektionierten Nicht-Tumorstammzellen in vitro ebenso Tumorstammzellen entstehen konnten [96,97]. Die Tatsache, dass der Tumorstammzellstatus nicht statisch und dauerhaft, sondern ein dynamischer und bidirektionaler Prozess sein kann [95] und Tumorzellen abhängig vom Kontext zwischen einem „Stammzell-“ und „Nicht-Stammzell-Status“ wechseln können [87], ist ebenfalls ein entscheidender Punkt, welcher die klassische Auffassung von Tumorstammzellen, im Sinne einer klar definierten zellulären Untereinheit von Tumoren, in Frage stellt. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte man hinterfragen, ob Tumorstammzellen immer eindeutig zu definieren sind und inwieweit die Bezeichnung „Tumorstammzelle“ nicht eher als ein temporärer, flexibler und induzierbarer Zustand von „regulären Tumorzellen“

verstanden werden kann. Anders als bei der AML, bei der man auf jahrzehntelange Erfahrungen und Ergebnisse zurückblickt und die Progression von Tumorstammstammzellen dem hierarchischen Modell zuordnet [89], kann man anhand des aktuellen Forschungsstandes die Tumorstammstammzellen des duktales Adenokarzinoms momentan keinem eindeutigen Modell der Tumorprogression zuordnen.

4.6.2. Einseitige Darstellung der Datenlage

Im Rahmen der Literaturrecherche bei PubMed für diese Doktorarbeit war auffällig, dass fast alle veröffentlichten Primärstudien postulierten, dass es möglich war, Tumorstammzellen zu isolieren und ihre Überlegenheit gegenüber Nicht-Tumorstammzellen zu demonstrieren. Nur einzelne Studien beschrieben, dass sich Tumorstammzellen im Vergleich zu Nicht-Tumorstammzellen hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften, wie z. B. erhöhter Resistenz gegen Chemotherapeutika, nicht unterschieden [180]. Aufgrund dieser Umstände war es für uns sehr schwierig, unsere Ergebnisse und Beobachtungen mit denen anderer Forschungsgruppen zu vergleichen bzw. unsere Erkenntnisse in den Kontext der aktuellen Datenlage einzuordnen. In der Zusammenschau dieser Situation drängte sich aber auch die Frage auf, inwieweit die Datenlage ein objektives Bild der aktuellen Erkenntnisse über Tumorstammzellen abbildet und ob dieses unter Umständen durch einen Bias verändert sein könnte, wie z. B. dem Publikationsbias.

Der Publikationsbias wird dadurch definiert, dass Publikationen abhängig von der Richtung und Aussagekraft ihrer Ergebnisse veröffentlicht werden [191]. Studien mit positiven und signifikanten Ergebnissen haben eine größere Chance publiziert zu werden, als Studien mit negativen und nicht signifikanten Ergebnissen [192]. Dadurch werden zu veröffentlichen Studien vorselektioniert und ihre Aussage kann sich grundlegend von der von unveröffentlichten Studien unterscheiden [191]. Eine wirksame Maßnahme gegen den Publikationsbias könnte eine zentrale, obligatorische Erfassung aller Studien vor dem Versuchsbeginn und deren erbrachten Primärdaten sein, unabhängig ob diese publiziert werden oder nicht. Dadurch könnten die systematische Verzerrung der Datenlage reduziert und somit ein objektiver aktueller Forschungsstand gewährleistet werden.[193].

4.7. Klinische Relevanz und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie wurde versucht die Frage zu beantworten, ob die Expression von Genen, welche in anderen Modellen mit Eigenschaften von Tumorstammzellen assoziiert sind, auch in diesem syngenem orthotopen Modell des duktales Adenokarzinoms im Pankreas mit Eigenschaften von Tumorstammzellen assoziiert ist. Uns gelang es zwar, die Expression von Tumorstammzell-assoziierten Genen wie ALDH1a1 und CD133 nachzuweisen, dennoch können wir anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht den Schluss ziehen, Tumorstammzellen zweifelsfrei identifiziert zu haben. Dennoch bietet unser syngenes orthotopes Mausmodell mit den drei wenig passagierten Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I ein naturnahes präklinisches Modell, um die Tumorbilogie des duktales Adenokarzinoms im Pankreas besser zu verstehen und insbesondere weitere Erkenntnisse zu strukturellen und funktionellen Eigenschaften über Tumorstammzellen zu erlangen.

Im klinischen Zusammenhang konnte man zeigen, dass Tumorstammzellen immer wichtiger werden. So konnte eine Vielzahl von Studien zeigen, dass die Expression von Tumorstammzell-assoziierten Genen einen erheblichen Einfluss auf die Prognose der Patienten haben kann. Hierzu gibt es Studien z. B. für das Kolorektale Karzinom [194], den Brustkrebs [195], das Ovarial- [196] und Pankreaskarzinom. Die Expression von ALDH beim Pankreaskarzinom reduziert die mittlere Überlebenszeit der Patienten um bis zu 4 Monate [197]. Auch für das Vorhandensein von CD44⁺CD24⁺ Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass es die mittlere Überlebenszeit der Patienten um bis zu 7 Monate verkürzt und dass dies somit einen signifikanten Einfluss auf die Prognose hat [73]. Maeda et al. konnten beobachten, dass die vermehrte Expression von CD133 in der Immunhistochemie mit einer drastisch verminderten 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert war (23,5 vs. 2,1%) [72]. In der Zusammenschau all dieser Erkenntnisse über Tumorstammzellen und ihre Rolle bei Chemoresistenz, Rezidiven und Metastasierung und vor dem Hintergrund der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms, scheint es außerordentlich bedeutsam, mehr über die Eigenheiten von Tumorstammzellen zu erfahren, um diese in Zukunft gezielt therapieren zu können.

Die Expression der Gene von ALDH1a1, CD133 und GFAP ist nicht sehr spezifisch. Die Aldehyd-Dehydrogenasen sind eine Familie von intrazellulären Enzymen, welche Aldehyde zu Carbonsäuren oxidieren und somit zur Detoxifikation der Zelle beitragen [198]. ALDH1a1

ist in unterschiedlichem Gewebe des menschlichen Körpers zu finden, wie z. B. im Gehirn, im Muskel, in der Leber, Lunge oder im Pankreas [199]. CD133, ein transmembranes Glykoprotein, kann ebenfalls in unterschiedlichem Gewebe des Menschen zu finden sein. Hierzu gehören Zellen der Niere, der Leber und des Pankreas [200]. GFAP ist, wie vorhin schon erwähnt, eher spezifisch für Zellen des ZNS [201], ist aber auch in den Sternzellen des Pankreas zu finden [202]. Die Expression dieser Gene ist somit kein spezifisches Identifikationsmerkmal für Tumorstammzellen. Zur strukturellen Identifikation von Tumorstammzellen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Hierzu gehören z. B. das FACS, das MACS oder die Immunhistochemie mittels entsprechender Antikörper. Neben diesen Methoden sollten zur Analyse von Tumorstammzellen zusätzlich funktionelle Tests zur Anwendung kommen, welche Tumorstammzell-assoziierte Eigenschaften überprüfen. Als Goldstandard und als einziges valides Mittel zur Identifikation von Tumorstammzellen gilt hier der serielle Transplantationsassay in einem Tiermodell [71]. Dieser prüft die Fähigkeit der Selbsterneuerung und die Fähigkeit, die zelluläre Heterogenität des ursprünglichen Tumors wiederherzustellen, also die Fähigkeit der symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung von Tumorstammzellen. Eine weitere gut etablierte Methode, um das Selbsterneuerungspotential von Tumorstammzellen in vitro nachzuweisen, ist der sphere-forming assay [203,204]. Aus Gründen der zeitlichen Effizienz bietet es sich an, durch die strukturelle Analyse von Tumorzellen in einem ersten Schritt potentielle Tumorstammzellen zu selektionieren und deren funktionelle Eigenschaften dann in einem zweiten Schritt durch die eben genannten Methoden zu verifizieren. Selbst wenn wir in unseren Versuchen den Einfluss von Diabetes, Pankreatitis und Gemcitabin auf das Tumorstammzellkompartiment des duktales Adenokarzinoms im Pankreas untersucht haben, ist es in zukünftigen Versuchen notwendig, durch weitere Tests den funktionellen Tumorstammzell-Status bzw. das Selbsterneuerungspotential zu überprüfen, um valide Rückschlüsse aus diesen Ergebnissen zu ziehen.

Anhang

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten AK in der Histologie.

AG	Prim. Ak	Sek. AK
Aldh1a1 in Paraffin	monoklonaler Kaninchen anti-Maus (Cell Signaling Technology #12035, Verdünnung 1:800, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)	polyklonaler Ziege anti-Kaninchen-HRP (Dako P0448, Verdünnung 1:100, Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)
GFAP in Paraffin	polyklonaler Ziege anti-GFAP (ab53554, Verdünnung 1:800, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)	Esel anti-Ziege-IgG-HRP (sc-2020, Verdünnung 1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland)
CD133 in Paraffin	Ratte anti-Maus CD133 (14-1331, Verdünnung 1:200, eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland)	Ziege anti-Ratte IgG HRP (sc-2006, Verdünnung 1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc.)
CD133 in Cryo	anti-Maus CD133 (Verdünnung 1:200, mit großzügiger Unterstützung von Denis Corbeil, Dresden, Deutschland)	Esel anti-Ratte IgG HRP (ab102265, Verdünnung 1:100, Abcam)

Tabelle 3: Zusammensetzung des Lysispuffers.

Substanz	Konzentration	Menge
Tris pH7,5 [μ l] (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1 M	100
NaCl [μ l] (Carl Roth GmbH & Co. KG)	5M	20
EDTA [μ l] (Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland)	250mM	4
Triton-X-100 [μ l] (Carl Roth GmbH & Co. KG)	10%	500
NaN ₃ [μ l] (Carl Roth GmbH & Co. KG)	4%	50
PMSF [μ l] (Carl Roth GmbH & Co. KG)	100mM	200
Protease Inhibitor Cocktail [μ l] (P8340, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)		100
H ₂ O [ml]		9,026

Tabelle 4: Zusammensetzung eines Trenngels.

Substanz	Konzentration	8%*	10%*	12%*
H2O [ml]	/	1,675	1,375	1,025
Tris pH 8,8 [ml] (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1M	1,875	1,875	1,875
Acrylamid [ml] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	30%	1,35	1,65	2,00
SDS [μl] (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	10%	50	50	50
APS [μl] (SERVA Electrophoresis GmbH)	10%	50	50	50
TEMED [μl] (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)	1%	5	5	5

Tabelle 5: Zusammensetzung eines Sammelgels.

Substanz	Konzentration	5%*
H2O [ml]	/	1,0375
Tris pH 6,8 [ml] (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	1M	0,1875
Acrylamid [ml] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	30%	0,25
SDS [μl] (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)	10%	12,5
APS [μl] (SERVA Electrophoresis GmbH)	10%	12,5
TEMED [μl] (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)	1%	1,25

*Acrylamidkonzentration

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper im Western Blot.

Antigen	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
ALDH1a1	Kaninchen anti-Maus (Cell Signaling Technology, #12035, Verdünnung 1:1000, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland)	Ziege anti-Maus, HRP (Cell Signaling Technology, #7074, Verdünnung 1:10000, New England Biolabs GmbH)
GFAP	Ziege anti-GFAP (ab53554, Verdünnung 1:2000, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich)	Esel anti-Ziege, HRP (sc-2020, Verdünnung 1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland)
CD133	Ratte anti-Maus CD133 (14-1331, Verdünnung 1:500, eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland)	Ziege anti-Ratte, HRP (sc-3823, Verdünnung 1:10000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland)
CD133 (Corbeil)	anti-Maus CD133 (Verdünnung 1:1000, mit großzügiger Unterstützung von Denis Corbeil, Dresden, Deutschland)	Ziege anti-Ratte, HRP (sc-3823, Verdünnung 1:10000, Santa Cruz Biotechnology Inc.)
β-Aktin	Maus anti-β-Aktin (Clone AC-74, A2228, Verdünnung 1:20000, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	Kaninchen anti-Maus (A9044, Verdünnung 1:60000, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Modelle der Tumorprogression	12
Abbildung 2: Anordnung der Interventionen in den in vivo Experimenten.	19
Abbildung 3: Evaluation der Qualität unterschiedlicher Antikörper.	32
Abbildung 4: Eigenschaften der Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I in vivo.	36
Abbildung 5: Histomorphologische Eigenschaften der Zelllinien.	39
Abbildung 6: Immunhistochemische Analyse von Pankreaskarzinomen	41
Abbildung 7: Quantitative Analyse des Stammzellkompartiments der Tumore.	42
Abbildung 8: Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP der Zelllinien im Vergleich.....	44
Abbildung 9: Einfluss von Diabetes und Pankreatitis auf das Stammzellkompartiment der Tumore.....	46
Abbildung 10: Einfluss der Glukosekonzentration auf die ALDH1 Expression.....	48
Abbildung 11: Selektion durch Gemcitabin erhöht nicht die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP.....	50
Abbildung 12: Kurzzeitstimulation mit Gemcitabin hat keinen Einfluss auf die Expression von ALDH1a1, CD133 und GFAP.....	53
Tabelle 1: Oberflächenproteine zur Identifikation von Tumorstammzellen im Pankreas.....	15
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten AK in der Histologie.....	75
Tabelle 3: Zusammensetzung des Lysispuffers.	76
Tabelle 4: Zusammensetzung eines Trenngels.	77
Tabelle 5: Zusammensetzung eines Sammelgels.....	77
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper im Western Blot.	78
Tabelle 7: Analyse des Blutbildes.	34

Literaturverzeichnis

1. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets by Population. URL: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. Fact Sheets by Population.
2. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland 2011/2012. URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile.
3. Zentrum Für Krebsregisterdaten. Krebs - Bauchspeicheldrüsenkrebs. URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html;jsessionid=F6432049EB9B08E8B12EFDB1D1826BC3.2_cid298. Krebs - Bauchspeicheldrüsenkrebs.
4. Capella C, Albarello L, Capelli P, Sessa F, Zamboni G. Carcinoma of the exocrine pancreas: The histology report. *Dig. Liver Dis.* 2011; 43:282–92.
5. World Health Organization. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. URL: <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb2/BB2.pdf>. untitled - BB2.pdf.
6. Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20:11182–98.
7. Liao W-C, Tu Y-K, Wu M-S, Lin J-T, Wang H-P, Chien K-L. Blood glucose concentration and risk of pancreatic cancer: systematic review and dose-response meta-analysis. *BMJ* 2015; 349:g7371.
8. Stolzenberg-Solomon RZ, Graubard BI, Chari S, Limburg P, Taylor PR, Virtamo J, et al. Insulin, glucose, insulin resistance, and pancreatic cancer in male smokers. *JAMA* 2005; 294:2872–8.
9. Li D, Yeung S-CJ, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 137:482–8.
10. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;

357:539–45.

11. Thun MJ, Henley SJ, Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found. Symp.* 2004; 256:6-21-8, 49–52, 266–9.
12. Hirota M, Shimosegawa T, Masamune A, Kikuta K, Kume K, Hamada S, et al. The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. *Pancreatology* 12:79–84.
13. Yadav D, Timmons L, Benson JT, Dierkhising RA, Chari ST. Incidence, prevalence, and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.* 2011; 106:2192–9.
14. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic cancer: an update. *Dig. Dis.* 2010; 28:645–56.
15. Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2010; 24:349–58.
16. Al Saati T, Clerc P, Hanoun N, Peugeot S, Lulka H, Gigoux V, et al. Oxidative stress induced by inactivation of TP53INP1 cooperates with KrasG12D to initiate and promote pancreatic carcinogenesis in the murine pancreas. *Am. J. Pathol.* 2013; 182:1996–2004.
17. Daniluk J, Liu Y, Deng D, Chu J, Huang H, Gaiser S, et al. An NF- κ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J. Clin. Invest.* 2012; 122:1519–28.
18. Hruban RH, Fukushima N. Pancreatic adenocarcinoma: update on the surgical pathology of carcinomas of ductal origin and PanINs. *Mod. Pathol.* 2007; 20 Suppl 1:S61-70.
19. Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JFF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2011; 377:31–41.

20. Bradley MC, Hughes CM, Cantwell MM, Napolitano G, Murray LJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pancreatic cancer risk: a nested case-control study. *Br. J. Cancer* 2010; 102:1415–21.
21. Schmidt-Hansen M, Berendse S, Hamilton W. Symptoms of Pancreatic Cancer in Primary Care: A Systematic Review. *Pancreas* 2015; 0:1–5.
22. Stapley S, Peters TJ, Neal RD, Rose PW, Walter FM, Hamilton W. The risk of pancreatic cancer in symptomatic patients in primary care: a large case-control study using electronic records. *Br. J. Cancer* 2012; 106:1940–4.
23. Conrad C, Fernández-Del Castillo C. Preoperative evaluation and management of the pancreatic head mass. *J. Surg. Oncol.* 2013; 107:23–32.
24. Karlson BM, Ekblom A, Lindgren PG, Kallskog V, Rastad J. Abdominal US for diagnosis of pancreatic tumor: prospective cohort analysis. *Radiology* 1999; 213:107–11.
25. Driedger MR, Dixon E, Mohamed R, Sutherland FR, Bathe OF, Ball CG. The diagnostic pathway for solid pancreatic neoplasms: Are we applying too many tests? *J. Surg. Res.* 2015; 199:39–43.
26. Schima W, Ba-Ssalamah A, Kölblinger C, Kulinna-Cosentini C, Poespoek A, Götzinger P. Pancreatic adenocarcinoma. *Eur. Radiol.* 2007; 17:638–49.
27. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet* 2016;388:73-85.
28. Bipat S, Phoa SSKS, van Delden OM, Bossuyt PMM, Gouma DJ, Laméris JS, et al. Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 29:438–45.
29. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom. Langversion 1.0, 2013, AWMF Registernummer: 032-0100L; URL: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
30. Lee ES, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: a state-of-the-art review.

- World J. Gastroenterol. 2014; 20:7864–77.
31. Ansari N Al, Ramalho M, Semelka RC, Buonocore V, Gigli S, Maccioni F. Role of magnetic resonance imaging in the detection and characterization of solid pancreatic nodules: An update. *World J. Radiol.* 2015; 7:361–74.
 32. Raman SP, Horton KM, Fishman EK. Multimodality imaging of pancreatic cancer-computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Cancer J.* 18:511–22.
 33. Tang M-Y, Zhang X-M, Chen T-W, Huang X-H. Various diffusion magnetic resonance imaging techniques for pancreatic cancer. *World J. Radiol.* 2015; 7:424–37.
 34. De Robertis R, Tinazzi Martini P, Demozzi E, Dal Corso F, Bassi C, Pederzoli P, et al. Diffusion-weighted imaging of pancreatic cancer. *World J. Radiol.* 2015; 7:319–28.
 35. Sandrasegaran K, Lin C, Akisik FM, Tann M. State-of-the-art pancreatic MRI. *American Roentgen Ray Society [Internet]. AJR. Am. J. Roentgenol.* 2010; 195:42–53.
 36. Wang X-Y, Yang F, Jin C, Fu D-L. Utility of PET/CT in diagnosis, staging, assessment of resectability and metabolic response of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20:15580–9.
 37. Rijkers AP, Valkema R, Duivenvoorden HJ, van Eijck CHJ. Usefulness of F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography to confirm suspected pancreatic cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2014; 40:794–804.
 38. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br. J. Surg.* 2004; 91:586–94.
 39. Doi R, Imamura M, Hosotani R, Imaizumi T, Hatori T, Takasaki K, et al. Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial. *Surg. Today* 2008; 38:1021–8.
 40. Callery MP, Chang KJ, Fishman EK, Talamonti MS, William Traverso L, Linehan DC. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer:

- expert consensus statement. *Ann. Surg. Oncol.* 2009; 16:1727–33.
41. Diener MK, Knaebel H-P, Heukaufer C, Antes G, Büchler MW, Seiler CM. A systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus classical pancreaticoduodenectomy for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. *Ann. Surg.* 2007; 245:187–200.
 42. Gebhardt C, Meyer W, Jurowich C. Is resection of left-sided ductal pancreatic carcinoma of value?. *Zentralblatt für Chir.* 2000; 125:966–9.
 43. Brennan MF, Moccia RD, Klimstra D. Management of adenocarcinoma of the body and tail of the pancreas. *Ann. Surg.* 1996; 223:506-11-2.
 44. Silvestris N, Longo V, Cellini F, Reni M, Bittoni A, Cataldo I, et al. Neoadjuvant multimodal treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2015; 98:309–24.
 45. Heinrich S, Schäfer M, Weber A, Hany TF, Bhure U, Pestalozzi BC, et al. Neoadjuvant chemotherapy generates a significant tumor response in resectable pancreatic cancer without increasing morbidity: results of a prospective phase II trial. *Ann. Surg.* 2008; 248:1014–22.
 46. Palmer DH, Stocken DD, Hewitt H, Markham CE, Hassan AB, Johnson PJ, et al. A randomized phase 2 trial of neoadjuvant chemotherapy in resectable pancreatic cancer: gemcitabine alone versus gemcitabine combined with cisplatin. *Ann. Surg. Oncol.* 2007; 14:2088–96.
 47. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. 2007; 297:267–77.
 48. Stocken DD, Büchler MW, Dervenis C, Bassi C, Jeekel H, Klinkenbijn JHG, et al. Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 2005; 92:1372–81.
 49. Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected

- pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br. J. Cancer* 2009; 101:908–15.
50. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, et al. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:1200–10.
 51. Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, et al. Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. 2010; 304:1073–81.
 52. Mallinson CN, Rake MO, Cocking JB, Fox CA, Cwynarski MT, Diffey BL, et al. Chemotherapy in pancreatic cancer: results of a controlled, prospective, randomised, multicentre trial. *Br. Med. J.* 1980; 281:1589–91.
 53. Palmer KR, Kerr M, Knowles G, Cull A, Carter DC, Leonard RC. Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *Br. J. Surg.* 1994; 81:882–5.
 54. Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15:2403–13.
 55. Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, Gebbia V, Cartenì G, Massidda B, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28:1645–51.
 56. Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Bajetta E, Schüller J, et al. Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25:2212–7.
 57. Poplin E, Feng Y, Berlin J, Rothenberg ML, Hochster H, Mitchell E, et al. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate

- infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27:3778–85.
58. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. 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.* 2007; 25:1960–6.
 59. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364:1817–25.
 60. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369:1691–703.
 61. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Büschenfelde C, Friess H, Kleeff J. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages. *PLoS Med.* 2010; 7:e1000267.
 62. Barbier L, Turrini O, Grégoire E, Viret F, Le Treut Y-P, Delpero J-R. Pancreatic head resectable adenocarcinoma: preoperative chemoradiation improves local control but does not affect survival. *HPB* 2011; 13:64–9.
 63. Assifi MM, Lu X, Eibl G, Reber HA, Li G, Hines OJ. Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: A meta-analysis of phase II trials. *Surgery* 2011; 150:466–73.
 64. Brunner TB, Grabenbauer GG, Meyer T, Golcher H, Sauer R, Hohenberger W. Primary resection versus neoadjuvant chemoradiation followed by resection for locally resectable or potentially resectable pancreatic carcinoma without distant metastasis. A multi-centre prospectively randomised phase II-study of the Interdisciplinary Wor. *BMC Cancer* 2007; 7:41.
 65. Kalsner MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch. Surg.* 1985; 120:899–903.

66. Morganti AG, Falconi M, van Stiphout RGPM, Mattiucci G-C, Alfieri S, Calvo FA, et al. Multi-institutional pooled analysis on adjuvant chemoradiation in pancreatic cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2014; 90:911–7.
67. Van Laethem J-L, Hammel P, Mornex F, Azria D, Van Tienhoven G, Vergauwe P, et al. Adjuvant gemcitabine alone versus gemcitabine-based chemoradiotherapy after curative resection for pancreatic cancer: a randomized EORTC-40013-22012/FFCD-9203/GERCOR phase II study. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28:4450–6.
68. Timke C, Debus JP. The role of radiation therapy in treatment of pancreatic cancer from the viewpoint of radio-oncologists. *Radiologe* 2009; 49:149–53.
69. Rasheed ZA, Matsui W. Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 27 Suppl 2:15–8.
70. Islam F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in Cancer recurrence and cancer treatment. *Exp. Cell Res.* 2015; 335:135–47.
71. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66:9339–44.
72. Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, et al. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 2008; 98:1389–97.
73. Ohara Y, Oda T, Sugano M, Hashimoto S, Enomoto T, Yamada K, et al. Histological and prognostic importance of CD44(+) /CD24(+) /EpCAM(+) expression in clinical pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 2013; 104:1127–34.
74. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26:2806–12.
75. Hong SP, Wen J, Bang S, Park S, Song SY. CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Int. J. cancer* 2009; 125:2323–31.

76. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1:313–23.
77. Li C, Wu J-J, Hynes M, Dosch J, Sarkar B, Welling TH, et al. c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology* 2011; 141:2218–2227.e5.
78. Jackson EB, Brues AM. Studies on a Transplantable Embryoma of the Mouse. *Cancer Res.* 1941; 1:494–8.
79. Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 1964; 24:1544–51.
80. Koretzky GA. The legacy of the Philadelphia chromosome. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:2030–2.
81. Tough IM, Jacobs PA, Court Brown WM, Baikie AG, Williamson ER. Cytogenetic studies on bone-marrow in chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 1963; 1:844–6.
82. Whang J, Frei E, Tjio JH, Carbone PP, Brecher G. The distribution of the Philadelphia chromosome in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1963; 22:664–73.
83. Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1967; 58:1468–71.
84. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 1997; 3:730–7.
85. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 1991; 77:1218–27.
86. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367:645–8.
87. Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin.*

- Cancer Biol. 2010; 20:85–92.
88. Nguyen L V, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat. Rev. Cancer* 2012; 12:133–43.
 89. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112:4793–807.
 90. Losi L, Baisse B, Bouzourene H, Benhattar J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* 2005; 26:916–22.
 91. Torres L, Ribeiro FR, Pandis N, Andersen JA, Heim S, Teixeira MR. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Res. Treat.* 2007; 102:143–55.
 92. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature* 2011; 469:356–61.
 93. Clappier E, Gerby B, Sigaux F, Delord M, Touzri F, Hernandez L, et al. Clonal selection in xenografted human T cell acute lymphoblastic leukemia recapitulates gain of malignancy at relapse. *J. Exp. Med.* 2011; 208:653–61.
 94. Notta F, Mullighan CG, Wang JCY, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* 2011; 469:362–7.
 95. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* 2014; 14:275–91.
 96. Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108:7950–5.
 97. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011; 146:633–44.
 98. Chaffer CL, Marjanovic ND, Lee T, Bell G, Kleer CG, Reinhardt F, et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances

- tumorigenicity. *Cell* 2013; 154:61–74.
99. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, Nebelsiek T, Göktuna SI, Ziegler PK, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* 2013; 152:25–38.
 100. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003; 100:3983–8.
 101. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67:1030–7.
 102. Kim MP, Fleming JB, Wang H, Abbruzzese JL, Choi W, Kopetz S, et al. ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* 2011; 6:e20636.
 103. Zhan H, Xu J, Wu D, Zhang T, Hu S. Pancreatic cancer stem cells: new insight into a stubborn disease. *Cancer Lett.* 2015; 357:429–37.
 104. Fitzgerald TL, McCubrey JA. Pancreatic cancer stem cells: association with cell surface markers, prognosis, resistance, metastasis and treatment. *Adv. Biol. Regul.* 2014; 56:45–50.
 105. Radecke T. Einfluss von Inflammation und Diabetes auf die Pathophysiologie des duktales Adenokarzinoms des Pankreas. 2015; Ina. zur Erlangung des Akad. Grades Dr. der Medizin der Medizinischen Fak. der Univ. Rostock.
 106. Estimating tumour volume in a primary orthotopic mouse model of human pancreatic cancer using rapid acquisition magnetic resonance imaging - 2097224397.pdf.
 107. Hall WA, Mikell JL, Mittal P, Colbert L, Prabhu RS, Kooby DA, et al. Tumor size on abdominal MRI versus pathologic specimen in resected pancreatic adenocarcinoma: implications for radiation treatment planning. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2013; 86:102–7.
 108. Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the

- human and the mouse pancreas. *Islets* 2015; 7:e1024405.
109. Noterdaeme O, Gleeson F, Phillips RR, Brady M. Quantification of missing and overlapping data in multiple breath hold abdominal imaging. *Eur. J. Radiol.* 2007; 64:273–8.
 110. Velazquez ER, Parmar C, Jermoumi M, Mak RH, van Baardwijk A, Fennessy FM, et al. Volumetric CT-based segmentation of NSCLC using 3D-Slicer. *Sci. Rep.* 2013; 3:3529.
 111. Egger J, Kapur T, Nimsky C, Kikinis R. Pituitary adenoma volumetry with 3D Slicer. *PLoS One* 2012; 7:e51788.
 112. Egger J, Kapur T, Fedorov A, Pieper S, Miller J V, Veeraraghavan H, et al. GBM volumetry using the 3D Slicer medical image computing platform. *Sci. Rep.* 2013; 3:1364.
 113. Koo V, Hamilton PW, Williamson K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cell. Oncol.* 2006; 28:127–39.
 114. Legrand L, Duchatelle V, Molinié V, Boulay-Coletta I, Sibileau E, Zins M. Pancreatic adenocarcinoma: MRI conspicuity and pathologic correlations. *Abdom. Imaging* 2015; 40:85–94.
 115. Yao X-Z, Kuang T, Wu L, Feng H, Liu H, Cheng W-Z, et al. Comparison of diffusion-weighted MRI acquisition techniques for normal pancreas at 3.0 Tesla. *Diagn. Interv. Radiol.* 20:368–73.
 116. Mei L, Du W, Ma WW. Targeting stromal microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: controversies and promises. *AME Publications [Internet]. J. Gastrointest. Oncol.* 2016; 7:487–94.
 117. Apte M V, Park S, Phillips PA, Santucci N, Goldstein D, Kumar RK, et al. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 2004; 29:179–87.
 118. Vonlaufen A, Joshi S, Qu C, Phillips PA, Xu Z, Parker NR, et al. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2008; 68:2085–93.

119. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res.* 2008; 68:918–26.
120. Schreiber FS, Deramaudt TB, Brunner TB, Boretti MI, Gooch KJ, Stoffers DA, et al. Successful growth and characterization of mouse pancreatic ductal cells: functional properties of the Ki-RAS(G12V) oncogene. *Gastroenterology* 2004; 127:250–60.
121. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003; 4:437–50.
122. Zechner D, Bürtin F, Amme J, Lindner T, Radecke T, Hadlich S, et al. Characterization of novel carcinoma cell lines for the analysis of therapeutical strategies fighting pancreatic cancer. *Cell Biosci.* 2015; 5.
123. Colvin EK, Scarlett CJ. A historical perspective of pancreatic cancer mouse models. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014; 27:96–105.
124. Inman KS, Francis AA, Murray NR. Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20:11160–81.
125. Qiu W, Su GH. Challenges and advances in mouse modeling for human pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32:83–107.
126. Deer EL, González-Hernández J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, et al. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 2010; 39:425–35.
127. Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. cancer* 1975; 15:741–7.
128. Roden M. Diabetes mellitus: Definition, classification and diagnosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2012; 124 Suppl:1–3.
129. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad. Med. J.* 2016; 92:63–9.

130. Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr. Diabetes Rev.* 2014; 10:131–45.
131. Bobrowski A, Spitzner M, Bethge S, Mueller-Graf F, Vollmar B, Zechner D. Risk factors for pancreatic ductal adenocarcinoma specifically stimulate pancreatic duct glands in mice. *Am. J. Pathol.* 2013; 182:965–74.
132. Hadarits O, Zóka A, Barna G, Al-Aissa Z, Rosta K, Rigó J, et al. Increased Proportion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Population in Cord Blood of Neonates Born to Mothers with Gestational Diabetes Mellitus. *Stem Cells Dev.* 2016; 25:13–7.
133. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006; 7:85–96.
134. Farhana L, Dawson MI, Murshed F, Das JK, Rishi AK, Fontana JA. Upregulation of miR-150* and miR-630 induces apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting IGF-1R. *PLoS One* 2013; 8:e61015.
135. Urtasun N, Vidal-Pla A, Pérez-Torras S, Mazo A. Human pancreatic cancer stem cells are sensitive to dual inhibition of IGF-IR and ErbB receptors. *BMC Cancer* 2015; 15:223.
136. Malaguarnera R, Belfiore A. The emerging role of insulin and insulin-like growth factor signaling in cancer stem cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2014; 5:10.
137. Chang W-W, Lin R-J, Yu J, Chang W-Y, Fu C-H, Lai A, et al. The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. *Breast Cancer Res.* 2013; 15:R39.
138. Xu C, Xie D, Yu S-C, Yang X-J, He L-R, Yang J, et al. β -Catenin/POU5F1/SOX2 transcription factor complex mediates IGF-I receptor signaling and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2013; 73:3181–9.
139. Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009; 69:1951–7.

140. Otto AM. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab.* 2016; 4:5.
141. Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Fujimoto M, Mori S, Oka M, et al. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int. J. Oncol.* 2007; 30:849–55.
142. Liu P-P, Liao J, Tang Z-J, Wu W-J, Yang J, Zeng Z-L, et al. Metabolic regulation of cancer cell side population by glucose through activation of the Akt pathway. *Cell Death Differ.* 2014; 21:124–35.
143. Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M, et al. Metabolic alterations in highly tumorigenic glioblastoma cells: preference for hypoxia and high dependency on glycolysis. *J. Biol. Chem.* 2011; 286:32843–53.
144. Shibuya K, Okada M, Suzuki S, Seino M, Seino S, Takeda H, et al. Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* 2015; 6:651–61.
145. Liu Y, Cao Y, Zhang W, Bergmeier S, Qian Y, Akbar H, et al. A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 2012; 11:1672–82.
146. Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind J-FH, Kunjithapatham R, Buijs M, Vossen JA, Tchernyshyov I, et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is pyruvylated during 3-bromopyruvate mediated cancer cell death. *Anticancer Res.* 2009; 29:4909–18.
147. Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett.* 2001; 173:83–91.
148. Isayev O, Rausch V, Bauer N, Liu L, Fan P, Zhang Y, et al. Inhibition of glucose turnover by 3-bromopyruvate counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to gemcitabine. *Oncotarget* 2014; 5:5177–89.

149. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol. Cancer Res.* 2009; 7:330–8.
150. Micucci C, Orciari S, Catalano A. Hyperglycemia promotes K-Ras-induced lung tumorigenesis through BASCs amplification. *PLoS One* 2014; 9:e105550.
151. Mohammed A, Janakiram NB, Madka V, Brewer M, Ritchie RL, Lightfoot S, et al. Targeting pancreatitis blocks tumor-initiating stem cells and pancreatic cancer progression. *Oncotarget* 2015; 6:15524–39.
152. Neuschwander-Tetri BA, Burton FR, Presti ME, Britton RS, Janney CG, Garvin PR, et al. Repetitive self-limited acute pancreatitis induces pancreatic fibrogenesis in the mouse. *Dig. Dis. Sci.* 2000; 45:665–74.
153. Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sandler M, Lerch MM. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4:26.
154. Yu JH, Kim H. Oxidative stress and inflammatory signaling in cerulein pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20:17324–9.
155. Kim H. Cerulein pancreatitis: oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Gut Liver* 2008; 2:74–80.
156. Naka K, Muraguchi T, Hoshii T, Hirao A. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* 2008; 10:1883–94.
157. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009; 458:780–3.
158. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128:325–39.
159. Banerjee S, Nomura A, Sangwan V, Chugh R, Dudeja V, Vickers SM, et al. CD133+

- tumor initiating cells in a syngenic murine model of pancreatic cancer respond to Minnelide. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20:2388–99.
160. Sun L, Mathews LA, Cabarcas SM, Zhang X, Yang A, Zhang Y, et al. Epigenetic regulation of SOX9 by the NF- κ B signaling pathway in pancreatic cancer stem cells. *Stem Cells* 2013; 31:1454–66.
 161. Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, Socci ND, Scher HI. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF- κ B signalling. *Nat. Commun.* 2011; 2:162.
 162. Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, Isagawa T, Tsuji S, Kobayashi S, et al. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br. J. Cancer* 2010; 102:206–12.
 163. Ukaji T, Umezawa K. Novel approaches to target NF- κ B and other signaling pathways in cancer stem cells. *Adv. Biol. Regul.* 2014; 56:108–15.
 164. Wang H, Lathia JD, Wu Q, Wang J, Li Z, Heddleston JM, et al. Targeting interleukin 6 signaling suppresses glioma stem cell survival and tumor growth. *Stem Cells* 2009; 27:2393–404.
 165. Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3988–4002.
 166. Infanger DW, Cho Y, Lopez BS, Mohanan S, Liu SC, Gursel D, et al. Glioblastoma stem cells are regulated by interleukin-8 signaling in a tumoral perivascular niche. *Cancer Res.* 2013; 73:7079–89.
 167. Gallipoli P, Pellicano F, Morrison H, Laidlaw K, Allan EK, Bhatia R, et al. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood* 2013; 122:3335–9.
 168. Duong H-Q, Hwang JS, Kim HJ, Kang HJ, Seong Y-S, Bae I. Aldehyde dehydrogenase 1A1 confers intrinsic and acquired resistance to gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma MIA PaCa-2 cells. *Int. J. Oncol.* 2012; 41:855–61.

169. Jimeno A, Feldmann G, Suárez-Gauthier A, Rasheed Z, Solomon A, Zou G-M, et al. A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8:310–4.
170. Pan Y, Gao S, Hua Y-Q, Liu L-M. Establishment of a pancreatic cancer stem cell model using the SW1990 human pancreatic cancer cell line in nude mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015; 16:437–42.
171. Yabuuchi S, Pai SG, Campbell NR, de Wilde RF, De Oliveira E, Korangath P, et al. Notch signaling pathway targeted therapy suppresses tumor progression and metastatic spread in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2013; 335:41–51.
172. Kim SK, Kim H, Lee D-H, Kim T, Kim T, Chung C, et al. Reversing the intractable nature of pancreatic cancer by selectively targeting ALDH-high, therapy-resistant cancer cells. *PLoS One* 2013; 8:e78130.
173. Zhang X, Nie D, Chakrabarty S. Growth factors in tumor microenvironment. *Front. Biosci.* 2010; 15:151–65.
174. Hayashi T, Ding Q, Kuwahata T, Maeda K, Miyazaki Y, Matsubara S, et al. Interferon-alpha modulates the chemosensitivity of CD133-expressing pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Cancer Sci.* 2012; 103:889–96.
175. Quint K, Tonigold M, Di Fazio P, Montalbano R, Lingelbach S, Rückert F, et al. Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.* 2012; 41:2093–102.
176. Yao J, An Y, Wie J, Ji Z, Lu Z, Wu J, et al. Cyclopamine reverts acquired chemoresistance and down-regulates cancer stem cell markers in pancreatic cancer cell lines. *Swiss Med. Wkly.* 2011; 141:w13208.
177. Hu G, Li F, Ouyang K, Xie F, Tang X, Wang K, et al. Intrinsic gemcitabine resistance in a novel pancreatic cancer cell line is associated with cancer stem cell-like phenotype. *Int. J. Oncol.* 2012; 40:798–806.
178. Sobrevals L, Mato-Berciano A, Urtasun N, Mazo A, Fillat C. uPAR-controlled oncolytic

- adenoviruses eliminate cancer stem cells in human pancreatic tumors. *Stem Cell Res.* 2014; 12:1–10.
179. Chai X, Chu H, Yang X, Meng Y, Shi P, Gou S. Metformin Increases Sensitivity of Pancreatic Cancer Cells to Gemcitabine by Reducing CD133+ Cell Populations and Suppressing ERK/P70S6K Signaling. *Sci. Rep.* 2015; 5:14404.
 180. Dosch JS, Ziemke EK, Shettigar A, Rehemtulla A, Sebolt-Leopold JS. Cancer stem cell marker phenotypes are reversible and functionally homogeneous in a preclinical model of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2015; 75:4582–92.
 181. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog. Neurobiol.* 2011; 93:421–43.
 182. Cruz Gaitán AM, Torres-Ruíz NM, Carri NG. Embryonic neural stem cells in a 3D bioassay for trophic stimulation studies. *Brain Res. Bull.* 2015; 115:37–44.
 183. Sachewsky N, Leeder R, Xu W, Rose KL, Yu F, van der Kooy D, et al. Primitive neural stem cells in the adult mammalian brain give rise to GFAP-expressing neural stem cells. *Stem cell reports* 2014; 2:810–24.
 184. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97:703–16.
 185. Gürsel DB, Shin BJ, Burkhardt J-K, Kesavabhotla K, Schlaff CD, Boockvar JA. Glioblastoma stem-like cells-biology and therapeutic implications. *Cancers (Basel).* 2011; 3:2655–66.
 186. Bleau A-M, Howard BM, Taylor LA, Gursel D, Greenfield JP, Lim Tung HY, et al. New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans. *Neurosurg. Focus* 2008; 24:E28.
 187. Choy W, Nagasawa DT, Trang A, Thill K, Spasic M, Yang I. CD133 as a Marker for Regulation and Potential for Targeted Therapies in Glioblastoma Multiforme. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2012; 23:391–405.
 188. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, Heeschen C. Cancer stem cells in solid tumors. *Semin. Cancer Biol.* 2010; 20:77–84.

189. Shin DH, Xuan S, Kim W-Y, Bae G-U, Kim J-S. CD133 antibody-conjugated immunoliposomes encapsulating gemcitabine for targeting glioblastoma stem cells. *J. Mater. Chem. B* 2014; 2:3771.
190. Walters DM, Stokes JB, Adair SJ, Stelow EB, Borgman CA, Lowrey BT, et al. Clinical, molecular and genetic validation of a murine orthotopic xenograft model of pancreatic adenocarcinoma using fresh human specimens. *PLoS One* 2013; 8:e77065.
191. Song F, Parekh S, Hooper L, Loke YK, Ryder J, Sutton AJ, et al. Dissemination and publication of research findings: an updated review of related biases. *Health Technol. Assess.* 2010; 14:iii, ix–xi, 1-193.
192. Schott G, Pacht H, Ludwig W-D. Publikationsbias in Abhängigkeit von der Art der Finanzierung bei klinischen Studien. *Z. Evid. Fortbild. Qual. Gesundheitswes.* 2010; 104:314–22.
193. Mann J. Review of publication bias in studies on publication bias: mandatory publication of data may help. *BMJ* 2005; 331:638.
194. Coco C, Zannoni GF, Caredda E, Sioletic S, Boninsegna A, Migaldi M, et al. Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2012; 31:71.
195. Kim SJ, Kim YS, Jang ED, Seo KJ, Kim JS. Prognostic Impact and Clinicopathological Correlation of CD133 and ALDH1 Expression in Invasive Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 2015; 18:347–55.
196. Liu S, Liu C, Min X, Ji Y, Wang N, Liu D, et al. Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8:e81050.
197. Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C, et al. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2010; 102:340–51.
198. Li J, Feng ZC, Yeung FS-H, Wong MR-M, Oakie A, Fellows GF, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 activity in the developing human pancreas modulates retinoic acid

- signalling in mediating islet differentiation and survival. *Diabetologia* 2014; 57:754–64.
199. Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016;7:11018-32.
 200. Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev.* 2009; 18:1127–34.
 201. Foerch C, Pfeilschifter W, Zeiner P, Brunkhorst R. Glial fibrillary acidic protein in patients with symptoms of acute stroke: diagnostic marker of cerebral hemorrhage. *Nervenarzt* 2014; 85:982–9.
 202. Suetsugu A, Snyder CS, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. Imaging the Interaction of Pancreatic Cancer and Stellate Cells in the Tumor Microenvironment during Metastasis. *Anticancer Res.* 2015; 35:2545–51.
 203. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432:396–401.
 204. Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells: implications for the treatment of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14:5646–8.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

- Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert A, Partecke LI, Vollmar B: Impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. BMC Cancer. 2015; 15:51. IF 3,3.
- Zechner D, Bürtin F, Amme J, Lindner T, Radecke T, Hadlich S, Kühn JP, Brigitte Vollmar B: Characterization of novel carcinoma cell lines for the analysis of therapeutical strategies fighting pancreatic cancer. Cell Biosci. 2015, 5:51. IF 3,6.

Kongressbeiträge

- Bürtin F, Radecke T, Amme J, Zechner D, Vollmar B. Einfluss von Inflammation, Diabetes und Metformin auf die Pathophysiologie des duktaalen PaCa. 17. Chirurgische Forschungstage, Goethe-Universität Frankfurt am Main, Deutschland, 04-05.10.2013.
- Zechner D, Radecke T, Amme J, Bürtin F, Albert AC, Partecke LI, Vollmar B: Differential impact of diabetes type II and chronic inflammation on pancreatic cancer. 47th Annual meeting of the European Pancreatic Club, Toledo, Spanien, 24-26.06.2015.

Thesen der Dissertation

- Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten und tödlichsten Tumoren weltweit und hat trotz intensiver Forschung eine fatale Prognose.
- Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sogenannte Tumorstammzellen, welche sich v. a. durch ihr enormes Selbsterneuerungspotential auszeichnen, einen wesentlichen Beitrag an der Tumorprogression, der Bildung von Metastasen und der Therapieresistenz haben.
- Ziel dieser Studie war es, das potentielle Tumorstammzellkompartiment von drei murinen Adenokarzinomzelllinien zu untersuchen und den Einfluss von Diabetes, Pankreatitis und des Chemotherapeutikums Gemcitabin auf das potentielle Tumorstammzellkompartiment in vitro und in vivo zu analysieren.
- Die Gen-Expression von ALDH1a1 und CD133, als etablierte Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom und CD133, als ein potentiell neuer Tumorstammzellmarker im Pankreaskarzinom, wurden untersucht.
- Eine diabetische Stoffwechsellage führte in vivo zu einer signifikanten Reduktion von ALDH1a1⁺ Tumorzellen, jedoch hatte dies nur einen marginalen Einfluss auf die Anzahl an CD133⁺ Tumorzellen.
- Die Pankreatitis hatte in vivo nur geringen Einfluss auf die Anzahl an ALDH1a1⁺ Tumorzellen, jedoch zeigte sich hierbei eine moderate Erhöhung der Anzahl an CD133⁺ Tumorzellen.
- Die Exposition der drei Zelllinien 7265PDA, 6606PDA und 6606I gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen Glukose in vitro zeigte keine signifikante Veränderung der Expression des ALDH1a1-Gens.
- Die Selektion der Zelllinien in vitro mit Gemcitabin führte zu keiner signifikanten Änderung der Expression der ALDH1a1-, CD133- oder GFAP-Gene.
- Zukünftig sollte man zusätzlich funktionelle Tests, wie z. B. dem sphere-forming-assay oder dem seriellen Transplantationsassay anwenden, um potentielle Tumorstammzellen zu identifizieren.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Die aus anderer Literatur verwendeten Inhalte sind als solche kenntlich gemacht. Ich bestätige, dass diese Arbeit an keiner anderen als der Universität Rostock zur Erlangung des Grades „Doktor der Medizin“ vorgelegt wurde.

Rostock, am 28.12.2016

Jonas Amme