

**Die Untersuchung der Rolle von Lgr4 im PDAC im Hinblick auf
das Tumorneubildungs-, Selbsterneuerungs- und
Metastasierungs-Potential *in vivo***

Von Elisa Gertrud Gabriele Frühwald

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Die Untersuchung der Rolle von Lgr4 im PDAC im Hinblick auf das Tumorneubildungs-,
Selbsterneuerungs- und Metastasierungs-Potential *in vivo***

von

Elisa Gertrud Gabriele Frühwald

aus Stuttgart

München 2020

**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München**

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

**Angefertigt in der chirurgischen Forschung des Universitätsklinikums Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Mentor: Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 8. Februar 2020

Meiner Familie

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abkürzungsverzeichnis.....	7
3	Einleitung	13
3.1	Anatomie und Physiologie des Pankreas	13
3.2	Das humane duktales Pankreasadenokarzinom	14
3.3	Epidemiologie	14
3.4	Ätiologie.....	15
3.4.1	Risikofaktoren und Prädispositionen.....	15
3.5	Karzinogenese des PDAC	16
3.5.1	Mutationen bei der PDAC-Karzinogenese	17
3.5.2	Tumorprogressionsmodell.....	18
3.6	Klinisches Erscheinungsbild	18
3.7	Diagnose	19
3.8	Klassifikation des Tumorstadiums	20
3.9	Therapiestrategien und Prognose	21
3.9.1	Die chirurgisch-kurative Intervention.....	22
3.9.2	Die adjuvante/neoadjuvante Therapie.....	23
3.9.3	Die Palliative Versorgung.....	24
3.10	Physiologie und Anatomie des Pankreas beim Tier	25
3.10.1	Erkrankungen des Pankreas beim Kleintier	25
3.11	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR- G-Protein-coupled receptors).....	26
3.11.1	Aufbau und Rolle des Lgr4-Rezeptors.....	27
3.11.2	Der kanonische Wnt-/β-Catenin Signaltransduktionsweg.....	28
3.12	Stammzellen	31

3.13	Krebsstammzellen	32
3.14	Ziele der vorliegenden Arbeit	32
4	Material-und Methodenteil	33
4.1	Material	33
4.1.1	Verbrauchsmaterialien	33
4.1.2	Laborgeräte	35
4.1.3	Lösungen, Medien und Puffer	38
4.1.3.1	Murine Zellkultur.....	38
4.1.3.2	Lösungen für das Durchflusszytometer.....	38
4.1.3.3	Lösungen und Chemikalien für den Western Blot.....	39
4.1.3.4	Lösungen für die Immunfluoreszenz	40
4.1.3.5	Lösungen für die PCR.....	40
4.1.3.6	Lösungen für die Hämatoxylin Eosin Färbung	40
4.1.4	Assays und Kits	41
4.1.5	Rekombinante Proteine und Inhibitoren.....	41
4.1.6	Antikörper.....	42
4.1.6.1	Durchflusszytometrie (FACS).....	42
4.1.6.2	Western Blot	43
4.1.6.3	Immunfluoreszenz.....	43
4.1.7	Primer für die PCR	43
4.1.8	OP Material und Pharmaka	44
4.1.8.1	OP-Material	44
4.1.8.2	Pharmaka	45
4.1.9	Software	46
4.2	Methoden	48
4.2.1	Zellkultur.....	48
4.2.1.1	Murine PDAC Zelllinien – KPC, KPCZ.....	48
4.2.1.2	Kultivieren der neuen Zellen	48

4.2.1.3	Einfrieren einer Zelllinie	48
4.2.1.4	Passagieren (Subkultivieren) der Zellen	49
4.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität der Zellen	50
4.2.1.6	Zellkultur von multizellulären Tumoraggregaten (Sphäroide)	51
4.2.1.7	Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) Stimulation der Zellen.....	52
4.2.2	Durchflusszytometrie	52
4.2.2.1	Messung mit dem Durchflusszytometer	52
4.2.2.2	Extrazelluläre Anfärbung.....	54
4.2.2.3	Viabilitätsfärbung für die Analyse mit dem Durchflusszytometer	55
4.2.2.4	Kompensation	55
4.2.2.5	Intrazelluläre Anfärbung	55
4.2.2.6	Isotypen-Kontrolle.....	56
4.2.3	Western Blot.....	56
4.2.3.1	Vorbereitung der Zellen	56
4.2.3.2	Herstellung der Reagenzien für den Western Blot.....	57
4.2.3.3	Proteinisolation und photometrische Proteinquantifizierung	58
4.2.3.4	Herstellung eines Gels und Laden der Proben	59
4.2.3.5	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran (Blotting)	60
4.2.3.6	Detektion.....	62
4.2.3.7	Analyse der Western Blot Ergebnisse	62
4.2.4	Immunfluoreszenz	62
4.2.4.1	Fixierung der Zellen	63
4.2.4.2	Permeabilisieren der Membran	63
4.2.4.3	Proteinblockierung.....	64
4.2.4.4	Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern	64
4.2.4.5	Färbung der Zellkerne	64
4.2.4.6	Eindecken der Proben	65
4.2.4.7	Auswertung	65
4.2.5	PCR.....	65

4.2.5.1	Vorbereitung der Proben	65
4.2.5.2	RNA-Isolation	66
4.2.5.3	Quantitative Nukleinsäureanalyse	67
4.2.5.4	Reverse Transkription (cDNA Synthese).....	67
4.2.5.5	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR, quantitative real-time-PCR).....	70
4.2.5.6	Relative Quantifizierung und PCR- Effizienz	70
4.2.5.7	Optimale Zyklusbedingungen für die Echtzeit-PCR	71
4.2.6	Zellsorting	71
4.2.6.1.1	Vorbereitung der Zellen	71
4.2.6.1.2	Voraussetzungen für den Sortierprozess	72
4.2.6.1.3	Aufbau des BD FACS Aria III	72
4.2.6.1.4	Sorten	73
4.2.6.2	Spheroid Formation Assay (SFA)	74
4.2.7	Lebend-Tot Versuch der Zellen.....	74
4.2.8	Tierexperimentelle Versuche	75
4.2.8.1	Mäuse.....	75
4.2.8.2	Tierstall.....	75
4.2.8.3	Vorbereitung der KPC 661 Zelllinie für die subkutanen Xenotransplantationen	76
4.2.8.3.1	Subkutane Xenotransplantation mit/ohne sortierte Zellen	76
4.2.8.4	Orthotopes Mausmodell	77
4.2.8.4.1	Gewinnen der KPC 661 Zellen für die OP	77
4.2.8.4.2	Orthotope Xenotransplantation per Laparatomie	77
4.2.8.5	Tötungskriterien laut TV 55.2-1-54-2532-84-2016.....	78
4.2.8.6	Präparation von Tumoren	78
4.2.8.7	Verarbeitung von Tumorgewebe	79
4.2.8.7.1	Gewinnen der Gewebeprobe in Paraffinwachs.....	79
4.2.8.7.2	Schneiden von Paraffinblöcken	79
4.2.8.7.3	Hämalaun- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)	79
4.2.9	Statistik	80

5	Ergebnisse	81
5.1	Isotypenkontrolle des Lgr4-Antikörpers im FACS	81
5.2	Lichtmikroskopische Untersuchung der KPC/KPCZ Zelllinien	82
5.3	Charakterisierung der Lgr4-Expression auf KPC/KPCZ Zelllinien mithilfe der Durchflusszytometrie	84
5.3.1	Extrazelluläre Gating-Strategie der vier Zelllinien	84
5.3.2	Messung der extrazellulären Lgr4-Expression	85
5.3.3	Vergleich der extrazellulären Lgr4-Expression in den KPC/KPCZ	86
5.3.4	Intrazelluläre Gating-Strategie der vier Zelllinien	87
5.3.5	Messung der intrazellulären Lgr4-Expression	88
5.3.6	Vergleich der intrazellulären Lgr4-Expressionen in den KPC/KPCZ	88
5.3.7	Vergleich der Lgr4-Expression bei Lösung der Zellen mit Trypsin und Zellschaber	90
5.3.8	Begutachten der Morphologie von Sphäroiden im Lichtmikroskop	91
5.4	Charakterisierung der Lgr4-Expression in KPC/KPCZ mithilfe des Western Blots	93
5.4.1	Western Blot von adhärenenten sowie sphäroidalen Kulturen der KPC/KPCZ Zelllinien	93
5.4.1.1	Vergleich der Lgr4-Expression in den einzelnen Zelllinien im Western Blot	94
5.5	Charakterisierung der Lgr4-Expression in KPC/KPCZ mithilfe von PCR	95
5.5.1	Vergleich der <i>Lgr4</i> mRNA-Expression in KPC/KPCZ und Sphäroiden	96
5.6	Analyse der Lgr4-Expression auf den KPC/KPCZ Zelllinien mittels Immunfluoreszenz	97
5.7	Vitalitätskontrolle der KPC 661 unter OP-Bedingungen	101
5.8	Zellsorting	102
5.8.1	Gating-Strategie beim Sorting	102
5.8.2	Sphäroid-Formation-Assay SFA	104
5.8.3	Vergleich des Tumorwachstums zwischen Lgr4 ⁺ und Lgr4 ⁻ sortierten Zellen	106
5.8.3.1	Darstellung des Tumorwachstums und der Tumorentnahme	106
5.8.3.2	Histologische Schnitte und HE-Färbung der Tumore	108

5.8.4	Orthotope Injektion unsortierter Zellen	109
5.9	EMT-Stimulation der Zellen	112
5.9.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen stimulierter KPC Zellen	113
5.9.2	Analyse stimulierter KPC Zellen mit dem Durchflusszytometer	114
5.9.3	Western Blot stimulierter KPC Zellen	115
5.9.4	PCR stimulierter KPC Zellen	119
6	Diskussion.....	121
7	Zusammenfassung	131
8	Summary	133
9	Literaturverzeichnis	135
10	Abbildungsverzeichnis.....	143
11	Tabellenverzeichnis.....	145
12	Danksagung	147

2 Abkürzungsverzeichnis

β	beta
β -TrCP	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
C57BL/6	C57 Black 6
CO_2	Kohlenstoffdioxid
kb	Kilobasen
%	Prozent
Δ	delta
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
μm	Mikrometer
Vol.	Volumen
7-AAD	7-Amino-actinomycin D
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
AF488	Alexa Flour488
AJCC staging system	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Adenomatous-polyposis-coli Protein
Aqua dest.	Aqua destillata
ATBW	Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten Baden-Württemberg
BCA	Bicinchoninic acid assay
BCS	Body Condition Score
BMI	Body Mass Index
BRCA2-Gen	Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein
BSA	Bovines Serum Albumun
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CK1 α	Casein-kinase 1 α

CDH-1	E-Cadherin
CDKN2A	Cyclin dependent kinase Inhibitor 2A
CSC	Cancer Stem Cells
CST	Cell Signaling Technology ®
CT	Computertomographie
Ct-Wert	Cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus
CtBP	C-terminal binding Protein
ERCP	Cholangiopankreatikographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM/ F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPC4/SMAD4-Gen	Deleted in pancreatic cancer locus 4/SMAD family member 4
Dsh oder Dvl	Dishevelled Protein
ECOG-Status	Performance-Status der Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK	Erkrankung
EMT	Epithelialen-mesenchymalen Transition
ez.	extrazellulär
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal-Calve-Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMO	Fluorescence minus one
FSC	Forward Scatter
FZD	Frizzled-Rezeptor
g	Gramm
g	Gravidität (Zentrifuge)
ggf.	Gegebenenfalls
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-coupled receptors
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Salzsäure

HDACs	Histon-Deacetylasen
Her-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HRP-linked AB	horseradish-peroxidase gekoppelte AK
IF	Immunfluoreszenz
i.p.	intraperitoneal
IPEK	Institut für Epidemiologie und Kreislaufkrankheiten
IPMN	intraduktale, papilläre, muzinöse Neoplasie
iz.	intrazellulär
k.A	keine Angabe
kg	Kilogramm
Ko	Kontrolle
K-ras	Kirsten-Rat-Sarcoma-Viral-Onkogen
Lgr	Leucin-rich repeat-containing G-Protein- coupled receptor / Leucin-reich repetierende G-Protein gekoppelte Rezeptoren
LRP5/6	low-density lipoprotein receptor related proteins 5 and 6
LRRs	leucin-rich repeats (Wiederholungssequenzen)
mA	Milliampere
MDCT	Multidetektor-CT
MFI	Mean fluorescence intensity
Min.	Minute
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MZN	muzinöse, zystische Neoplasie
NaCl	Natriumchlorid
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
PaCa	Pankreasadenokarzinom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase- Kettenreaktion

PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin- Streptomycin
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein complex- cyanin 5.5
PermPuffer	Permeabilisierungspuffer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PT	Primärtumor
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay puffer
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RSPO1-4	roof plate-specific spondin (R-Spondin)
RPMI	Zellkulturmedium nach dem <i>Roswell Park Memorial Institute</i> benannt
Psi	Pound-force per square inch= amerikanische Maßeinheit für den Druck
PT	Primärtumor
qRT-PCR	quantitative real-time-PCR
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCF	stem-cell factor
SD	Standardabweichung
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	Standardfehler
Sek.	Sekunden
siRNA	Small interfering RNA
SSC	Side Scatter
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TCF/LEF	T-cell factor/lymphocyte enhancer factor
TGF- β	Transforming Growth factor
TLE	transducin-like enhancer of split
TM	Transmembrandomänen
TP53/p53	TP53/Trp53 Transformation related protein 53
TV	Tierversuchsantrag

u.a.	unter anderen
US	Ultraschall
USA	United States of America
ZEB1KD	Zinc-finger E-box binding homeobox 1

3 Einleitung

3.1 Anatomie und Physiologie des Pankreas

Die anatomische Lage des Pankreas ist sekundär retroperitoneal zwischen Magen und den zwei großen Abdominalgefäßen - der Aorta und der Vena cava inferior - angesiedelt. Die Bauchspeicheldrüse ist keilförmig mit einer bereits makroskopisch erkennbaren Lappenstruktur und ist zwischen 13-18 cm lang.

Anatomisch kann man das Pankreas in folgende drei Abschnitte unterteilen:

Pankreaskopf (Caput pancreatis), Pankreaskörper (Corpus pancreatis), welcher auf Höhe des 1.-2. Lendenwirbelkörpers liegt und Pankreasschwanz (Cauda pancreatis). Der Hauptausführungsgang des Pankreas (Ductus pancreaticus) durchzieht das komplette Organ und mündet gemeinsam mit dem Hauptgallengang (Ductus choledochus) in die Papilla duodeni major des pars descendens des Duodenums [1].

Das Pankreas hat sowohl eine endokrine (Produktion von Glukagon und Insulin) als auch eine exokrine (Ausschüttung von Pankreassaft mit Amylase und Lipase) Funktion im Verdauungssystem und spielt somit eine zentrale Rolle im Organismus. Der endokrine Teil besteht aus Epithelzellen und wird als sogenanntes Inselorgan bezeichnet, welches ungefähr 1 Millionen Langerhans'sche Inseln besitzt. Diese produzieren Hormone, wie Insulin und Glukagon und regulieren somit den Glukosestoffwechsel des Körpers. Der exokrine Teil sezerniert den Verdauungssaft, bestehend aus sogenannten Hydrolasen, dazu gehören Proteasen zur Proteinspaltung, Glykosidasen zur Kohlenhydratspaltung, Nukleasen zur Nukleinsäurespaltung und Lipasen für die Fettspaltung. Dieser Verdauungssaft wird über den Ductus pancreaticus in das Duodenum abgegeben. Diese Enzyme werden in den Drüsenendstücken (Azini) durch die Azinuszellen jedes Drüsenläppchens gebildet [1, 2].

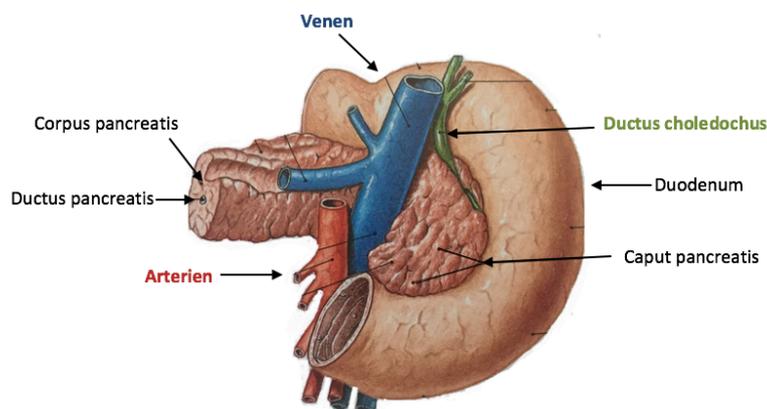


Abbildung 1 Dorsalansicht der anatomischen Lage des Pankreas, modifizierte Abbildung [3], mit freundlicher Genehmigung des ELSEVIER Verlag

3.2 Das humane duktale Pankreasadenokarzinom

Neoplastische Veränderungen der Bauchspeicheldrüse können exo- oder endokriner Natur sein. Das humane duktale Pankreasadenokarzinom (PDAC) betrifft den exokrinen Teil des Pankreas und zählt zu den aggressivsten und tödlichsten Tumorarten weltweit. Darüber hinaus gibt es azinäre Tumoren, welche von den sekretproduzierenden Parenchymzellen des Pankreas ausgehen oder zystische Tumoren, welche aus den Gangzellen hervorgehen [4]. Etwa 95% der Neoplasien entstehen aus dem exokrinen Teil des Pankreas, wodurch diese die überwiegende Mehrheit der bösartigen Pankreastumore darstellen [5]. Trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen ergaben sich bis dato keine wesentlichen Fortschritte in Bezug auf die Überlebenschancen.

Durch die hohe Malignität des PDAC kommt es zu einer schnellen Metastasierung in umliegendes Gewebe und Organe. Selbst im fortgeschrittenen Krankheitsgeschehen treten die Symptome erst sehr spät und vor allem unspezifisch auf, wodurch die Chance auf eine vollständige und effektive Heilung häufig ausbleibt. Durch das seltene Ansprechen auf Medikamente, Bestrahlung und durch die ausgeprägte Chemoresistenz bleibt eine kurative Therapie häufig aus. Demzufolge ist die operative Entfernung die einzig potentiell kurative Behandlung dieses Tumors.

Eine verbesserte Prognose kann nur durch eine früh gestellte Diagnose, sowie eine vollständige Resektion des lokal abgrenzbaren Tumors gestellt werden.

3.3 Epidemiologie

Das PDAC ist mit über 95% die häufigste maligne Form des Pankreaskarzinoms und hat seinen Ursprung in den epithelialen Zellen des Pankreasganges [4, 6].

Laut dem Robert Koch-Institut (RKI) „Krebs in Deutschland für 2013/2014“ erkrankten im Jahr 2014 ca. 17.100 Menschen an Bauchspeicheldrüsenkrebs, wovon 8.550 Männer und 8.580 Frauen betroffen waren. Durch die sehr spät auftretenden Symptome (siehe Kapitel 1.6 Klinisches Erscheinungsbild) und der schlechten Prognose lag die Anzahl der Sterbefälle 2013/2014 bei 8.231 Männern und 8.384 Frauen [7]. Somit entspricht die Anzahl der Sterbefälle nahezu der Inzidenzrate, was die geringe Überlebenswahrscheinlichkeit mit der Diagnose PDAC verdeutlicht. Der Report zum Krebsgeschehen 2016 in Deutschland berichtete von 8.660 erkrankten Männern und 8.480 Frauen und einer absoluten Anzahl an Sterbefällen von 8.273 und 8.328. Nach Angaben des RKI korreliert die Inzidenz des PDAC stark mit dem Alter. Während der mittlere Erkrankungsgipfel bei Männern bei etwa 70,4 Jahren liegt, liegt dieser bei Frauen bei 74,1 Jahren [8]. Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes teilte mit, dass das Lebenszeitrisiko bei beiden Geschlechtern bei 1,5% liegt [5]. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 9,0% bei Männern und 9,3% bei Frauen, stellt das PDAC die niedrigste Überlebensrate aller

Krebserkrankungen dar [8]. Angesichts der ungünstigen Prognose, aufgrund fehlender oder unspezifischer Frühsymptome, einer späten Diagnosestellung und daraus resultierend einer geringen kurativen Resektionsrate aufgrund einer frühen und aggressiven Metastasierung, stellt es bei Männern 6,3% und bei Frauen 7,5% aller Krebstodesfälle dar. Somit nimmt das PDAC bei beiden Geschlechtern den 4. Platz der häufigsten Krebstodesursachen ein [5].

Bei Männern wie auch bei Frauen ist seit 1970 ein kontinuierlicher Anstieg der absoluten Zahl an Neuerkrankungen, sowie der Zahl der Sterberaten an PDAC zu bemerken [8].

Weltweit sind die Inzidenz, sowie die Sterberate an Bauchspeicheldrüsenkrebs in stärker entwickelten Ländern und Regionen höher. Im internationalen Vergleich liegen sowohl Europa, als auch Nordamerika in Bezug auf Inzidenz- und Mortalitätsrate des PDAC deutlich höher als in Asien oder Afrika. Daraus lässt sich schließen, dass das Erkrankungsrisiko vermehrt in stärker entwickelten Ländern und Regionen auftritt [5, 8].

3.4 Ätiologie

3.4.1 Risikofaktoren und Prädispositionen

Ursachen für die Entwicklung eines PDAC sind bisher noch weitestgehend unbekannt. Die Risikofaktoren sind breit gefächert wie z.B. prädispositionierende Erkrankungen, Umweltfaktoren oder Lebensgewohnheiten (Essgewohnheiten, Kaffee, sportliche Aktivität/ Inaktivität etc.). Diese verschiedenen Risikofaktoren, können auch im Zusammenspiel die Entstehung eines PDAC begünstigen.

Im Folgenden werden einige der Wichtigsten vorgestellt:

Ergebnisse mehrerer Studien haben gezeigt, dass exogene Faktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum das Risiko an PDAC zu erkranken um ein Vielfaches erhöhen [9-11].

Das relative Risiko an PDAC zu erkranken steigt bereits bei einer Zigarette pro Tag auf ungefähr 2%. Die Risikozunahme ist von der Anzahl der Zigaretten, sowie von der Dauer des Konsums abhängig. Bei einer Konsumdauer ab 10 Jahren bleibt das Risiko trotz Raucherentwöhnung erhöht [12, 13].

Auch erhöhter Alkoholkonsum von drei oder mehr alkoholhaltigen Getränken pro Tag, kann das Krebsrisiko im Vergleich zu Nicht- oder Gelegenheitstrinkern auf bis zu 20% erhöhen [14].

Weitere medizinische Risikofaktoren, welche zur Entwicklung eines PDAC beitragen können, sind die chronische Pankreatitis [10, 15] aber auch eine erbliche/angeborene oder tropische Pankreatitis [16].

Zudem belegen weitere Studien, dass ein erhöhter Body Mass Index (BMI) bzw. Adipositas und somit eine hohe Zufuhr von Fetten und Zucker erkrankungsbegünstigend wirken [13, 17, 18]. Die Zunahme des BMI (kg/m^2) um eine Einheit erhöht das Risiko bei Frauen um 4% und bei Männern um 6% [13]. Eine gesammelte Analyse verschiedener Kohortenstudien von 2011 zeigte, dass

Personen mit einem BMI von $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ein 47% höheres Risiko im Vergleich zu Personen mit einem normalen BMI ($21\text{-}22,9 \text{ kg/m}^2$) haben an PDAC zu erkranken [18].

Des Weiteren wurde Diabetes mellitus Typ II als medizinischer Risikofaktor für verschiedene Krebsarten eingeordnet, wobei PDAC hier den zweiten Platz nach Leberkrebs einnimmt [19, 20].

Laut Huxley 2005, haben Menschen, bei Vorliegen eines kürzer bestehenden Diabetes mellitus <4 Jahren ein 50% höheres Risiko an PDAC zu erkranken. Zu beachten ist hier, dass die gestellte Diagnose Diabetes mellitus II auch ein Frühsymptom des PDAC sein kann [21]. Des Weiteren sind ungefähr 5-10% der Pankreaskarzinome, neben anderen äußeren Einflussfaktoren genetischer Prädisposition bedingt [22, 23].

Hereditäre Prädispositionen sind beispielsweise das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom (FAMMM)-Syndrom, bei welchem es zu einer Keimbahnmutation im Gen CDKN2A (Cyclin dependent kinase Inhibitor 2A) kommt, welches für die Kodierung des Tumorsuppressorproteins p16 zuständig ist. Laut Goldstein et. al haben Verwandte von Menschen mit FAMMM ein 13 bis 22-fach höheres Risiko an einem Pankreaskarzinom zu erkranken [24].

Weitere Prädispositionen haben Patienten mit hereditärem Mamma- und Ovarialkarzinom (Keimbahnmutation im BRCA2-Gen, Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein), welche ein 3,2-10-fach höheres Risiko an PDAC zu erkranken aufweisen [25, 26] und auch das familiäre Mammakarzinom mit der Mutation im PALB2-Gen, welches den Partner und Localizer des BRCA2A-Gens darstellt.

Außerdem das Peutz-Jeghers Syndrom (Mutation in STK11 (Serine/Threonine Kinase 11), auch genannt LKB1 (Leber Kinase B1- Gen) stellt eine weitere Prädisposition dar, sowie die hereditäre Pankreatitis (Genmutation in PRSS1 oder SPINK1) und das familiäre Pankreaskarzinom (FPC). Familienmitglieder von FPC- Verwandten, welche mindestens einen Verwandten ersten Grades mit PDAC in der Familie haben, haben ein 9-fach höheres Risiko daran zu erkranken, bei ≥ 3 Verwandten ersten Grades erhöht sich das Risiko auf das 32-fache [27].

Ungeachtet der Diversität an Risikofaktoren, sowie der unspezifischen und vor allem spät auftretenden Symptome, ist das PDAC der weitaus häufigste Tumor der Bauchspeicheldrüse. Auf molekularer Ebene sind bereits viele Mutationen bestätigt worden, welche zur Entstehung des PDAC beitragen. Auf die genauere Entstehung des PDAC wird in den nächsten Abschnitten genauer eingegangen.

3.5 Karzinogenese des PDAC

Der genaue Entstehungsmechanismus des Pankreaskarzinoms ist noch nicht eindeutig geklärt. Derzeitige Erkenntnisse beschreiben eine fortschreitende, pathologische Progression, bei welcher

es durch krebsassoziierte genetische Aberrationen und Akkumulationen von Mutationen zur Entwicklung eines voll invasiven Pankreaskarzinoms kommt.

Das Progressionsmodell der azinär duktaalen Metaplasie (ADM) beginnt in den azinären Zellen des Pankreas. In den normalen duktaalen Gangepithelzellen folgen histologisch definierte intraepitheliale Vorläuferläsionen, die mikroskopisch erkennbaren pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanINs). Diese wachsen später zu einem infiltrierenden, invasiv wachsenden Karzinom heran. Die PanINs werden anhand ihrer Morphologie in unterschiedliche Grade eingeteilt (1A,-1B,-2,-3).

Während in **PanIN-1-Läsionen -A** flache und in Grad **B** papilläre Zellen nachgewiesen werden können, aber noch keinerlei nukleäre Atypien und keinerlei Verlust der Polarität aufweisen, zeigen die Zellen in **Grad 2** bereits nukleäre Anomalien auf, wie beispielsweise eine verminderte Kernpolarität, vergrößerte oder hyperchromatische Nuklei. Die **Grad 3** PanIN-Läsionen, auch carcinoma in situ genannt, werden durch eine hochgradige Dysplasie charakterisiert, die mit einem starken Verlust der Polarität, nukleären Atypien, Eindringen von abgelösten Zellen in das Lumen sowie einer atypischen beständigen Mitoseaktivität einhergehen.

Im Gegensatz zum Karzinom ist die Basalmembran bei Grad 3 noch intakt.

Makroskopisch erkennbare präkanzeröse Vorstufen des Pankreas stellen die muzinösen, zystischen Neoplasien (MZN) und die intraduktale, papilläre, muzinöse Neoplasie (IPMN) dar [28-30].

3.5.1 Mutationen bei der PDAC-Karzinogenese

Mutationen der Tumorsuppressorgene CDKN2A/p16 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, kodiert für das p16INK4A) und Tp53/p53 (TP53/Trp53 Transformation related protein 53) führen zur Inaktivierung ihrer Aktivität. Dadurch können diese den Zellzyklus nicht mehr arretieren bzw. keine Apoptose induzieren, wodurch eine weitere unkontrollierte Zellproliferation der nicht intakten Zellen folgt. Ein weiteres, häufig mutiertes Tumorsuppressorgen, ist das DPC4/SMAD4-Gen (Deleted in pancreatic cancer locus 4/SMAD family member 4).

Laut Rozenblum et. al 1997 ist p16 bei 82% der duktaalen Pankreaskarzinome und p53 bei über 70-75% mutiert. Sie stellen damit die am häufigsten mutierten Tumorsuppressorgene dar [31, 32].

Eine Aktivierung des Onkogens „Kirsten-Rat-Sarcoma-Viral-Onkogen“ (*K-ras*) durch Mutation findet in etwa 90% der an PDAC erkrankten Patienten statt [31, 33-35]. Im Gegensatz zu Tumorsuppressorgenen erfolgt hier durch die Mutation eine konstante unkontrollierte Proliferation der Zellen.

3.5.2 Tumorprogressionsmodell

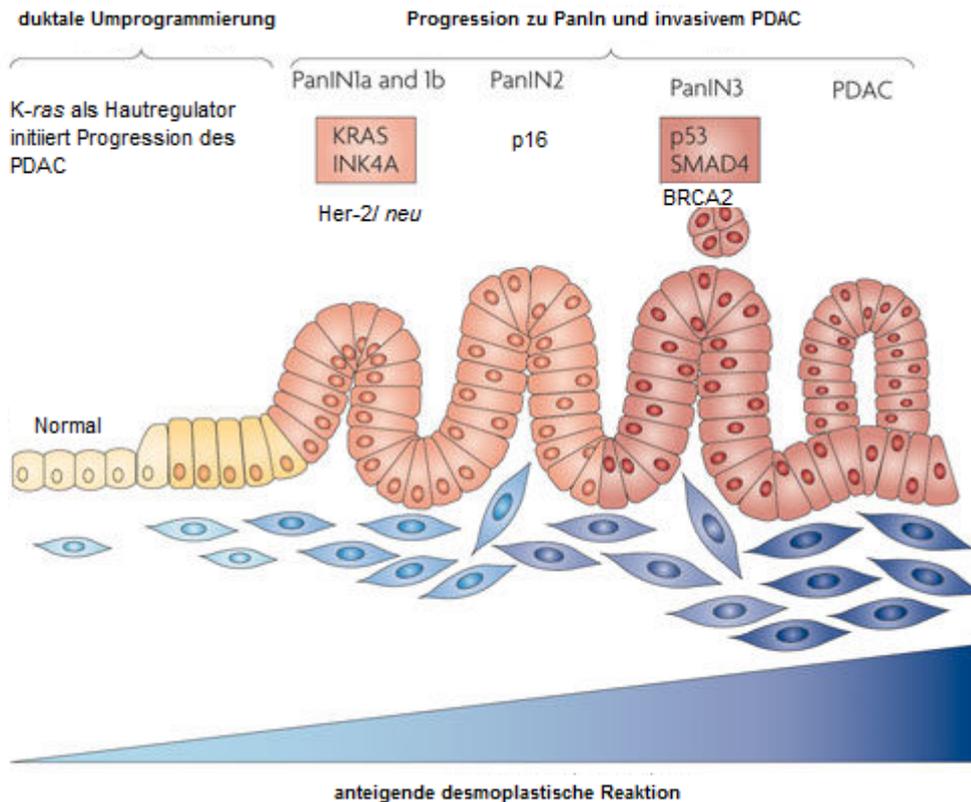


Abbildung 2 Tumorprogressionsmodell, modifizierte Abbildung [36], mit freundlicher Genehmigung der wissenschaftlichen Springer Nature Verlagsgruppe

Aus dem normalen duktalem Gangepithel des Pankreas entwickelt sich aus kubischen Zellen über die histologisch definierten Vorläuferläsionen (PanIN) ein invasives Pankreaskarzinom. Die Überexpression von Her-2/*neu* (human epidermal growth factor receptor 2) und die Punktmutationen von K-*ras* treten im frühen, die Inaktivierung des p16 Tumorsuppressorgens im mittleren und die Inaktivierung von p53, DPC4/SMAD4 und BRCA2 im späten Stadium auf. Durch die dauernd ansteigenden desmoplastischen Reaktionen besitzt das invasive Pankreaskarzinom eine feste und derbe Konsistenz [37, 38].

3.6 Klinisches Erscheinungsbild

70-80% der Pankreaskarzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert und 20-30% im Pankreaskörper oder -schwanz [39-41]. Da bei einem Pankreaskarzinom die charakteristischen Frühsymptome meist ausbleiben, wird die Diagnose häufig sehr spät gestellt, wodurch die Erkrankung bereits sehr weit fortgeschritten ist. Die vorhandenen Symptome sind abhängig von Lokalisation und Ausmaß des Tumors. Da sich die meisten PDACs im Pankreaskopf entwickeln, führt dies häufig zu einer obstruktiven Cholestase (Gallenstau aufgrund von Gallengangsobstruktion durch raumfordernde Prozesse) mit dunkelgelbem bis braunem Urin und ikterischen Verfärbungen der Haut und Skleren [33]. Klinisch weisen die meisten Patienten Schmerzen und einen Ikterus auf, welcher durch

Verlegung der Gallengänge entstehen kann. Die häufigste Schmerzlokalisierung ist im Oberbauch mit oder ohne ausstrahlende Schmerzen in den Rücken. Ikterus ist eines der prägnantesten Symptome und ist bei einer Tumorlokalisierung im Pankreaskopf vierfach so häufig als bei anderen Tumorlokalisationen. Die Leitsymptome des PDAC stellen somit Schmerzen und/oder Ikterus mit 79% bei ungefähr 50% aller Patienten unabhängig vom Tumorstadium dar [39, 42].

Beachtlich ist allerdings, dass laut Kalser et. al über 50% der Patienten mit einem potentiell resektablen Tumor, einen schmerzlosen Ikterus zeigen [39], was wiederum nicht den typischen Leitsymptomen eines PDAC entspricht.

In frühen Stadien des Tumors (potentiell resektabel) haben nur etwa 33% der Patienten Schmerzen, währenddessen bei einem (lokal) fortgeschrittenen Tumor bis zu 85% der Patienten über Schmerzen berichten [39]. Neben den oben genannten Symptomkonstellationen, stellen sich viele der Patienten, auch aufgrund von allgemeiner Asthenie 86% (Kraftlosigkeit), Anorexie 83%, Gewichtsabnahme, Übelkeit, Aszites [33, 42] mit Diarrhoe, acholischem Stuhl oder Steatorrhoe vor [43].

Wie bereits erwähnt sind Pankreaskarzinome aufgrund der spät gestellten Diagnosen meist weit fortgeschritten und die kanzerogenen Zellen infiltrieren bereits das umliegende Gewebe, wie Lymphknoten, Gefäße, abdominale Organe, aber auch Fernmetastasen in Leber und Lunge werden häufig diagnostiziert [33].

Sowie in der Human- als auch in der Veterinärmedizin sollten bei den geschilderten Symptomen schnellst möglich weitere diagnostische Maßnahmen eingeleitet werden.

3.7 Diagnose

Bei Patienten mit Verdacht auf PDAC sollte der Fokus auf einer schnellen Diagnosestellung und dem korrekten Staging des Tumors liegen, um somit die Möglichkeit der Resektabilität oder die Notwendigkeit der palliativen Therapie zu erfassen. Zur Diagnosestellung wird der Tumor detektiert, von anderen Pankreaserkrankungen differenziert und das *Staging* des Tumors durchgeführt [44]. Als diagnostischer Standard bei Abdominalschmerz wird bei diesen Patienten häufig ein abdominaler (Doppler-)Ultraschall (US) durchgeführt. Allerdings bieten konventionelle Ultraschalls keine sichere Diagnosestellung aufgrund geringer Sensitivität der retroperitonealen Lage des Pankreas und der stark unterschiedlichen Erfahrung des Untersuchers. Laut Rickes et al. werden nur 57% der PDAC mit einer Abdomensonografie korrekt klassifiziert [45]. Die am weitesten verbreitete diagnostische Maßnahme zum Tumorstaging stellt vor allem die Computertomographie (CT) durch die dreidimensionale Darstellung mit vorherigen Kontrastmittelapplikation (MDCT-Multidetektor-CT) dar. Bei CT-Aufnahmen des Abdomens und Thorax können Größe des Primärtumors, Infiltrationen in umliegendes Gewebe/ Gefäße und vor allem mögliche Fernmetastasen diagnostiziert werden, welche im Falle einer chirurgischen Resektion des Tumors von starker Bedeutung sind. Weitere diagnostische Maßnahmen sind

Magnetresonanztomographie (MRT), endoskopischer Ultraschall, beispielsweise bei Patienten mit Tumorverdacht ohne Tumornachweis im CT [44]. Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) ist vor allem bei Patienten mit Ikterus aufgrund einer Gallengangsobstruktion von Bedeutung, da in solchen Fällen gleichzeitig die (palliative) Therapie durch Einsetzen eines biliären Stents durchgeführt werden kann [46]. Der Vorteil der beiden endoskopischen Maßnahmen ist die Möglichkeit zur gezielten Biopsieentnahme, beispielsweise mithilfe einer Feinnadelaspiration und anschließender zytologischer und histologischer Untersuchung des Gewebes [33, 44]. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (Verteilung eines Radiopharmakons im Körper und gleichzeitiger Erstellung von Schnittbildern) wird als nicht-invasive Diagnosemaßnahme zwar nicht routinemäßig durchgeführt, aufgrund limitierender Faktoren, wird sie aber häufig zusätzlich zu den oben genannten Methoden herangezogen [44]. Der Tumormarker CA19-9 (Carbohydrate antigen 19-9) besitzt eine geringe Spezifität und Sensitivität und wird daher nicht zur Erstdiagnose verwendet [47], allerdings ist er die geeignete Wahl für das therapeutische Monitoring und die Nachsorge eines PDAC Patienten, falls dieser präoperativ positiv war [48, 49]. Bis heute werden aufgrund der geringen Zuverlässigkeit noch keine routinemäßigen Screeninguntersuchungen/ Vorsorgeuntersuchungen durchgeführt oder empfohlen [46, 49].

3.8 Klassifikation des Tumorstadiums

Das Tumorstaging kann nach verschiedenen Kategorien eingeteilt werden. Laut dem American Joint Committee (AJCC staging system) ist die TNM-Klassifizierung (siehe Tab. 1) am meisten verbreitet. Weitere Kategorien sind nach den Krankheitsstadien (Stage) (IA, IB, IIA, IIB, III und IV) oder dem Operationsergebnis, also dem Vorhandensein von Resttumorgewebe (R0: kein Resttumor, R1: mikroskopischer Residualtumor, R2: makroskopischer Residualtumor). Die TNM-Klassifizierung wird auf die Resektabilität bezogen, welche mithilfe der CT-Aufnahmen bewertet werden kann. Tumoren der Klasse T1, T2, T3 sind potentiell resektabel, währenddessen T4 Tumoren aufgrund des invasiven Wachstums benachbarter Gefäße als nicht resezierbar gelten [33].

Stage	Grad des Primärtumor (T)	Regionale Lnn. (N)	Fernmetastasen (M)	Mediane Überlebenszeit* (Monate) Ø OP (ohne Resektion)	Mediane Überlebenszeit* (Monate) Pankreatektomie
IA	T1	N0	M0	6,8	24,1
IB	T2	N0	M0	6,1	20,6

IIA	T3	N0	M0	6,2	15,4
IIB	T1, T2 oder T3	N1	M0	6,7	12,7
III	T4	N0 oder N1	M0	7,2	10,6
IV	T1, T2, T3 oder T4	N0 oder N1	M1	2,5	4,5
				_____	_____
				Total: 3,5	Total: 12,6

Tabelle 1 Tumorstaging mit TNM-Klassifikation [50], * [51], [33]

Bei Primärtumoren, die die Blutgefäße A. mesenterica superior oder den Truncus coeliacus infiltrieren, ist eine Resektion des Primärtumors nicht möglich (T4). Bei Patienten, bei welchen der Tumor lokal fortgeschritten ist und vermutlich bereits in umliegende Gefäße, wie die V. mesenterica superior, die Pfortader oder die V. lienalis eingewachsen (T3) ist, sollte trotzdem eine Resektion versucht werden [33, 52].

3.9 Therapiestrategien und Prognose

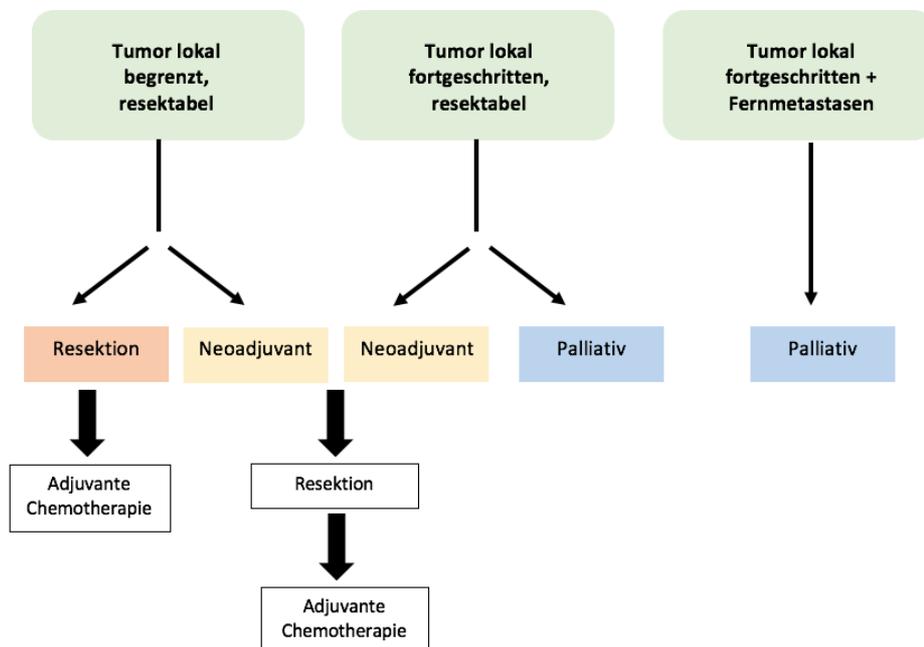


Abbildung 3 Therapiestrategien beim PDAC

Abhängig vom Krankheitsstadium stehen mehrere Therapieoptionen beim Pankreaskarzinom zur Verfügung:

1. die chirurgisch-kurative Intervention
2. die adjuvante/neoadjuvante Therapie
3. die palliative Versorgung, um den Krankheitsverlauf zu verlangsamen und die Symptome zu lindern

3.9.1 Die chirurgisch-kurative Intervention

In Abhängig von der Primärtumorgröße und dessen (lokal) invasiven Wachstums sowie des Allgemeinzustandes/Komorbiditäten des Patienten, sollte sorgfältig die geeignete Therapie oder Therapiekombination gewählt werden. Prinzipiell ist die chirurgische Resektion eines Pankreaskarzinoms mit Ziel einer R0-Resektion [53] bei Patienten ohne Fernmetastasen und ohne Wachstum in die A. mesenterica superior, die effektivste Therapie [54] und stellt die einzig kurative Therapiemöglichkeit mit dem besten Prognosefaktor dar [55-57]. Die mediane post-operative Überlebenszeit bei einer R0-Resektion liegt bei 24,6 Monaten, bei einer R1-Resektion bei 11,9 Monaten und bei einer R2-Resektion bei nur 8,9 Monaten [58]. Grundsätzlich sollten resezierbare Tumore entfernt werden. Laut Doi et. al ist die mediane Überlebenszeit bei chirurgisch therapierten Patienten signifikant höher als bei Patienten mit alleiniger Radiochemotherapie. Ebenso ist die 5-Jahres Überlebensrate nach Resektion bei 10% und bei alleiniger Radiochemotherapie bei 0% [54]. Meist ist allerdings die Resektion aufgrund der sehr spät gestellten Diagnose und des bereits stark fortgeschrittenen Krankheitsstadiums nicht mehr möglich [57]. Bei nur etwa 20% der Patienten ist der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnose noch resektabel [59, 60]. Patienten, bei denen die Krankheit weit fortgeschritten und vorerst keine Resektion des Tumors möglich ist, werden neoadjuvant, perioperativ und/oder palliativ versorgt.

Das operative Vorgehen ist abhängig von der Lage des Tumors, dem Stadium, der Tumorgöße und dem infiltrativen Wachstum. Die OP-Techniken sind:

Duodenopankreatektomie (klassische Whipple'sche Operation) bei Pankreaskopfkarzinomen. Hierbei werden der Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase inklusive des Ductus choledochus und Teile des Magen reseziert.

Bei der pyloruserhaltenden Pankreaskopfresektion (PPPD-Magenausgang-erhaltende Whipple'sche Operation) wird die partielle Entfernung des Magens unterlassen, wodurch die physiologische gastrointestinale Motorik erhalten bleibt. Weitere OP-Techniken sind die distale Pankreatektomie (Pankreaslinksresektion) meist in Verbindung mit einer Splenektomie, aufgrund betroffener Lymphknoten bei Tumorlokalisierung in Pankreaskörper oder -schwanz und als letztes die totale Pankreatektomie (Resektion von Pankreas, Duodenum, Gallenblase, und Milz) [33, 47]. Indikationen für eine totale Pankreatektomie sind beispielweise, wenn keine pankreatische Anastomose möglich ist, starke Blutungen nach einer Pankreasanastomose auftreten oder das Vorhandensein von Tumorrestgewebe nach einer partiellen Resektion. Um postoperative

Komplikationen möglichst gering zu halten, empfiehlt es sich, die Milz, falls möglich nicht zu reseziieren [61].

5 Jahre postoperativ sind etwa nur noch 15-20% der Patienten am Leben, die meisten Patienten sterben aufgrund von Rezidiven oder Metastasen. Dies bestätigt, dass die chirurgische Resektion alleine nicht ausreichend für eine kurative Therapie ist [62].

3.9.2 Die adjuvante/neoadjuvante Therapie

Im Anschluss an eine chirurgische Resektion des Primärtumors sollte innerhalb von 6 Wochen postoperativ eine unterstützende adjuvante Therapie beginnen, um Rezidiven und ggf. vorhandenen Mikrometastasen entgegenzuwirken. Die Chemotherapie sollte für 6 Monate durchgeführt werden [4, 47]. Sowohl die krankheitsfreie/progressionsfreie Zeit, als auch die mediane Überlebenszeit der Patienten können dadurch signifikant verlängert werden. Eine Studie aus dem Jahr 2001 zeigte, dass sich die mediane Überlebenszeit bei Patienten mit adjuvanter Chemotherapie postoperativ signifikant erhöht (19,7 Monate zu 14,0 Monaten) [63]. Laut Oettle et. al haben Patienten mit einer Gemcitabin-Therapie eine signifikant höhere krankheitsfreie Zeit im Vergleich zu nicht adjuvant therapierten Patienten (13,4 Monate vs. 6,9 Monate). Auch die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) bei Gemcitabin behandelten Patienten war nahezu doppelt so hoch, wie bei nicht-adjuvant behandelten Patienten mit 22,5% zu 11,5% [64, 65].

Zwischen den Zytostatika Gemcitabine und 5-Fluorouracil (5-FU)+Leucovorin wurden keine Unterschiede in Bezug auf die Gesamtüberlebenszeit gezeigt, auch die mediane progressionsfreie Überlebenszeit von 14,3 Monaten bei Gemcitabin bzw. 14,1 Monaten bei 5-FU+Leucovorin therapierten Patienten zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied [66].

Allerdings zeigt eine Studie von 1997, dass Gemcitabine bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom eine bessere Symptomlinderung erreicht, im Gegensatz zu 5-FU [67]. 2010 wurde gezeigt, dass beide Zytostatika erhöhte Nebenwirkungen wie Stomatitis, Diarrhoe oder eine hämatologische Toxizität aufwiesen [66]. Da bei den meisten Patienten, wie bereits erwähnt, zum Zeitpunkt der PDAC Diagnose die Erkrankung weit fortgeschritten und zunächst als nicht resezierbar gilt, können perioperativ Chemotherapie oder Chemoradiotherapie angewendet werden. Dies dient der Minderung der Tumorgröße, um anschließend ein R0-/R1-Operationsergebnis zu ermöglichen.

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem, nicht resezierbarem Pankreastumor kann mithilfe einer perioperativen neoadjuvanten Therapiestrategie bei bis zu 40% der Patienten eine R0-/R1-Resektion erreicht werden [58].

Auch die Überlebenszeit von primär resezierten Tumoren mit anschließender Chemotherapie war ähnlich zu Patienten mit perioperativer neoadjuvanter Therapie und anschließender Resektion [68].

Aktuelle Empfehlungen zu neoadjuvanten Therapien bei metastasiertem PDAC sind die Kombinationstherapie FOLFIRINOX, sowie die nab-Paclitaxel/Gemcitabin-Therapie.

Die FOLFIRINOX Kombinationstherapie ist aus Folinsäure (Leucovorin), 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin zusammengesetzt. Voraussetzungen für diese Therapie sind ein günstiges Risikoprofil in Bezug auf einen guten ECOG-Performance-Status (0 oder 1; Eastern Cooperative Oncology Group von 0-5 → 0 normale, uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung, 5 tot), normale oder nur gering veränderte Bilirubinwerte sowie ein Patientenalter von maximal 75 Jahren [69]. Die Überlebensraten bei Patienten mit FOLFIRINOX Therapie sind teilweise mehr als doppelt so hoch wie die Überlebensraten bei Gemcitabin therapierten Patienten. Die 6 bzw. 18 Monate Überlebensrate bei FOLFIRINOX Therapie vs. Gemcitabin therapierten Patienten liegen laut einer Studie von 2011 bei 6 Monaten 75,9% zu 57,6% bzw. bei 18 Monaten bei 18,6% zu 6,0%.

Das mediane Überleben bei einer FOLFIRINOX Therapie liegt über der medianen Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit einer Gemcitabin Therapie (siehe Kapitel 1.9.3 palliative Versorgung) [69]. Zudem wurde das progressionsfreie Überleben durch eine FOLFIRINOX Therapie im Gegensatz zur Gemcitabin Therapie von 3,3 Monaten auf 6,4 Monate verlängert [69].

Eine Studie aus 2013 berichtete über die Erstlinientherapie mit der Kombination nab-Paclitaxel und Gemcitabin im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie. Bei der Kombination konnte eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 8,5 Monaten erreicht werden im Gegensatz zu einer Monotherapie mit Gemcitabin, bei welcher die mediane Gesamtüberlebenszeit bei 6,7 Monaten lag. Auch die 1-Jahres-Überlebensrate (1-JÜR) lag bei der Kombinationstherapie nab-Paclitaxel-Gemcitabin bei 35% im Vergleich zu 22% bei der Gemcitabin-Gruppe. Zudem war das mediane progressionsfreie Überleben bei der Kombinationstherapie im Gegensatz zur Gemcitabintherapie verlängert (5,5 Monate zu 3,7 Monate) [70].

3.9.3 Die Palliative Versorgung

Bei 30-40% der Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnose der Tumor bereits lokal fortgeschritten [68]. Um Krankheitssymptome und Lebensqualität dieser Patienten mit dem primären Ziel die Resektabilität des Tumors zu erreichen, werden Patienten mit lokal fortgeschrittenem PDAC, Rezidiven oder bei vorhandenen Fernmetastasen palliativ versorgt. Voraussetzung für eine palliative Therapie ist ein guter Allgemeinzustand des Patienten. Die mediane Gesamtüberlebenszeit bei palliativ versorgten Patienten liegt gerade mal bei 9-10 Monaten [33].

Eine Studie von 1997 hat ergeben, dass sich Gemcitabin als Erstlinientherapie beim lokal fortgeschrittenen PDAC besser eignet als 5-FU. Gemcitabin hat eine signifikant verbesserte tumorbezogene Schmerzausschaltung, sowie eine signifikant erhöhte mediane Überlebenszeit (5,65 Monate vs. 4,41 Monate) [67]. In neueren Studien wurde eine Kombinationstherapie aus Leucovorin, Oxaliplatin, Irinotecan, und Fluorouracil (FOLFIRINOX) mit einer Gemcitabin-Monotherapie bei Patienten mit metastasiertem PaCa verglichen. Es stellte sich heraus, dass die

1-JÜR bei einer FOLFIRINOX- Therapie mit 48,4% doppelt so hoch, verglichen mit einer Gemcitabin-Therapie (20,6%) ist. Auch die mediane Gesamtüberlebensrate ist mit einer FOLFIRINOX-Therapie um 4,3 Monate gestiegen.

Neben der palliativen Chemotherapie, sind auch supportive Therapieziele wie Schmerzausschaltung, Verringerung belastender tumorbezogener Symptome und Erhaltung/Verbesserung der Lebensqualität von großer Bedeutung.

3.10 Physiologie und Anatomie des Pankreas beim Tier

Beim Tier wird das Pankreas wie beim Mensch ebenfalls in drei Teile unterteilt, nämlich einen mittleren Pankreaskörper (Corpus pancreatis), einen rechten Duodenalschenkel (Lobus pancreatis dexter) sowie einen linken Milzschenkel (Lobus pancreatis sinister). Abhängig von der Tierart besitzt das Pankreas einen bzw. zwei Sekretausführungsgänge, den Ductus pancreaticus und den Ductus pancreaticus accesorius. Die Mündung befindet sich in Abhängigkeit des Ductus entweder direkt im Duodenum oder gemeinsam mit dem Gallengang (Ductus choledochus) im Duodenum (Abschnitt des Dünndarms).

Wie beim Menschen, besitzt auch das Tier Langerhans'sche Inseln (Insulae pancreatici), allerdings im Unterschied zum Menschen nur mehrere Tausende. Auch hier werden die Hormone Insulin und Glucagon für die Regulierung des Blutzuckerspiegels gebildet, sowie der wachstumshemmende Faktor Somatostatin [71].

3.10.1 Erkrankungen des Pankreas beim Kleintier

Im Allgemeinen kommen Pankreastumore bei allen Tieren äußerst selten vor, zumeist nur als Zufallsbefund.

Pankreasadenome und Pankreasadenokarzinome kommen am ehesten bei Kleintieren, wie Hund und Katze vor. Bei beiden Tumorarten ist hauptsächlich der exokrine Teil des Pankreas betroffen. Pankreasadenome gehen meist von den Azinuszellen aus und kommen, wenn überhaupt, nur bei Katzen vor. Eine eindeutige histologische Differenzierung zwischen einer nodulären Hyperplasie und einem Pankreasadenom ist nicht möglich. Pankreaskarzinome betreffen das Gangepithel oder die Azinuszelle. Wie auch beim Menschen ist die Konsistenz durch desmoplastische Reaktionen tumortypisch sehr derb und fest.

Auch bei Tieren metastasiert der Tumor früh in benachbarte Organe und Gewebe wie Leber, Darm, Lunge, Lymphknoten (wie Lymphonodi pancreaticoduodenales (falls vorhanden) und den rechten Leberlymphknoten) und in das Peritoneum, wo er meist multiple Knoten bildet.

Differentialdiagnostisch für Pankreasadenome und Pankreaskarzinome kommt vor allem die noduläre Hyperplasie in Frage [72].

Das Pankreaskarzinom bei Tieren entsteht häufig im mittleren Bereich bzw. im Pankreaskopf und selten im Pankreasschwanz. Durch diese Lokalisation entsteht eine ähnliche Symptomatik wie beim Menschen, beispielsweise ein Gallengangsstau mit Ikterus, abdominaler Schmerz und Kachexie des Patienten sind üblich.

Eine Studie aus 2004 über das Pankreasadenokarzinom bei der Katze berichtete über die Vielseitigkeit in der Symptomatik, der Variabilität im Alter der Tiere (4-20 Jahre), der Rasse, dem Geschlecht, dem Gewicht und auch über die vielseitigen Veränderungen der Laborparameter.

Symptome sind vor allem Anorexie (75%), Erbrechen (63%), abdominaler Schmerz (38%), eine palpierbare abdominale Umfangsvermehrung und/oder Ikterus. Bei Katzen sind zusätzlich paraneoplastische Symptome, wie eine symmetrische Alopezie im Gesicht, der unteren Körperhälfte sowie medial der Gliedmaßen bekannt [73]. In Bezug auf Laborwerte lässt sich vor allem eine Leukozytose und veränderte Leberwerte feststellen.

Für die Diagnose beim Kleintier eignet sich vor allem ein abdominaler Ultraschall aber auch eine Röntgenaufnahme des Abdomens kann gegebenenfalls röntgendichtere Strukturen zu erkennen geben.

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik und einer frühen Metastasierung ist auch hier die Mortalität hoch und die Überlebenszeit sehr niedrig [74-76].

Aufgrund der weitreichenden Funktionen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren im Organismus und ihrer großen klinischen Bedeutung in Bezug auf die Wirkung vieler bereits bestehender Arzneimittel ist diese Superfamilie von großer Bedeutung, vor allem aber auch für die Neuentwicklung von Arzneimittel als Bestandteil neuer Therapiemöglichkeiten gegen das PDAC.

3.11 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR- G-Protein-coupled receptors)

Zur Superfamilie der G-Protein (Guanosintriphosphat-bindende Proteine, GTP-bindende Proteine) gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören ca. 800 Transmembran-Rezeptoren [77, 78]. Damit stellen sie die größte Klasse der Membranproteine in Säugetiergenomen dar.

Sie nehmen an verschiedenen physiologischen Funktionen, wie z.B. der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden für Zellproliferation- und motilität, Embryogenese, Wundheilung, Inflammation aber auch an pathologischen Zellfunktionen, wie dem Tumorwachstum, der Angiogenese und der Metastasierung teil [78, 79]. Die meisten Medikamente (44%) haben Rezeptoren als Zielstruktur, wovon etwa 19% gegen GPCRs gerichtet sind. Somit sind ungefähr 36% der Arzneimittel gegen GPCRs gerichtet, wodurch sie eine wichtige Quelle bei der Entwicklung neuer Arzneimittel darstellen [78, 80]. Die GPCRs können in fünf Familien aufgeteilt werden und alle besitzen sieben transmembrane Untereinheiten als strukturelle Gemeinsamkeit.

Die fünf Familien sind: die Rhodopsin-Familie (701 Mitglieder), die Adhäsions-Familie (24 Mitglieder), die Frizzled/Taste-Familie (24 Mitglieder), die Glutamat-Familie (15 Mitglieder) und die Secretin-Familie (15 Mitglieder) [77].

Einige der GPCR-Rezeptoren sind bis heute noch nicht vollständig auf deren molekulare Funktionen und endogene Liganden erforscht. Daher werden diese als "orphan receptors" (Rezeptorwaisen) bezeichnet [81, 82].

Auch die Lgr-Rezeptoren (Leucin-reiche Rezeptoren, Leucin-reich repetierenden G-Protein gekoppelte Rezeptoren) gehörten lange Zeit zu den "orphan receptors", allerdings wurden diese 2011 „deorphanized“. Die R-Spondine 1-4 (roof plate-specific spondin; RSPO1-4) wurden als Liganden für die Rezeptoren Lgr4-6 identifiziert. Sie verstärken Prozesse der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade und führen zur Proliferation epithelialer Zellen. Des Weiteren stellen die Lgr-Rezeptoren Marker für gewebensansässige Stammzellen in verschiedenen Organen, wie der Niere oder dem Darmepithel dar [83, 84]. Diese sezernierten Proteine (RSPO1-4), fungieren als Agonisten in der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade und potenzieren ein vorbestehendes Signal durch Bindung der Lgr-Rezeptoren [82, 85-89].

3.11.1 Aufbau und Rolle des Lgr4-Rezeptors

Der Lgr4-Rezeptor, auch GPR48 genannt, ist ca. 107kb groß und gehört zur rhodopsinartigen Familie der GPCRs. Die chromosomale Lokalisation ist noch nicht eindeutig geklärt. Laut Hsu et al. ist das Gen auf 5q34-35.1 und laut Nakata et al. 2014 befindet es sich auf Chromosom 11 Position 11p14-p13. Der Lgr4-Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Domäne mit 17 „leucin-rich repeats“ (LRRs), wobei jede aus 24 Aminosäuren besteht und zur Bindung der Liganden dient. Diese Wiederholungssequenzen (LRRs) besitzen jeweils eine N-terminale Kappe (LRR-NT) am Anfang und eine C-terminale Kappe (LRR-CT) am Ende. Zwischen den 17 LRRs und den 7 Transmembrandomänen (TM) liegt die LRR-CT-Region (Hinge-region). Diese verbindet die 7TM mit den LRRs. Am Ende der transmembranären Segmente befindet sich intrazellulär der C-Terminus zur Interaktion der Signalproteine (siehe Abb.4) [78, 90-92].

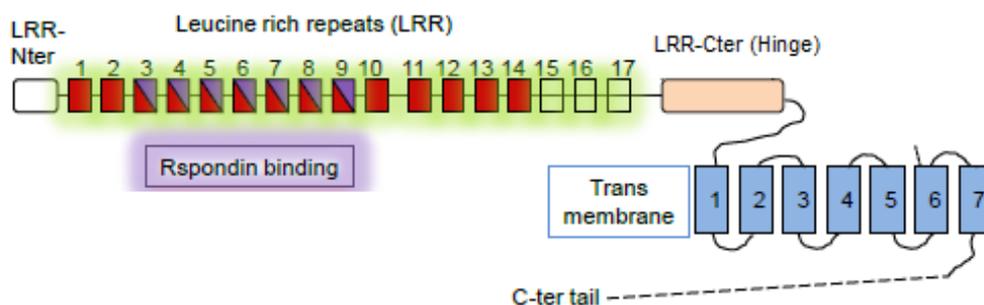


Abbildung 4 Aufbau des Lgr4-Rezeptors, modifizierte Abbildung [92], mit freundlicher Genehmigung von Frau M. I. Garcia, Ph.D

Die Expressionsmuster, sowie der Aufbau des Lgr4- und Lgr5-Rezeptors weisen mit 45% eine hohe Ähnlichkeit auf [90, 93-95]. Aufgrund des weit verbreiteten Expressionsmusters nimmt der Lgr4-Rezeptor eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung verschiedener Organe ein. Eine hohe Expression ist unter anderem in den Nieren, den Ovarien, Darm, Leber, Knochen und Haaren zu beobachten [83, 93, 95].

Ein Lgr4-Knockout bei Mäusen führt zu embryonaler und perinataler Letalität oder seltener kurze Zeit nach der Geburt zum Tod. Diese hohe Letalität zeigt die Bedeutung des Lgr4-Gens für das Überleben und das Wachstum neugeborener Mäuse.

Mäuse mit einem Lgr4-Mangel dagegen, weisen vielseitige Abnormalitäten verschiedener Organe und erhebliche Entwicklungsstörungen auf [95]. Unterentwickelte abnormale Organe sind beispielsweise Nieren, Gallenblase [83, 94] aber auch Entwicklungsstörungen der Zähne [96], der Haarfollikel mit daraus resultierenden Alopezien sind zu beobachten [94, 97]. Des Weiteren kann es zu Malformationen der Augenlider kommen, wodurch es zu geöffneten Augen der Mäuse bei der Geburt kommt, Microphthalmie, Irishypoplasie sowie Iridocorneale Malformationen etc. [98, 99].

Eine weitere Folge des Lgr4-Mangels ist die Beeinträchtigungen des Darmtrakts, dies ist vor allem bei der embryonalen Entwicklung zu beobachten. Beispielsweise weisen diese Mäuse 15 Tage postnatal, aufgrund einer verminderten Paneth-Zell-Differenzierung, eine deutlich reduzierte Tiefe der Lieberkühn'schen Krypten [94, 100] auf.

Die Ergebnisse einer Studie aus 2009 zeigten, dass infolge eines Lgr4-Mangels die Gallenblase, sowie der Gallengang bei 100% der Mäuse nicht ausgebildet war, woraus sich schließen lässt, dass die Expression des Lgr4-Rezeptors auch hier von großer Bedeutung ist. Nicht betroffen war allerdings das umliegende Gewebe, wie beispielsweise der Ductus hepaticus communis [101]. Abnormalitäten betreffen auch den männlichen Geschlechtstrakt, bei welchem es unter anderen Störungen auch zur Entwicklung eines hypoplastischen Nebenhodens kommt [102].

Aufgrund dieser pleiotropen Effekte, denen der Lgr4-Rezeptor zugrunde liegt, sterben Mäuse mit einem Lgr4-Mangel meist sogar noch vor oder sehr kurze Zeit nach der Geburt. Kennzeichnend ist hier eine deutliche Unterentwicklung der Tiere, welche sich durch ein stark reduziertes Geburtsgewicht (14% geringeres Geburtsgewicht) mit deutlich verkleinerten Organen, wie Nieren oder Leber, bemerkbar macht [83, 93, 95]. Des Weiteren hat der Lgr4-Rezeptor ebenso eine bedeutende Rolle bei der Proliferation epithelialer Zellen. Hier zeigt sich als Folge eines Lgr4-Mangels eine bis zu 50% retardierte epitheliale Zellproliferation [100, 103].

3.11.2 Der kanonische Wnt-/ β -Catenin Signaltransduktionsweg

Der kanonische Wnt-Signalweg (auch β -Catenin-abhängiger Signalweg genannt) ist essentiell für das normale Zellwachstum, die Embryogenese, Zellproliferation, Differenzierung und die Gewebemöostase in adultem Gewebe [104, 105]. Defekte im Wnt-Signalweg oder eine

aberrante Aktivierung stehen unter anderem in Verbindung mit Krankheiten wie Kolonkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Brustkrebs, degenerativen Erkrankungen, Knochenerkrankungen, Diabetes etc. [106].

Im Wnt-Signalweg werden 2 Stadien unterschieden. Ein „on State“ mit der Präsenz und Bindung eines Wnt-Liganden und der daraus resultierenden Aktivierung der Signalkaskade, sowie ein inaktives Stadium („off State“) ohne einen Wnt-Liganden, bei welchem das Protein β -Catenin in einem Proteinkomplex gebunden vorliegt.

Dieser Proteinkomplex (β -Catenin-Destruktionskomplex oder Degradationskomplex) befindet sich im Zytoplasma und sorgt mithilfe seiner Bestandteile dafür, dass β -Catenin ständig abgebaut wird und somit nicht die Transkription bestimmter Wnt-Zielgene aktivieren kann. Bestandteile des Proteinkomplexes sind:

das Gerüstprotein Axin1/2, das Adenomatous-polyposis-coli Protein (APC), ein Tumorsuppressorprotein und 2 Kinasen, der Glykogensynthase-Kinase3 β (GSK3 β , Enzym) und der Casein-kinase 1 α (CK1 α , Enzym) [107]. Mithilfe der beiden Serine/Threonine Kinasen wird das intrazelluläre Protein β -Catenin an den Stellen Ser45 (CK1 α), Ser33, Ser37 und Thr41 (GSK3 β) phosphoryliert [108, 109] und dies wird durch die zwei Proteine Axin und APC unterstützt [107, 110-113].

Durch das Anhängen der Phosphorylgruppen wird es durch das F-box Protein beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase (β -TrCP) gebunden und ubiquitiniert. Dadurch wird β -Catenin letztendlich für den Abbau im 26S Proteasom markiert [114-116]. Aufgrund des ständigen β -Catenin Abbaus wird die β -Catenin Konzentration im Zytoplasma geringgehalten und es findet keine Translokation in den Nukleus statt. Im Nukleus binden anstelle des β -Catenin transkriptionelle Repressoren der Groucho Familie (TLE- transducin-like enhancer of split und CtBP- C-terminal binding Protein) an TCF/LEF (T-cell factor/lymphocyte enhancer factor), welche Histon-Deacetylasen (HDACs) aktivieren und Acetylreste der DNA entfernen. Durch diese komprimierte DNA wird die Expression Wnt-spezifischer Gene blockiert [117-120].

Bei Bindung eines Wnt-Liganden an den Frizzled-Rezeptor (FZD) [121, 122] und dessen Co-Rezeptor, low-density lipoprotein receptor related proteins 5 and 6 (LRP5/6) wird die Signaltransduktionskaskade aktiviert. Durch Bindung Dishevelled Protein (Dsh, Dvl) an den intrazellulären C-terminalen Teil des FZD-Rezeptors und Axin1/2 kommt es zum Zerfall des β -Catenin Abbaukomplexes [123, 124].

Als Resultat des Zerfalls des Destruktionskomplexes wird β -Catenin nicht abgebaut, sondern stabilisiert sich im Zytoplasma. Folglich steigt die β -Catenin Konzentration im Zytoplasma an. Durch diese Akkumulation kommt es zur Translokation von β -Catenin in den Nucleus, wo es mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF als Cofaktor agiert und die Transkription spezifischer Wnt-Zielgene induziert [118, 125].

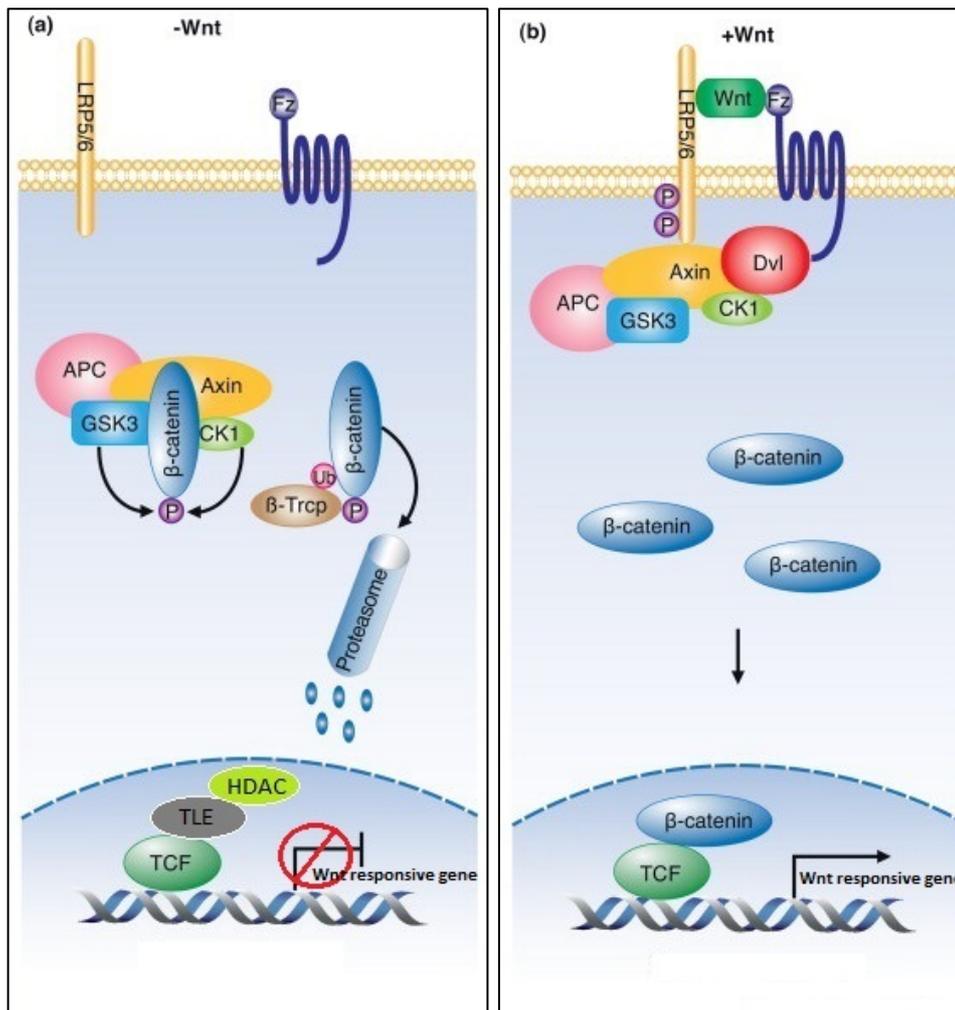


Abbildung 5 Übersicht des kanonischen Wnt-Signalwegs, modifizierte Abbildung [126], mit freundlicher Genehmigung des ELSEVIER Verlag

a) Links off-state:

Ohne Wnt-Liganden Bindung an die Rezeptoren (FZD und LRP5/6) liegt β-Catenin gebunden im Destruktionskomplex vor und wird mithilfe der Kinasen, GSK3β und CSK1α phosphoryliert, durch β-TrCP ubiquitiniert und anschließend im Proteasom zerstört. Im Nucleus befindet sich kein β-Catenin, wodurch keine Genexpression Wnt-spezifischer Gene stattfindet. Es bindet stattdessen der transkriptionelle Repressor TLE an TCF, welcher die HDACs aktiviert.

b) Rechts on-state:

Durch Bindung eines Wnt-Liganden an den FZD und seinen Co-rezeptor LRP5/6 wird die Signalkaskade aktiviert und das Dvl-Protein rekrutiert. Aufgrund der Bindung von Dvl an den FZD- Rezeptor und einer Phosphorylierung des LRP-Rezeptors kommt es zum Zerfall des β-Catenin Destruktionskomplexes. Dadurch stabilisiert und akkumuliert das intrazelluläre β-Catenin. Anschließend wird β-Catenin in den Nucleus transloziert, wo es an TCF bindet, als transkriptioneller Co-Aktivator arbeitet und zur Expression Wnt-spezifischer Gene führt.

Ergebnisse einer Studie aus 2015 zeigten, dass Subpopulationen von Pankreaskarzinomzellen mit erhöhter Wnt-Aktivität Eigenschaften von Krebsstammzellen aufweisen (diese Tumorzellen können zum einen durch Dedifferenzierung entstehen oder aus fehlregulierten kleinen Stammzellpopulationen hervorgehen). Einige Krebszellen besitzen essentielle Stammzeleigenschaften, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation in verschiedene Zelltypen, daher werden sie auch als Tumorstammzellen oder Krebsstammzellen

(CSC- Cancer stem cells) bezeichnet. Diese Krebsstammzellen werden durch einen Lgr-RSPO-Komplex reguliert [127] aus diesem Grund gehe ich im Weiteren näher auf die Definition und Funktion der Stammzellen und Krebsstammzellen ein.

3.12 Stammzellen

Multipotente Stammzellen werden im Allgemeinen als Zellen, die das Potenzial haben sich selbst zu erneuern und sich unbegrenzt zu vermehren, sowie die Fähigkeit besitzen sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, definiert. Stammzellen sind daher für die Entwicklung und Erhaltung des Gewebes, sowie für die Wundheilung und Regeneration zuständig.

Bei der Selbsterneuerung (*self-renewal*) entstehen bei symmetrischer Teilung zwei Tochterzellen, die wieder Stammzellen sind. Bei asymmetrischer Teilung entstehen eine Tochterzelle und eine Progenitorzelle (Vorläuferzelle). Die Progenitorzelle differenziert sich in einen Zelltyp des jeweiligen Gewebes (gewebs- und organspezifisch) und ist überwiegend für die Regeneration und Erhaltung des Gewebes zuständig. Die Stammzell-Tochterzelle ist für die Erhaltung des Stammzell-Pools zuständig. Somit ist für die Regulierung und Erhaltung des Stammzell-Pools eine Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von essentieller Bedeutung.

Die Stammzellen befinden sich in einem „*quiescent*“ Stadium (G0-Ruhestadium) und werden durch extrinsische und intrinsische Faktoren reguliert, wodurch sie in den jeweiligen Zellzyklus eintreten. [128-132].

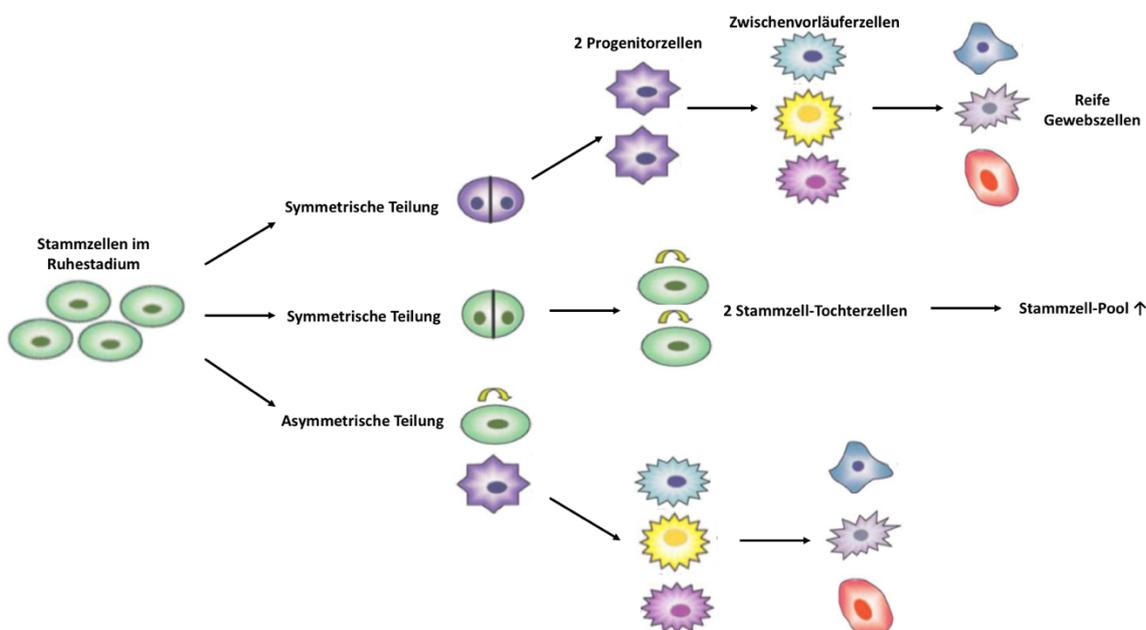


Abbildung 6 Zellteilungsmechanismen der Stammzellen, modifizierte Abbildung [128], mit freundlicher Genehmigung von Herr J. Cai, Ph.D

Die Stammzellen befinden sich im Ruhestadium „*quiescent*“ oder treten in den Zellzyklus ein. Im Zellzyklus findet eine symmetrische oder asymmetrische Zellteilung statt, bei welcher Tochterstammzellen und/oder Progenitorzellen entstehen. Die Progenitorzellen differenzieren sich anschließend zu gewebspezifischen Zelltypen.

3.13 Krebsstammzellen

Wie bereits erwähnt besitzen einige Krebszellen essentielle Stammzeleigenschaften, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Proliferation in verschiedene Zelltypen. Somit haben normale Stammzellen, wie auch CSCs das Potenzial in normales gesundes Gewebe, wie auch in abnormales Gewebe zu proliferieren. Es wurden bereits gewisse Parallelen in der Regulierung durch die Signalwege zur Selbsterneuerung in normalen Stammzellen und CSCs nachgewiesen, allerdings ist bisher unklar, ob CSCs von Beginn an die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen oder ob sie diese erst durch weitere Differenzierungen erlangen [72]. Bis heute sind CSCs nicht vollständig erforscht und der Ursprung der pluripotenten Stammzellen in den Tumoren variiert.

Aktuelle Erkenntnisse zeigen allerdings, dass CSCs unter anderen in soliden Tumoren auch im PDAC vorhanden sind. Diese CSC weisen eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf und sind verantwortlich für ein invasives (metastatisches) Wachstum [133].

3.14 Ziele der vorliegenden Arbeit

Aufgrund einer starken Therapieresistenz, einer schneller Metastasierungsrate und einer hohen Rezidivgefahr, besteht eine sehr schlechte Prognose für Patienten mit einem PDAC und dieses Karzinom nimmt daher den Platz der vierthäufigsten Krebstodesursache weltweit ein.

Ursachen hierfür sind möglicherweise das Vorhandensein von Krebsstammzellen (CSCs). Wie bereits erwähnt zeigen Subpopulationen von Pankreaskarzinomzellen mit erhöhter Wnt-Aktivität Eigenschaften von CSCs auf und werden u.a. durch den Lgr-RSPO-Komplex reguliert. [127]. Aufgrund dieser Voruntersuchungen besteht das Ziel dieser Arbeit darin, den Einfluss des Lgr4-Rezeptors in Bezug auf das Tumorneubildungspotential, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und die Metastasierungsfähigkeit *in vivo* zu untersuchen.

Mithilfe einer Expressionsanalyse verschiedener Pankreaskarzinomzellen (KPC/KPCZ) soll geprüft werden, inwiefern die Lgr4-Expression das Tumorwachstum und die Metastasierung im PDAC beeinflusst.

Die Experimente wurden mit den KPC/KPCZ Zelllinien durchgeführt. Diese Primärzelllinien wurden aus Tumoren von Mäusen (Stammhintergrund C57BL/6) isoliert, kultiviert und anschließend mithilfe einer PCR die Reinheit der erzeugten Krebszellpopulationen überprüft.

Mit vier dieser Zelllinien wurden die *in vitro* sowie *in vivo* Versuche durchgeführt.

4 Material-und Methodenteil

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Verwendete Materialien	Bezeichnung	Hersteller
6, 12, 24-Well-Platte	Nunc 6-Well Plate, Nunclon™ delta surface	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
96-Well-Platte (beschichtet), 96-Well-Platte (flach)	Corning ultra-low attachment Surface, TC-Platte 96 Well Standard F	Sigma-Aldrich, Steinheim
2ml, 5ml, 10ml Stripetten	Costar serological pipet	Corning, Wiesbaden
25ml, 50ml Stripetten	Cellstar serological pipet	Corning, Wiesbaden
0,1-2,5; 0,5-10µl; 10-100µl; 20-200µl, 100-1000µl Pipetten	Laborpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
0,1-2,5; 0,5-10µl, 100-200µl, 100-1000µl Pipettenspitzen	Laborpipetten epT-I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg
PCR clean Tubes 0,2ml; 0,5ml	PCR clean Tubes 0,2ml; 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
PCR Pipettenspitzen 0,1- 2,5; 0,5-10µl, 100-200µl, 100-1000µl	TipOne Bevelled Filter Tips (sterile) DNase-, RNase-, DNA-&Pyrogen-Free	STARLAB GmbH, Hamburg
Einfrierbehälter	Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Entwicklerkassette	Hypercassette	GE healthcare, München
15ml Falcon	Zentrifugenröhrchen 15	TPP- Sigma Aldrich, Steinheim
50ml Falcon	50ml Polypropylene Conical Tube	Falcon, A Corning Brand, Wiesbaden
Dako Pen	Hydrophobic pen	k.A.
Deckgläschen	20x26x0,4mm	Menzel Gläser, VWR, Darmstadt
Detektionsreagenz	ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München

Einbettkassetten	Rotilabo-Einbettkassetten, Spezialpolymer, blau	Carl Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen	5ml Polystyrene Round- Bottom Tube	Falcon, A Corning Brand, Wiesbaden
Filterpapier	Whatman Filter Paper	Bio-Rad, München
Film	Amersham Hyperfilm™ ECL, High performance chemiluminescence Film	Amersham Biosciences, Freiburg
Handschuhe Größe S/7	ecoSHIELD Eco Nitrile PF250	Shield Scientific, Bennekom, Niederlande
Kryoröhrchen	CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific Nunc, Darmstadt
Membran	Nitrocellulose-transfer Membran	LI-COR, Frankfurt
Mikroreaktionsgefäß 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml	Safe-Lock Tubes 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multistepperaufsatz 100µl, 1ml	Combitips plus 5ml, 50ml	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger	Glass slides	Marienfeld- Superior, Lauda-Königshofen
Petrischale	Nunc™ Petri Dishes	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Tube mit Filterdeckel	Falcon 5ml Round Bottom Polystyrene Test Tube with Cell Strainer Snap Cap	Corning, Wiesbaden
Zellkulturflaschen T25, T75, T175 mit Schräghals	Nunc Easy Flask 25,75,175 mit 25cm ² , 75cm ² und 175cm ² Bodenfläche	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Zellschaber	Cell Scraper M	TPP- Sigma Aldrich, Steinheim
Zellsieb 40µm, 70µm, 100µm	Cell Strainer 40µm, 70µm, 100µm Nylon	Falcon, A Corning Brand, Wiesbaden
Zellzähler	Mechanischer Zellzähler	VWR, Darmstadt

4.1.2 Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte

Laborgerät	Bezeichnung	Hersteller
Accu-Jet	Accu-Jet pro	Brand, Wertheim
Autoklav	Autoclave Unisteri	MMM Münchner Medizin Mechanik, München
Brutschrank	CO ₂ Inkubator 37°C, 5% CO ₂	Binder, Tuttlingen
Blotzelle	XCell II TM Blot Module	Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Blottkammer	XCell SureLock™ Mini-Cell	Invitrogen- Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
ChemiDoc	ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad, München
Dampfsterilisator	Varioklav Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, München
DNA-Arbeitsbank	DNA workstation	Uni Equip, München
Durchlichtmikroskop	Leitz Laborlux S Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrast	Zeiss, Oberkochen
Eismaschine		KBS, Mainz
Elektronischer pH-Meter		Knick, Berlin
FACS-Durchflusszytometer	Flow cytometer LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Feinwaage	Electronic balance FX-40	A&D, Ahrensburg
Fluoreszenzmikroskop	Fluorescence Microscope	Zeiss, Oberkochen
-20°C Gefrierschrank (Proteinlabor)		Kirsch, Willstätt-Sand
-80°C Gefrierschrank		Siemens, München
Histomat	Gewebeeinbettautomat Leica TP1020	Leica, Wetzlar
Inkubator 37°C (Proteinlabor)		Memmert, Büchenbach
Inkubator 37°C (Histologie)		Binder, Tuttlingen
Inverses Mikroskop (IM) murine Zellkultur		Zeiss, Oberkochen
Inverses Mikroskop Olympus	Olympus IX50 Phase	Olympus, Hamburg

(primäre Zelllinie)	Contrast Inverted Microscope	
Kryostat	Leica CM 1950	Leica, Wetzlar
Kühlschrank 4°C (FACS-Labor)	Kirsch und Liebherr, Willstätt-Sand, München	
4°C Kühlschrank (murine Zellkultur)	Liebherr profiline	Liebherr, Biberach
4°C Kühlschrank (Protein-Labor)	Kirsch und Siemens, Willstätt-Sand, München	
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	Janke & Kunkel, IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen im Breisgau	
Mikrotiterplatten-Lesegerät	VersaMAX ELISA Mikroplate reader	Molecular Devices, Biberach an der Riß
Mikrotom	Microm HM400 Sliding Mikrotom	Microm GmbH, Heidelberg
Mikrozentrifuge (Proteinlabor)	High speed Mini-Zentrifuge	JHB- LABTECH, Bexbach
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	
Neubauer- Zählkammer	Haemocytometer (0,100mm Tiefe, 0,0025mm ²)	LO- Laboroptik, Friedrichsdorf
Nikon Mikroskop mit Kamera	Nikon DIAPHOT 300	Nikon, Düsseldorf
Odyssey	Odyssey CLx Imaging System	LI-COR, Frankfurt
Paraffinausgießstation	Tissue-Tek TEC™ 5 Paraffinausgießkonsole	Sakura, Staufen
Power Supply	Power Supply Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Real-Time PCR	Step one PCR system	Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Röntgenfilmentwickler	Curix 60 Röntgenfilmentwickler	Agfa, Mortsels, Belgien
Schüttler (Immunfluoreszenz)	Kompaktschüttler KS-10	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler (Proteinlabor)	Kreisschüttler KM2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen

Schüttler (Proteinlabor 4°C Kühlschrank)	Mini-Wippschüttler WT16	Biometra GmbH, Göttingen
Sorter	BD FACSAria III	BD Biosciences, Heidelberg
Spülmaschine	Miele Professional	Miele, Gütersloh
StepOne PCR System		Applied Biosystem-Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Sterilbank	Sterile Bench Herasafe	Heraeus, Hanau
Stickstofftank		Air Liquide
Streckbad	Paraffinstreckbad, runde Ausführung	Medax, Neumünster
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischschüttler	Vortexer	Janke & Kunkel, IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen im Breisgau
Trockenschrank		Thermo Heraeus
Vortex-Mixer (FACS-Labor)	Vortex-Genie2	Scientific Industries (Si), New York, USA
Vortex (Proteinlabor)	Vortex Schüttler VF2	Janke & Kunkel, IKA Werke GmbH&Co. KG, Staufen im Breisgau
Waage	Digitale Waage	Mettler Toledo, Gießen
Warmwasserbad	Wasserbad, 37°C	Julabo GmbH, Seelbach
Wärmeschrank (Histologie)	Warmlagerschrank	Memmert, Büchenbach
Wecker		Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge (FACS-Labor)	Rotanta460R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge (FACS-Labor)	Rotina 48R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge (murine Zellkultur)	Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

4.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

4.1.3.1 Murine Zellkultur

Tabelle 4: Murine Zellkultur

Lösungen	Hersteller	Katalognummer
DMEM/F12	Gibco/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	11330-032
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg	20385
DPBS-steriler Waschpuffer	PAN Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
80% Ethanol	Apotheke	30062017
Fetal Bovin Serum/Fetal Calf Serum	Biochrom GmbH/ Merck, Berlin	S 0115
Gigasept	Schülke, Hamburg	125602
Methylzellulose	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	M0387
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim	P4458-100ML
RPMI 1640 Medium with L-Glutamine	Gibco/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	21875-034
Trypanblau	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	T8154
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Lonza, Köln	BE17-161E

4.1.3.2 Lösungen für das Durchflusszytometer

Tabelle 5: Lösungen für das Durchflusszytometer

Lösungen	Hersteller	Katalognummer
7-AAD Viabilität Färbelösung	BioLegend GmbH, Koblenz	420404
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomol GmbH, Hamburg	01400
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg	340345
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg	340346
Intrazellulärer Fixierpuffer	eBiosciences/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	00-8222-49
Natriumazid 10%	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main	13553

Permeabilisierungspuffer 10x	eBiosciences/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	00-8333-56
Millipore	Abteilung Anästhesie, Großhadern	

4.1.3.3 Lösungen und Chemikalien für den Western Blot

Tabelle 6: Lösungen und Chemikalien für den Western Blot

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	M6250
Ammoniumpersulfate (APS)	Serva, Heidelberg	13376.01
Blotting Puffer (10x)	Bio-Rad, München	161-0771
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	3187.4
HCl	Merck, Darmstadt	1.09057.1000
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe	UN1219
Laufpuffer (10x)	Bio-Rad, München	161-0772
Ladepuffer 4x (4x Laemmli Ladepuffer)	Bio-Rad, München	161-0747
Methanol	Merck, Darmstadt	1.06009.1000
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe	T145.2
30% Polyacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München	161-0374
Protease-inhibitor Cocktail Tabletten: complete ULTRA Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack PhosSTOP, EASYpack	Roche, Mannheim	05892791001 04906837001
RNAse-freies Wasser	Qiagen, Hilden	129112
RIPA-Lysepuffer 10x	Merck Millipore, Darmstadt	20-188
SDS	Carl Roth, Karlsruhe	2326.2
TEMED	Bio-Rad, München	161-0800
Tris Base	Bio-Rad, München	161-0716
Tween 20	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	P1379

4.1.3.4 Lösungen für die Immunfluoreszenz

Tabelle 7: Lösungen für die Immunfluoreszenz

Lösungen	Hersteller	Katalognummer
Formaldehydlösung 4%	Apotheke Großhadern	29188
Goat Serum	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	G6767
Hydrogen Peroxide 30%	Merck, Darmstadt	8.22287.1000
Klarlack	k.A.	k.A.
Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame USA	Vectashield H-1000
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	T8787

4.1.3.5 Lösungen für die PCR

Tabelle 8: Lösungen für die PCR

Lösungen	Hersteller	Katalognummer
RNaseZAP™	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	R2020

4.1.3.6 Lösungen für die Hämatoxylin Eosin Färbung

Tabelle 9: Lösungen für die Hämatoxylin Eosin Färbung

Lösungen	Hersteller	Katalognummer
Eosin Y (Yellowish)	Merck, Darmstadt	115935
Ethanol 70%	Apotheke Großhadern	
Ethanol 96%	Apotheke Großhadern	
Ethanol 99%	Apotheke Großhadern	
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck, Darmstadt	109249
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe	9713.4

4.1.4 Assays und Kits

Tabelle 10: Assays und Kits

Produkt	Hersteller	Katalognummer
iScript cDNA synthesis Kit	Bio-Rad, München	Cat#1708891
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	Cat#23225
SsoFast EvaGreen	Bio-Rad, München	Cat#172-5201
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	Cat#11754-050
Total RNA Kit peqGOLD	Peqlab a VWR brand, Darmstadt	Cat#12-6834-02

4.1.5 Rekombinante Proteine und Inhibitoren

Tabelle 11: Rekombinante Proteine und Inhibitoren

Produkt	Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
B27	B27™ Supplement (50x), minus Vitamin A	Gibco/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	Cat#12587-010
EGF	Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rh EGF)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe	Cat#11343406
FGF-β	Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic (rh FGF-b/FGF-2)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe	Cat#11343623
TGF-β1	Recombinant Human Transforming Growth Factor-beta 1 (rh TGF-β1)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe	Cat#11343160
TGF-β1	Recombinant Human TGF-β1 (HEK 293 derived)	PeproTech GmbH, Hamburg	Cat#100-21

4.1.6 Antikörper

4.1.6.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Tabelle 12: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Isotyp	End- volumen	Hersteller	Katalog- nummer
Anti-hLgr4/GPR48	APC, monoclonal	Mouse-IgG _{2B}	5µl pro 0,5x10 ⁶	R&D Systems, Minneapolis, USA	# FAB7750A
Anti-hLgr4/GPR48	PE, monoclonal	Mouse-IgG _{2B}	5µl pro 0,5x10 ⁶	R&D Systems, Minneapolis, USA	# FAB7750P
Anti-GPCR GPR48	Monoclonal	Rat-IgG _{2a}	0,6µl pro 1,0x10 ⁶	Abcam, Cambridge United Kingdom	# Ab166659
Goat Anti-Rat IgG H&L	Polyclonal,sec.Antibody	IgG	1:2000- 1:4000 100µl pro 0,5x10 ⁶	Abcam, Cambridge United Kingdom	# 150157
IsoTyp- Control	APC	Mouse IgG2b	5µl pro 0,5x10 ⁶	R&D Systems, Minneapolis, USA	# IC0041A
Mouse FC- Block™		Rat - Anti- Mouse	1µl pro 0,5x10 ⁶	BD Biosciences	# 553142

4.1.6.2 Western Blot

Tabelle 13: Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Anti-Lgr4	Sigma-Aldrich/Merck, Steinheim	# HPA 030267
Anti-GAPDH	CST, Frankfurt am Main	# 5174S
Anti-Vimentin	CST, Frankfurt am Main	# 5741S
Anti-E-Cadherin rabbit	CST, Frankfurt am Main	# 3195S
Anti-E-Cadherin mouse	CST, Frankfurt am Main	# 5296S
Anti-mouse	CST, Frankfurt am Main	# 7076S
Anti-rabbit	CST, Frankfurt am Main	# 7074S

4.1.6.3 Immunfluoreszenz

Tabelle 14: Antikörper für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Anti-Lgr4 antibody	Sigma-Aldrich/ Merck, Steinheim	# HPA 030267
Anti-E-Cadherin rabbit	CST, Frankfurt am Main	# 3195S
Fluorescein goat anti-rabbit IgG	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	# F2765
Hoechst 33342	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt	# H3570

4.1.7 Primer für die PCR

Tabelle 15: Primer für die PCR

Primer	Hersteller	Katalognummer
Mm_Lgr4_va.1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden	#QT 01065302
Mm_GAPDH	Qiagen, Hilden	#AT 00199388

4.1.8 OP Material und Pharmaka

4.1.8.1 OP-Material

Tabelle 16: OP-Material

Name/Bezeichnung lt. Hersteller	Hersteller	Artikelnummer
Kryoröhrchen mit Zellsuspension/ CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific Nunc, Darmstadt	377224
Desinfektionsspray/ Poly-Alkohol Haut	Antiseptika, Pulheim	UN1219
80% Ethanol	Apotheke Großhadern	UN1170
Gazetupfer/ Gazin	Lohmann&Rauscher GmbH & Co.KG, Neuwied	13621
Mullkompressen 7,5x7,5cm	Co.KG, Neuwied	
Gesichtsmaske/ Barrier Medical Face Mask	Mölnlycke Health Care GmbH, Düsseldorf	4236
Handschuhe Größe S 6-7/ ecoSHIELD Eco Nitrile PF250	Shield Scientific, Bennekom, Niederlande	625122
Kanülen braun/ Microlance™ 3 27G	BD Medical, Heidelberg	303800
Kanülen gelb/ Microlance™ 3 30G	BD Medical, Heidelberg	303400
Klammerapparat/ Reflex 7 Clip Applier	CellPoint Scientific, Gaithersburg, USA	204-1000
Klammerentferner/ Reflex Clip Remover	CellPoint Scientific, Gaithersburg, USA	203-1000
Kopfhabe/ Bouffant	Medline, Kleve	FS63350
Kryoröhrchen/ CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific Nunc, Darmstadt	377224
Leukoplast/ Leukopor	BSN Medical, Hamburg	1698801
Mikroliterspritze/ Microliter Syringe	Hamilton GmbH, München	80408
Nahtmaterial Vicryl 4-0 absorbierbar/ Vicryl Plus 4-0	Ethicon, Norderstedt	VCP292H
Nahtmaterial Vicryl 5-0 absorbierbar/ Prolene 5-0	Ethicon, Norderstedt	8710H
Rasierer/ AESCULAP	B. Braun, Hessen	GT-415

Schermaschine Exacta		
Saugkissen/ MoliNea Plus	Hartmann, Heidenheim	161600
Skalpell/ Feather Disposable		
Scalpel	Feather, Japan	5205052
Spritzen 1ml/ Plastipak 1ml		
	BD Medical, Heidelberg	303172
Steriles Abdecktuch/ Secu		
Drape	Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf	538823
Sterile Klammern/ Reflex 7		
Clips	CellPoint Scientific, Gaithersburg, USA	205-1000
Styroporbox mit Eis		
Wärmeplatte / Thermolux	WITTE + SUTOR GmbH, Murrhardt	463265
OP Besteck		
Anatomische Pinzette	k.A.	--
Chirurgische Pinzette	k.A.	--
Nadelhalter	k.A.	--
Ösenpinzette	k.A.	--
Schere vorne spitz	k.A.	--
Schere vorne stumpf	k.A.	--
Skalpell	k.A.	--

4.1.8.2 Pharmaka

Tabelle 17: Pharmaka

Pharmakon	Bezeichnung lt. Hersteller	Hersteller	Wirkstoff und Konzentration	Dosis
Anästhetika				
Medetomidin	Domitor Injektionslösung,	Orion Pharma	Medetomidinhydrochlorid, 1mg/ml	<u>Dosis MMF:</u>
Midazolam	Midazolam B.Braun Injektions-/Infusions-/Rektallösung	B.Braun	Midazolamhydrochlorid, 5mg/ml	<u>2,5µl/g Maus</u>
Fentanyl				
Antagonisten				

Atipamezol	Antisedan	Orion Pharma	Atipamezolhydrochlorid, 5mg/ml	
Naloxon	Naloxon- ratiopharm Injektionslösung,	ratiopharm GmbH	Naloxonhydrochlorid, 0,4mg/ml	<u>Dosis ANF:</u> <u>8,5µl/g Maus</u>
Flumazenil	Flumazenil HEXAL Injektionslösung	Hexal AG	Flumazenil, 0,1mg/ml	
Analgetika				
Novalgine	Novaminsulfon- ratiopharm Injektionslösung	ratiopharm GmbH	Metamizol-Natrium 1-H ₂ O, 0,5g/ml	(1:10 verdünnt) <u>1,5µl/g Maus</u>
Rimadyl	Rimadyl Injektionslösung für Hunde und Katzen	Zoetis Deutschland GmbH	Carprofen, 50mg/ml	(1:50 verdünnt) <u>50µl/Maus</u>
Verdünnung				
NaCl 0,9%	Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Natriumchlorid 0,9%	Verdünnung für Novalgine und Rimadyl
Augensalbe				
Bepanthen Augen- und Nasensalbe		Bayer Vital GmbH	Dexpanthenol 5%	-

4.1.9 Software

Tabelle 18: Software

Software	Hersteller
BD FACSDiva™ Software v8.0.1	BD-Becton Dickinson, Heidelberg
Endnote X8	Clarivate Analytics vormals Thomson Reuters, München
FlowJo v10	FlowJo, LLC, USA
GraphPad Prism 5,6,7	GraphPad
ImageJ 1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

MS Office Version 16.10

Microsoft, München

SoftwareMaxPro 6.5.1

Molecular Devices, Biberach an der Riß

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Murine PDAC Zelllinien – KPC, KPCZ

Es wurden vier murine PDAC Zelllinien in die Zellkultur aufgenommen. Die epitheliale KPC Zelllinie 661, eine gemischte KPC 438, eine mesenchymale KPC 550, sowie eine KPCZ epitheliale Zelllinie 426 mit einem ZEB1KD (Zinc-finger E-box binding homeobox 1- oder TCF8- Knockdown, Transkriptionsfaktor). Die vier Zelllinien wiesen eine hohe phänotypische Variabilität auf und stammen aus dem KPC-Maus-Modell, welches ein klinisch-relevantes Modell des PDAC darstellt.

4.2.1.2 Kultivieren der neuen Zellen

Die murinen PDAC Zelllinien, KPC, wurden auf Trockeneis in einem Kryoröhrchen geliefert und im Labor in Stickstofftanks gelagert. Vor dem Aussäen wurden vier T75-Zellkulturflaschen mit je 15ml vorgewärmtem Nährmedium unter der Sterilbank vorbereitet. Die KPC/KPCZ Zelllinien wurden dann frisch aus dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C geschwenkt. Sobald noch ein kleiner, gefrorener Zellknopf zu sehen war, wurden die Zellen in 10ml Nährmedium verdünnt, zentrifugiert und nach Resuspension in Nährmedium in Zellkulturflaschen ausgesät.

Am darauffolgenden Tag wurde das Nährmedium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Dadurch wurden tote und nicht adhärente Zellen eliminiert. Die Zellen wurden in den nächsten Wochen, abhängig von der Konfluenz des Zellrasens, in eine neue Flasche passagiert.

Reagenz	Medium
RPMI 1640 Medium	500ml
+FBS	50ml
+PenStrep	5ml

Tabelle 19: Herstellung des Nährmediums

4.2.1.3 Einfrieren einer Zelllinie

Um eine ausreichende Anzahl an frischen Zellen dauerhaft zu lagern, wurden möglichst früh nach dem Ausäen einer neuen Zelllinie, Kryoröhrchen der vier Zelllinien angelegt. Dazu wurden die Zellen zunächst in vielen T-175-Zellkulturflaschen vermehrt, um eine große Anzahl an Zellen mit

geringer Passagezahl zu haben. Für das Einfrieren wurden die Zellen isoliert und das Zellpellet, abhängig von der ermittelten Zellzahl, in Gefriermedium (45ml FBS+ 5ml DMSO) resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurden ca. $1,0 \times 10^7$ Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen mussten anschließend sofort in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Kühlungsrate von $-1^\circ\text{C}/\text{Min.}$ (Minute)) bei -80°C für mindestens 24h heruntergekühlt werden. Danach wurden sie zur dauerhaften Lagerung in einen Stickstofftank überführt.

4.2.1.4 Passagieren (Subkultivieren) der Zellen

Die Zellen wurden routinemäßig unter der Sterilbank in regelmäßigen Abständen passagiert. Als erstes wurde die Konfluenz des Zellrasens am Boden der Zellkulturflasche unter dem Mikroskop beurteilt. Sobald die Zellen zu 70-80% konfluieren, wurden sie in eine neue, sterile Kulturflasche überführt. Das Subkultivieren der Zellen erfolgte stets unter der Sterilbank, welche vor Beginn des Passagierens 20 Min. angeschaltet wurde und mit 80%-igem Ethanol desinfiziert wurde, um Kontaminationen der Zellen in Kultur zu verhindern. Währenddessen wurde das Nährmedium, Trypsin-EDTA sowie die DPBS Lösung in einem Wasserbad bei 37°C aufgewärmt. Die KPC/KPCZ Zelllinien sind adhärent wachsende Zellen, wodurch das alte Nährmedium problemlos entfernt werden konnte. Anschließend wurden die adhärent gewachsenen Zellen mit sterilem DPBS mehrfach vorsichtig gespült, um Reste von serumhaltigem Medium zu entfernen, welches die Wirkung von Trypsin durch eine längere Einwirkzeit beeinträchtigt hätte und um tote, nicht adhärente Zellen zu entfernen. Durch Zugabe von Trypsin-EDTA und anschließender Inkubation im Brutschrank von bis zu 4 Min. kam es zu einer enzymatischen Reaktion, bei welcher es zur Lösung der Zellen vom Flaschenboden kam. Bei stark adhärent wachsenden Zellen konnte zusätzlich die Lösung der Zellen durch leichtes Klopfen mit den Handflächen gegen die Zellkulturflasche verstärkt werden. Durch eine Kontrolle unter dem Mikroskop konnte der Verlust der Adhärenz bestätigt werden. Zur Unterbrechung der enzymatischen Reaktion wurde Nährmedium hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension in ein 50ml Falcon überführt und bei Raumtemperatur mit 500 g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch Vermischen auf dem Vortex-Mixer und leichtes Klopfen gelöst. Danach wurden 2ml Nährmedium auf das Zellpellet gegeben und die Suspension mithilfe des Vortex-Mixers homogenisiert. Damit die Zellen möglichst vereinzelt in einer neuen Flasche kultiviert werden konnten, wurden die Zellen mit einer 1000 μl Pipette mehrmals resuspendiert. Um die Zellen in einer gewünschten Zelldichte auszusäen, wurde vorher die Zellzahl mithilfe einer Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.1.5). Nach diesem Schritt konnte die gewünschte Zellmenge in eine neue, mit Nährmedium befüllte, Zellkulturflasche überführt werden. Der Rest der Zellen konnte für weitere Versuche direkt geerntet oder verworfen werden. Für die Isolation von Zellpellets wurden die Zellen mit sterilem DPBS

gewaschen, bei 500g für 5 Min. zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die KPC/KPCZ Zelllinien wurden abhängig von den darauffolgenden Experimenten 1:5 bis 1:20 verdünnt. Mit der Verdünnung von 1:20 wurden die Zellen in einem Rhythmus von 3-4 Tagen routinemäßig gesplittet. Zum Abschluss wurde das erfolgreiche Splitten der Zellen durch Bestätigung der vereinzelt und gelösten Zellen unter dem Mikroskop bestätigt. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt kultiviert.

Die KPCZ 426 Zelllinie benötigte eine längere Einwirkzeit des Trypsin-EDTA als die anderen 3 KPC Zelllinien, da die Zellen eine hohe Adhärenz aufwiesen und sich somit nur sehr schlecht vom Zellkulturboden lösen ließen. Teilweise mussten die Zellen mithilfe eines Zellschabers gelöst werden. Bei der KPC 438 Zelllinie musste auf eine gute Resuspension geachtet werden, da diese stark verklumpt und somit inselförmig und nicht gleichmäßig konfluent gewachsen ist. Bei der Kultivierung primärer Zellen, also aus subkutanem oder orthotopem Tumormaterial, mussten die Zellen beim Subkultivieren immer mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst werden. Die Menge der hinzugegebenen Lösungen, Medien und Puffer war abhängig von der Größe der Zellkulturflaschen.

Alle Zelllinien wurden routinemäßig und laborübergreifend auf Kontaminationen mit Mykoplasmen überprüft. Für den Mykoplasmentest wurde 1ml des alten Nährmedium in ein 1,5ml Eppendorf-Tube überführt. Das Nährmedium sollte hierfür mindestens 3 Tage in Kultur gewesen sein. Die Probe wurde bei 4°C für 4 Min. mit 950g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden 100µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Danach wurden die Proben bei 96°C für 5 Min. im Thermocycler inkubiert und anschließend bei -20°C bis zur Testung auf Mykoplasmen gelagert. Nach maximal 40 Passagen wurden frische Zellen aus den Stickstofftanks ausgesät.

4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität der Zellen

Nachdem das Zellpellet am Ende des Passagierens in 2ml Nährmedium gelöst wurde, wurden zwischen 50-100µl Zellsuspension in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Die Zellzahl wurde durch Auszählung von mindestens zwei Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Verdünnung, Zellsuspension zu Trypanblau-Lösung, variierte je nach Größe der Zellkulturflasche und Konfluenz des Zellrasens zwischen 1:5 bis 1:20 (Zellen: Trypanblau). Mithilfe der Trypanblaufärbung wurde die Zellzahl, sowie das Verhältnis von toten zu vitalen Zellen bestimmt. Vitale Zellen erschienen im mikroskopischen Bild hell, währenddessen tote Zellen, aufgrund einer nicht intakten Zellmembran den Farbstoff aufnehmen und somit tiefblau erschienen.

Formel zur Berechnung der Zelldichte:

Zelldichte (Zellen/ml) =

$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Vol. Zellsuspension}$

Kammerfaktor= 10.000

Verdünnungsfaktor= Verdünnung mit Trypanblau-Lösung

Volumen Zellsuspension= Menge zugegebenes Nährmedium nach Zentrifugation

4.2.1.6 Zellkultur von multizellulären Tumoraggregaten (Sphäroide)

Sphäroide sind dreidimensionale, kugelförmige, vielzellige Tumoraggregate, welche *in-vitro* kultiviert werden können.

Um einen Unterschied der Expression des Lgr4-Rezeptors feststellen zu können, wurden in Abhängigkeit der darauffolgenden Versuche Sphäroide steril eingesät. Für die Sphäroidkultur wurde eine 12-Well-Platte mit 2,5ml Sphäroidmedium pro Kavität befüllt. Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, steril isoliert. Von jeder der 4 Zelllinien wurden 4 Wells mit je 50.000 Zellen/Well ausgesät. Die Sphäroidkultur erfolgte in der Regel für 7 Tage. Zur Isolierung wurde das Medium mit den Sphäroiden direkt in ein 50ml Falcon überführt und zusätzlich adhärent angewachsene Zellen mit Trypsin-EDTA gelöst. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und entweder direkt mit dem Durchflusszytometer analysiert oder als Zellpellet bei -80°C gelagert. Für die Aufnahme von Zellpellets wurden die Sphäroide vorher mit PBS gewaschen, bei 500g für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet bei -80°C gelagert.

Reagenz	Medium
DMEM/F12 Medium inklusive 1% PenStrep	30ml
B27 (50x)	600µl
FGF-β (100µg/ml)	3µl
EGF (500µg/ml)	1,2µl

Tabelle 20: Herstellung des Sphäroidmediums

4.2.1.7 Epitheliale mesenchymale Transition (EMT) Stimulation der Zellen

Die Stimulation der Zellen wurde in 6-Well-Platten durchgeführt. Es wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen in 3ml Nährmedium pro Well in eine 6-Well-Platte eingesät. Je Zelllinie wurden jeweils 2 Wells verwendet, ein Well ohne Stimulans (Kontrolle) und einem Well wurden TGF- β 1 [5ng/ml] am ersten Tag hinzugegeben.

Das Zytokin TGF- β 1 wurde in verschiedenen Zeitintervallen auf die Zellen gegeben.

Es wurden zwei verschiedene Behandlungszeiträume angesetzt.

Ein Behandlungszeitraum dauerte fünf Tage mit Zytokingabe am 1.-4. Tag. Die anderen Zellen dieses Stimulationszeitraums erhielten anfangs 2 Tage hintereinander TGF β -1 und wurden dann nicht weiter behandelt.

Der nächste Behandlungszeitraum dauerte sieben Tage mit täglicher Stimulation bis zum vierten Tag, an welchem die Zellen gesplittet wurden. Anschließend wurde der eine Teil der Zellen weiterstimuliert (= Langzeitbehandlung, **TGF β -1**) und der andere Teil der Zellen wurde nicht weiter behandelt (= Kurzzeitbehandlung, **(TGF β -1)**).

Vor jeder Stimulation der Zellen wurde stets das Nährmedium ausgetauscht.

Um die morphologischen Unterschiede der stimulierten Zellen feststellen zu können, wurden ab dem zweiten Tag der Stimulation lichtmikroskopische Bilder der Zellen angefertigt.

4.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Messung von bestimmten Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen in einem Flüssigkeitsstrom.

Die Messung basiert auf Antigen-Antikörper Reaktionen, mithilfe von spezifischen fluoreszenzfarbstoff-markierten AK, welche die Antigene spezifisch binden.

Auf Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften können gefärbte Einzelzellen in Zellsuspension genauer charakterisiert werden. Einerseits können die Zellgröße und Granularität der Zellen über die Lichtstreuung detektiert werden, andererseits Zelleigenschaften unter mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen untersucht werden.

4.2.2.1 Messung mit dem Durchflusszytometer

Durch die vom Gerät zugegebene Trägerflüssigkeit (Sheath fluid) wird eine laminare Strömung, ein sogenannter Hüllstrom, erzeugt. Aufgrund der Querschnittsverringering der Messküvette wird sowohl der Probenstrom als auch der Hüllstrom beschleunigt und gleichzeitig verjüngt (hydrodynamische Fokussierung). Diese beiden Strömungen vermischen sich dabei nicht.

Die Zellen werden mithilfe einer Kapillare der hochpräzisen Messküvette aufgesogen und gelangen dadurch in die Durchflusszelle, wo sie durch eine hydrodynamische Fokussierung am Laser vorbeitransportiert werden.

Dadurch wird der Abstand zwischen den direkt aufeinanderfolgenden Zellen vergrößert, sodass die Zellen sequentiell, jeweils einzeln, den fokussierten Laserstrahl passieren, wodurch jede einzelne antikörpermarkierte Zelle detektiert wird.

Sobald die Zelle den Analysepunkt, d.h. den Schnittpunkt zwischen Zelle und Laserstrahl, erreicht, kommt es zu einer Streuung des Laserstrahls.

Gemessen wird zum einen die Lichtstreuung, welche aus Vorwärtsstreulicht (FSC-Forward Scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC-Side Scatter) besteht und zum anderen die Fluoreszenz.

Messung der Lichtstreuung

Das **Vorwärtsstreulicht** ist die Lichtbeugung, gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichts, welche proportional zur Zellgröße ist und somit ein Maß für die Zellgröße darstellt.

Das **Seitwärtsstreulicht** ist die Lichtbrechung und Reflexion, gemessen im 90° Winkel zum einfallenden Licht, welche proportional zur Zellgranularität ist und somit ein Maß derselben darstellt.

Diese Informationen werden auf einem Graphen gesammelt, häufig liegt SSC auf der y-Achse und FSC auf der x-Achse.

Fluoreszenzmessung

Gleichzeitig wird im Durchflusszytometer die **Fluoreszenz** der AK gemessen. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden durch den Laserstrahl angeregt und auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück und geben dabei Energie (in Form von Photonen) ab. Die emittierte Photonenkonzentration wird detektiert und ist proportional zur Menge des gebundenen AKs.

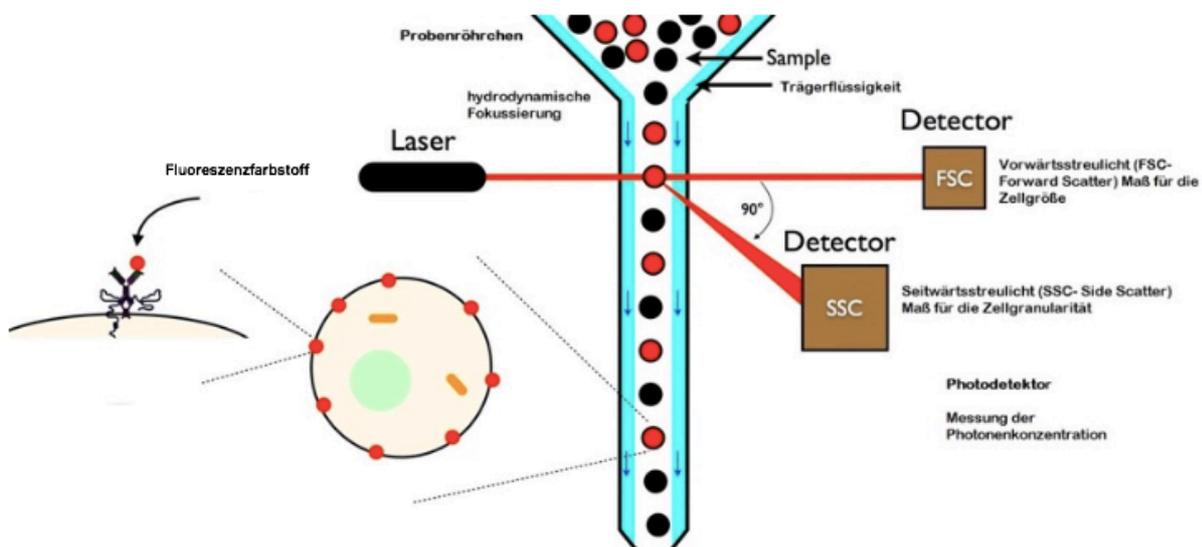


Abbildung 7 Prinzip eines Durchflusszytometers; modifizierte Abbildung [134], mit freundlicher Genehmigung von Frau S. Sabban, Ph.D

Alle Proben wurden mit dem Durchflusszytometer BD LSRFortessa gemessen. Der Flow-Cytometer ist mit 5 Lasern konfiguriert: blau (Wellenlänge 488nm), rot (640nm), violett (405nm), gelbgrün (561nm) und UV (355nm). Die Auswertungen erfolgten mit der BD FACSDiva Software. Durch das Gaten, also der Selektion einer spezifischen Zellpopulation, konnten die unterschiedlichen Expressionen des Lgr4-Rezeptors bestimmt werden.

4.2.2.2 Extrazelluläre Anfärbung

Die zu analysierenden Zellen wurden beim Passagieren steril aus der Zellkultur isoliert. Nach der Isolation wurde die gewünschte Zellmenge für den Färbungsprozess in FACS-Röhrchen überführt. Für die extrazelluläre Färbung wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100µl FACS-Puffer gelöst. Für jede Zelllinie wurde zusätzlich zu den gefärbten Zellen ein ungefärbtes (unstained) FACS-Röhrchen angelegt, welches dieselben Schritte des Protokolls ohne fluorochromgekoppelten-AK durchlief.

Als erster Schritt wurde der AK auf die Zellsuspensionen gegeben, danach wurden die Proben auf dem Vortex-Mixer vermischt und für 15-30 Min. lichtgeschützt, in einer Dunkelkammer bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit kann der AK spezifisch binden.

Laut Herstellerangaben wurden 5µl AK für $0,5 \times 10^6$ Zellen verwendet.

Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 2ml FACS-Puffer (Rezeptur siehe Tabelle 21) pro Probe und anschließend eine Zentrifugation (5 Min. mit 500g RT). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200-500µl FACS-Puffer gelöst.

Für die Färbung mit dem abcam AK wurden 3 FACS-Röhrchen für die verschiedenen Verdünnungen des sekundären AK angelegt.

Als erstes wurde 1µl (Konz. $0,5 \mu\text{g}/0,5 \times 10^6$) Mouse Fc Block auf die zu färbenden Zellen gegeben und für 5 Min. bei RT inkubiert. Durch Zugabe des Fc-Blocks werden unspezifische Bindungen minimiert ohne die Bindung des primären AKs zu beeinträchtigen. Danach wurde jeweils 1µl des primären AKs hinzugegeben und für 30 Min. bei RT in der Dunkelkammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Proben 2x mit je 2ml FACS-Puffer bei 500g für 5 Min. gewaschen. Anschließend wurden je 100µl des sekundären AKs hinzugegeben und für 30 Min. bei RT in der Dunkelkammer inkubiert. Der sekundäre AK wurde 1:2000, 1:3000 und 1:4000 mit FACS-Puffer verdünnt. Danach erfolgte nochmals ein doppelter Waschgang mit je 2ml FACS-Puffer bei 500g für 5 Min.

Abhängig von der eingesetzten Zellmenge wurden zwischen 200-500µl FACS-Puffer für die Messung mit dem Durchflusszytometer hinzugegeben.

Die stimulierten Zellen aus der Kultur wurden nach der gleichen Vorgehensweise geerntet. Es wurde für jede der Proben (unbehandelt und TGF-β1) eine ungefärbte Kontrolle mitgemessen.

Für das Sorting wurden die Zellen im Anschluss an die Färbung auf Eis in das Institut für Epidemiologie und Kreislaufkrankheiten (IPEK) gebracht.

4.2.2.3 Viabilitätsfärbung für die Analyse mit dem Durchflusszytometer

Der Nukleinsäurefarbstoff 7-AAD (7-Amino-actinomycin D) ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Der Farbstoff eignet sich daher zur Detektion toter Zellen bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer.

Es wurden 5µl (Konzentration 50µg/ml) auf $0,5 \times 10^6$ Zellen gegeben und für 5-10 Min. in einer Dunkelkammer inkubiert. Die Messung musste direkt im Anschluss der Inkubation stattfinden.

4.2.2.4 Kompensation

Falls die Proben mit einem zweiten Fluorochrom gefärbt wurden, musste vor der Messung eine sogenannte Kompensation durchgeführt werden, um somit eine Überlappung der verschiedenen Fluoreszenzspektren, d.h. das Überstrahlen eines Fluorochromes in den Fluoreszenzbereich anderer Fluorochrome zu vermeiden. Der Lgr4-AK ist APC konjugiert und der 7-AAD Farbstoff liegt auf Kanal PerCP Cy5.5. Da diese beiden Fluorochrome sehr dicht aneinander liegen und sich überlappen würden, wurde hierfür eine Kompensation durchgeführt.

Reagenz	Menge
BSA	5 g
Natriumazid	2 ml
1x DPBS	1 Liter

Tabelle 21: Rezeptur des FACS-Puffer

4.2.2.5 Intrazelluläre Anfärbung

Für die intrazelluläre Färbung wurden ebenfalls $0,5 \times 10^6$ Zellen in 100µl FACS-Puffer gelöst und pro Zelllinie ein unstained Röhrchen angelegt. Bei der intrazellulären Färbung ist es von großer Bedeutung, dass die Zellen vorerst fixiert und die Membran für die intrazellulären AK permeabilisiert wird, sodass diese an das intrazelluläre Antigen binden können.

Als erstes wurden je 100µl intrazellulärer Fixierpuffer auf alle Proben verteilt und für 20 Min. bei RT in einer Dunkelkammer inkubiert. Danach erfolgte zweimal ein Waschschriff mit je 2ml PermPuffer (1:10 mit Millipore verdünnt) pro Probe und einer Zentrifugeneinstellung von 500g für 5 Min. bei RT (Raumtemperatur). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der fluoreszenz-gekoppelte AK hinzugegeben und für 30-60 Min. bei RT Licht geschützt inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte nochmals ein wie oben beschriebener Waschgang mit PermPuffer und anschließend wurde den Proben 2ml FACS-Puffer hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet gelöst und zwischen 300-500µl FACS-Puffer für die Messung hinzugegeben.

4.2.2.6 Isotypen-Kontrolle

Die Isotypen-Kontrolle, auch Negativkontrolle, wurde durchgeführt, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers ausschließen zu können und die Spezifität des markierenden AK zu beweisen.

Hierfür ist es wichtig, dass der Isotyp-Kontrollantikörper dieselben Eigenschaften, gleiche Spezies und Subtyp (Mouse, IgG2b, APC konjugiert) wie der primäre markierte AK aufweist, allerdings binden Isotypen nicht spezifisch an die Zielzellen.

Für die Kontrolle wurde ein weiteres FACS-Röhrchen angelegt, welches die gleichen Bedingungen durchlaufen hatte wie die ungefärbten und gefärbten Zellen. Die Konzentration des Isotyp-AK entsprach der Konzentration des Primärantikörpers. Es wurden 5µl Isotyp-Kontrolle auf $0,5 \times 10^6$ Zellen gegeben.

4.2.3 Western Blot

Der Western Blot (auch Immunoblot) ist eine Methode für den Nachweis von Proteinen in einem Proteinprobengemisch. Vorerst wird das Proteingemisch mithilfe einer Gel-Elektrophorese entsprechend bestimmter Eigenschaften (Größe und Ladung) in einzelne Proteinbanden getrennt. Das Blotting, als nächster Schritt, ist die Übertragung der getrennten Proteinbanden von einem Gel auf die Trägermembran. Zur Detektion werden spezifische AK verwendet, welche an die gewünschten Proteine auf der geblotteten Membranoberfläche binden.

4.2.3.1 Vorbereitung der Zellen

Für den Western Blot wurden Zellpellets der jeweiligen Zellen hergestellt. Hierfür wurden die Zellen vor der Lagerung bei -80°C mit kaltem PBS gewaschen.

Danach wurde die gewünschte Menge an Zellsuspension in ein Eppendorf-Tube überführt und mit 500g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Zellpellet entweder direkt für die Proteinisolation verwendet oder bei -80°C gelagert.

4.2.3.2 Herstellung der Reagenzien für den Western Blot

Reagenzien	Rezeptur
10x Blottpuffer	15g Glycin 144g Tris Base 1 Liter VE-H2O pH 8,3
1x Blottpuffer	100ml 10x Blottpuffer 100ml Methanol 800ml VE-H2O
10x Laufpuffer	144g Glycin 30g Tris Base 10g SDS 1 Liter VE-H2O pH 8,3
1x Laufpuffer	100ml 10x Laufpuffer 900ml VE-H2O
4x Laemmli Ladepuffer	900µl 4x Ladepuffer 100µl β-Mercaptoethanol
5% Milchpulverlösung	0,5g Milchpulver 10ml TBS-T
Proteinolyse Puffer (RIPA)	9ml Aqua destillata 1ml 10x RIPA-Puffer 1 Tablette Phosphostop 1 Tablette Protease Inhibitor
1x Stripping Buffer	15g Glycin 1g SDS 10ml Tween pH 2,2 1 Liter Millipore
10x TBS	24g Tris Base 80g NaCl 1l Aqua destillata
1x TBS-T	100ml 10x TBS 1ml Tween 900ml Aqua destillata pH 7,6

Tabelle 22: Herstellung der Reagenzien für den Western Blot

4.2.3.3 Proteinisolation und photometrische Proteinquantifizierung

Vor Beginn des Western Blot erfolgte die Proteinisolation. Für die Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde ein BCA-Proteinkit verwendet.

Für die Messung wurden die Zellpellets stets auf Eis gelagert. Die Proteinisolation erfolgte durch das Zellysereagenz, RIPA-Puffer (100µl Lysepuffer pro 6-Well). Das Zellpellet wurde mit dem Vortex-Mixer gelöst und für mindestens 20 Min. auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 4°C und 12.000g für 20 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt, auf Eis gelegt und das Pellet wurde verworfen.

Anschließend erfolgte die Messung der Proteinkonzentration mithilfe des BCA-Proteinassays. Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. In einer 96-Well-Platte wurde zuerst eine BSA-Verdünnungsreihe mithilfe von RIPA-Puffer erstellt. Das Protein der Proben wurde 1:25 mit Lysepuffer verdünnt. Sowohl das BSA als auch die Proben wurden im technischen Duplikat angelegt und im Anschluss daran für 20 Min. bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte die photometrische Vermessung der Proben durch einen Microplate Reader (Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 540-590nm.

Mittels der BSA-Standardkurve erstellt das Gerät die einzelnen Mittelwerte des Proteins in den Proben. Dadurch konnte die entsprechende Probenmenge errechnet und entnommen werden.

Rechnung für die Probenmenge

Proteinmenge	Gewünschte Proteinmenge (100µg)	Menge des einzusetzenden Probenmaterial (30-)	des Verdünnung mit Aqua dest. (20µl) Proben
=ermittelter Mittelwert×25	z.B. 30µg	= 30÷Proteinmenge	=20 - Menge Probenmaterial
Der Mittelwert wird mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, da die Proben in der Well-Platte 1:25 mit Lysepuffer verdünnt wurden	Wahl der gewünschten Proteinmenge: zwischen 30-100µg (hier z.B. 30µg Protein)	Wie viel Protein muss der Probe entnommen werden: Menge Probenmaterial= 30 /Ergebnis Proteinmenge (Ergebnis aus 1)	Verdünnung der Proben mit Aqua dest. (Standard: 20µl) Verdünnung= 20-Menge Probenmaterial (Ergebnis aus 3)

Tabelle 23: Rechnung für die Probenmenge

Am Ende wurde jeder Probe 5µl Ladepuffer hinzugefügt und für 5 Min. bei 300g auf 95°C auf dem Thermomixer erhitzt.

Die Proben konnten anschließend direkt in das Gel pipettiert werden oder für einige Tage bei -20°C gelagert werden.

4.2.3.4 Herstellung eines Gels und Laden der Proben

Mithilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page; Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) werden die Proteine, anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli 1970). Das vertikal orientierte Gel ist zweigeteilt. Es besteht aus einem grobporigen Sammelgel und einem darunterliegenden engporigen Trenngel. Das Sammelgel weist einen deutlich niedrigeren pH-Wert (pH 6,8) als das Trenngel (pH 8,5) auf. Zunächst wurde ein 12%iges Trenngel gegossen, welches mit einer dünnen Isopropanolschicht übergossen wurde und bei 30 Min. durch Zugabe von Temed und APS polymerisiert. Danach wurde das Isopropanol entfernt und mit destilliertem Wasser ausgespült. Nach der Polymerisation des Trenngels folgte das Gießen des Sammelgels über das Trenngel. Es wurde ein Kamm eingesetzt und das Gel für 30 Min. ausgehärtet. Nach der Polymerisation der Gele kann der Kamm entfernt werden. Das fertige Gel konnte dann direkt mit den Proben beladen oder für ca. 3 Tage in feuchten Tüchern eingewickelt bei 4°C gelagert werden.

Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer fixiert und mit Laufpuffer befüllt.

Als nächster Schritt wurde der Standard (zwischen 3-7µl) und die zu analysierenden Proben (25µl) in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 70V für 45-60 Min. und bei 120V für eine Stunde.

Sobald die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Gele	Rezeptur
Trenngel (12%)	4,3 ml H ₂ O 2,5ml 1,5M Tris pH 8,8 3,0 ml Polyacrylamid 100µl 10% SDS 100µl 10% APS 5µl Temed
Sammelgel	2,3ml H ₂ O 380µl 1M Tris pH 6,8 380µl PolyAcrylamid 30µl 10%SDS 30µl 10%APS 5µl Temed

Tabelle 24: Herstellung der Gele

4.2.3.5 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran (Blotting)

Nachdem die Proteine das Gel durchlaufen haben, erfolgte das Blotten. Für den Transfer der Proteine auf die Membran, werden die Nitrocellulosemembran, sowie das Filterpapier auf die Größe der Gele zurechtgeschnitten. Schwämme, Filterpapier und die Membran wurden für 5-10 Min. in kaltem Blotpuffer inkubiert. Das Gel wurde dann vorsichtig aus der Laufkammer entnommen und ebenfalls für ca. 5 Min. im Transferpuffer inkubiert.

Die Blotzelle wird von der schwarzen Kathodenseite ausgehend wie folgt luftblasenfrei befüllt:

1. Schwamm
2. Whatman Filter Paper
3. Gel
4. Nitrocellulosemembran
5. Whatman Filter Paper
6. Schwamm

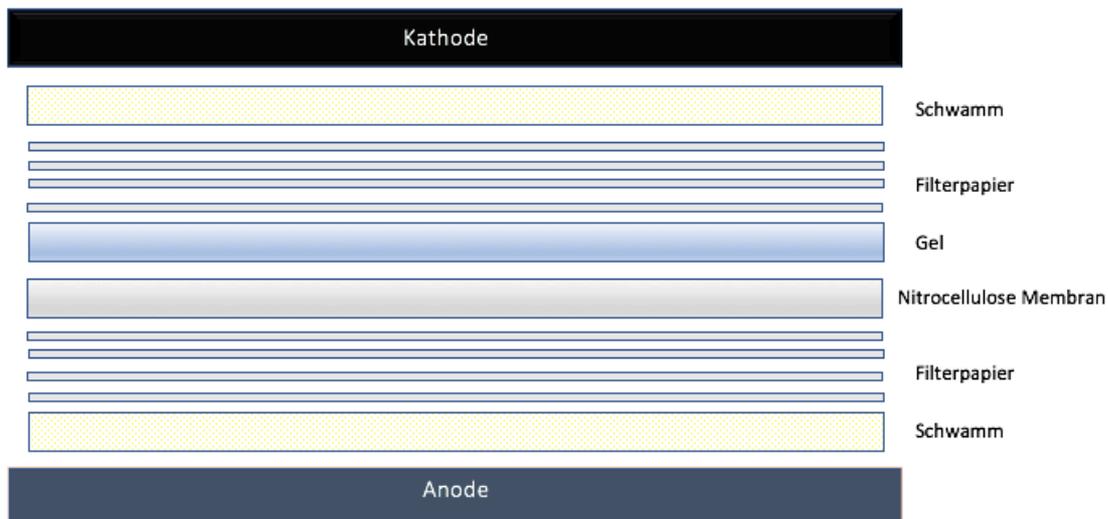


Abbildung 8 Schematischer Aufbau einer Blotzelle

Die Blotzelle wurde dann mit der Anodenseite verschlossen. Wichtig ist, dass das Gel auf der Kathodenseite und die Membran auf der Anodenseite positioniert sind. Die Blotzelle wurde dann in die Blotkammer eingehängt, mit kaltem Blotpuffer und Eis befüllt. Der Proteintransfer erfolgte durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 35mA für zwei Stunden. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in einer 5%igen Milchpulverlösung für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler blockiert, um unspezifische Bindungen der AK zu verhindern.

Anschließend wurden die Membranen abhängig von den zu analysierenden Proben mit den spezifischen primären und sekundären AK inkubiert. Für den Lgr4-Rezeptor (104kDa) wurde die Membran unter der pinken Bande (75kDa) geteilt. Der obere Teil wurde mit dem primären Lgr4-AK

(rabbit) und der untere Teil mit dem AK gegen das Housekeeping-Protein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 37kDa) inkubiert. Hierfür wurde die Membran mithilfe des Proteinstandards (Abb.9) in zwei Teile geschnitten.

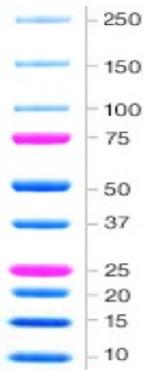


Abbildung 9 Dual Color Proteinstandard, mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad

Der primäre AK wurde über Nacht unter dauerhaftem Schwenken auf einem Schüttler bei 4°C inkubiert.

Vor der Inkubation des sekundären AKs wurde die Membran 3-mal je 5 Min. mit TBS-T bei RT gewaschen. Für den Nachweis des primären AKs wurde der dazu passende sekundäre, HRP-linked AB (horseradish-peroxidase gekoppelte AK, horseradish linked Antibody) verwendet.

Der sekundäre anti-rabbit/anti-mouse-AK, wurde für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurde die Membran erneut 3 mal je 5 Min. mit TBS-T gewaschen.

Antikörper	Verdünnung	Zusammensetzung
Primäre Antikörper		
Lgr4 CDH-1 Vimentin	1:1000	0,5g 5%iges BSA 10ml TBST 10µl AK
Sekundäre Antikörper		
Anti-rabbit	1:2000	0,5g 5%iges BSA 10ml TBS-T 5µl
Anti-mouse	1:2500	0,5g 5%iges BSA 10ml TBS-T 4µl AK

Tabelle 25: Verdünnungen der Antikörper

4.2.3.6 Detektion

Die Detektion erfolgte in einer Entwicklerkassette nach Zugabe von Western Blotting Detektionsreagenzien 1 und 2 im Verhältnis 1:1. Die Mischung wurde direkt auf die Membran in der Kassette gegeben. Anschließend wurde die Membran mit einer Klarsichtfolie bedeckt und in die Entwicklerkassette gegeben. Die dadurch hervorgerufene Chemilumineszenzreaktion wurde durch das lichtgeschützte Auflegen des Hyperfilm ECL sichtbar gemacht. Die Exposition des Films variierte von 30 Sek. (Sekunden) bis zu 20 Min. und wurde anschließend im Röntgenfilmentwickler sichtbar gemacht.

Einige Membranen wurden mit dem Testgerät ChemiDoc™ MP Imaging System von Bio-Rad analysiert. Hierfür wurde die Membran in das Gerät gelegt und mit einer Klarsichtfolie bedeckt, um das Austrocknen zu verhindern. Es konnte zwischen einer automatischen Expositionszeit und einer variablen, selbstfestgelegten Expositionsdauer gewählt werden.

4.2.3.7 Analyse der Western Blot Ergebnisse

Mithilfe des ImageJ Bildbearbeitungsprogramms wurden die Blots quantifiziert und die Farbtiefe der einzelnen Banden analysiert. Die Blots wurden zuerst invertiert und unter Berücksichtigung der Hintergrundbilddichte (Hintergrundinformationen) gemessen. Im Anschluss wurde die Farbtiefe der einzelnen Banden (Lgr4) durch die Farbtiefe der dazugehörigen GAPDH-Bande dividiert und als Lgr4/GAPDH OD Ratio statistisch dargestellt.

4.2.4 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz (IF) werden Proteine, hier der Lgr4-Rezeptor und CDH-1, in fixierten Zellen nachgewiesen.

Dazu wurden pro Zelllinie, drei sterile 6-Well-Platten und 16 Deckgläschen benötigt. Als erstes wurden pro Zelllinie 4 mal $2,5 \times 10^5$ Zellen in Wells mit Deckgläschen transferiert und über Nacht bei 37°C mit 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen adhärieren somit über Nacht und können am nächsten Tag auf dem Deckgläschen fixiert werden. Jede der vier Zelllinien wurde auf Lgr4 und CDH-1 gefärbt und dazu jeweils eine Negativkontrolle ausgesät.

Bei der IF wurden alle folgenden Inkubationen mit den verschiedenen Reagenzien stets bei RT und auf dem Schüttler durchgeführt.

4.2.4.1 Fixierung der Zellen

Nach der Inkubation über Nacht erfolgte die Fixierung der Zellen. Zunächst wurde das Nährmedium entnommen und ein Waschschrift mit 1x DPBS-T durchgeführt. Anschließend wurden ca. 0,5ml 4%iges FA (Formaldehyd) zur Fixierung in jedes Well gegeben und für 20 Min. inkubiert. Danach wurde das FA verworfen und für 5 Min. mit DPBS gewaschen, um ggf. Reste des FA zu entfernen.

Nach diesem Schritt wurde Peroxidase auf die Deckgläschen gegeben und für 10 Min. inkubiert. Dann erfolgte nochmals ein Waschgang für 5 Min. mit PBS-T.

Lösung	Reagenz	Menge
DPBS-T	DPBS	1l
	Tween	1ml
Peroxidase	Methanol	16,7ml
	Aqua destillata	3,8ml
	H ₂ O ₂	0,5ml

Tabelle 26: Rezeptur zur Fixierung der Zellen der Immunfluoreszenz

4.2.4.2 Permeabilisieren der Membran

Um das Eindringen in die Zelle und somit die Bindung der Antikörper (AK) zu ermöglichen wurde die Membran vorerst permeabilisiert. Hierfür erfolgte eine Inkubation mit 0,1%igem Triton-X-DPBS für 10 Min. Danach wurde erneut für 5 Min. mit DPBS-T gewaschen.

Anschließend wurden die Deckgläschen aus den Wells genommen und die Ränder vorsichtig getrocknet. Zur Überprüfung der Spezifität der AK und um Kreuzreaktionen des AKs zu verhindern, wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. Dies bedeutet, auf einen Objektträger wurden je 2 Deckgläschen einer Zelllinie gelegt. Danach wurden die Ränder der Deckgläschen mit einem Dako-Pen (Fettstift) abgegrenzt. Der Dako-Pen hat eine hydrophobe Wirkung, wodurch eine differentielle Färbung der 2 Deckgläschen auf einem Objektträger ermöglicht und zusätzlich unnötiger Reagenzienverbrauch verhindert wurde.

Lösung	Reagenz	Menge
0,1% Triton X-DPBS	DPBS	9ml
	1% Triton X	1ml

Tabelle 27: Rezeptur zur Permeabilisierung der Membran bei der Immunfluoreszenz

4.2.4.3 Proteinblockierung

Anschließend folgte ein Protein-Blockier-Schritt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu sättigen, dies erfolgte mit einer Reagenzmischung aus 5%-BSA-DPBS-T+5%-Serum (10ml DPBS-T, 0,5g BSA, 0,5ml goat serum). Sowohl die Negativkontrolle, als auch die Positivkontrolle wurden vollständig mit dem Reagenz bedeckt und für 1Std. in einer Dunkelkammer inkubiert.

4.2.4.4 Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern

Nach der Proteinblockierung wurden 50µl des primären Lgr4-AKs (rabbit) und des CDH-1-AKs (rabbit) auf die Deckgläschen der Positivkontrollen gegeben und die Negativkontrollen wurden mit 50µl DPBS-T-5%-BSA über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Der primäre Lgr4-AK wurde 1:50 mit DPBS-T-5%-BSA verdünnt und CDH-1 im Verhältnis von 1:100. Laut Herstellerangaben musste für den Lgr4-AK eine Konzentration von 1-4µg/ml, für den CDH-1-AK eine Verdünnung von 1:200 und für den sekundären AK eine Konzentration von 2µg/ml verwendet werden. CDH-1 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches die unterschiedlichen Lokalisierungen von Lgr4 und CDH-1 zeigte.

Nach der 24-stündigen Inkubation des primären AK wurden durch dreimaliges Waschen von je 5 Min. mit DPBS-T die Antikörperüberstände entfernt.

Durch den mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Sekundärantikörper (goat) wurden die primären AK sichtbar gemacht. Der sekundäre AK wurde mit DPBS-T 1:100 verdünnt und auf jedes negative und positive Deckgläschen gegeben.

Da der AK unter Lichtexposition ausbleicht, wurde an dieser Stelle lichtgeschützt gearbeitet und für eine Stunde in der Dunkelkammer inkubiert.

Nach der Inkubation folgte erneut ein dreimaliges Waschen je 5 Min. mit DPBS-T auf dem Schüttler.

4.2.4.5 Färbung der Zellkerne

Um alle Zellkerne der Zellen sichtbar zu machen, folgte im Anschluss eine Färbung der Zellkerne. Hierfür wurde der blaue Fluoreszenzfarbstoff "Hoechst 33342" verwendet. Dieser diffundiert durch die Plasmamembran der Zellen und bindet an die dsDNA. Somit färbt dieser den Zellkern, nicht aber das Zytoplasma. Der Farbstoff wird unter dem Mikroskop durch UV-Licht angeregt und emittiert blaues Licht, somit fluoreszierten die Zellkerne unter dem Mikroskop. Der Hoechst-Farbstoff wurde mit DPBS nach Angaben des Herstellers in einer Verdünnung von 1:10.000 [1µg/ml] für 5 Min. inkubiert und Überreste für 5 Min. mit DPBS entfernt.

4.2.4.6 Eindecken der Proben

Im Anschluss an die Immunfluoreszenzmarkierung soll die Fluoreszenz durch ein Eindeckmedium, Mounting Medium, möglichst lange erhalten bleiben. Das luftblasenfreie Eindecken verhindert ein schnelles Verblässen der Fluoreszenzproteine, erhält die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes und schützt vor dem Austrocknen. Hierfür wurden die Deckgläschen vorsichtig von den Objektträgern genommen und je ein Tropfen Mounting Medium pro Deckgläschen auf die Objektträger gegeben. Danach wurden die Deckgläschen mit der umgekehrten Seite (mit den Zellen nach unten) wieder auf die Objektträger gelegt und vorsichtig mithilfe von Klarlack, welcher auf die Ecken der Deckgläschen aufgetragen wurde, auf den Objektträgern fixiert. Danach wurden sie in einer Dunkelkammerbox bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.2.4.7 Auswertung

Die Auswertung erfolgte im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die zu analysierenden Proben wurden zusätzlich unter einem Konfokalmikroskop analysiert. (Klinikum rechts der Isar Technische Universität München Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Peter Janssen)

4.2.5 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction), 1986 von Mullis et al. (The polymerase chain reaction 1989) erstmals veröffentlicht, ist ein bewährtes biochemisches Verfahren zur exponentiellen Amplifikation primerdefinierter DNA-Abschnitte. Für die gewünschte Gensequenz werden die dazu passenden Primer eingesetzt.

4.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Die PCR wurde aus frischen Zellen, gefrorenen Zellpellets oder mit in stickstofffixiertem Gewebe durchgeführt.

Frische Zellen

Für eine PCR aus frischen Zellen wurden diese in je 1 Well einer 6-Well-Platte überführt. Pro Well wurden $0,25 \times 10^6$ Zellen in 3ml Nährmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert.

Eingefrorene Zellpellets

Für die PCR mit eingefrorenen Zellen wurden die Zellpellets kurz vor Beginn der RNA Isolation aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen und auf Eis gelagert.

Gewebe

Das Maustumorgewebe wurde nach der Operation in ein Kryoröhrchen überführt und für kurze Zeit in Stickstoff gelagert. Anschließend wurden die Tumoren in den -80°C Gefrierschrank überführt.

4.2.5.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem peqGOLD Total RNA Kit von Peqlab. Für die molekularbiologische Untersuchung der Genexpression benötigt man reine und intakte RNA aus den zu untersuchenden Zellen. Hierfür wurde eine ausgewiesene Arbeitsfläche speziell mithilfe von RNaseZAP-Lösung gesäubert und nur unter Benutzung von RNase-DNase-freiem bzw. sterilem Material gearbeitet.

Die Technik umfasste eine Kombination aus der Bindung einer Silikamembran und der Mikrosäulenzentrifugationstechnik.

In Vorversuchen wurde das Herstellerprotokoll in Bezug auf einzuhaltende Zeiten, Puffermengen sowie Zentrifugationskraft modifiziert.

Im Fall von frischen Zellen wurde das Nährmedium aus den Wells verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 400µl RNA-Lysepuffer in die Wells gegeben. Bei gefrorenen Zellpellets wurde der Lysepuffer direkt auf das Zellpellet gegeben. Nachdem die Zellen homogenisiert und lysiert waren, wird die Lösung resuspendiert und vermischt. Das Lysat wurde dann auf eine DNA-Entfernungssäule in ein neues Sammelröhrchen überführt und anschließend bei 12.000g für 1 Min. zentrifugiert. Danach wurde die DNA-Entfernungssäule verworfen und der Durchfluss mit 400µl 70% Ethanol durchmischt. Die gesamte Probe wurde anschließend auf eine RNA-Bindungssäule überführt und bei 10.000g für 1 Min. zentrifugiert, wodurch die RNA selektiv an die Silikamembran der RNA-Bindungssäule bindet.

Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte

1. 500µl RNA Wash Buffer 1, 1 Min. bei 10.000g zentrifugieren
2. 600µl komplettiertem RNA-Wash Buffer 2 mit Ethanol bei 10.000g 2 Min.
3. 200µl RNA-Wash Buffer 2.

Durch die mehrfachen Zentrifugationsschritte mithilfe der Waschpufferlösungen wurden andere zelluläre Bestandteile, wie z.B. Proteine und Salze von der Membran entfernt.

Als nächstes wurde die RNA in der RNA-Bindungssäule mit 10.000g für 5 Min. trocken zentrifugiert. Beim letzten Schritt wurde die RNA für 3 Min. mit 20µl RNase-freiem Wasser inkubiert und somit von der Säulenmembran eluiert. Danach wurde mit 10.000g für 1 Min. zentrifugiert und die eluierte RNA auf Eis gelagert. Das Endvolumen der isolierten RNA betrug 20µl.

Die RNA konnte bei -80°C in einem Eppendorf-Tube gelagert werden.

4.2.5.3 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop2000 Spektralphotometer. Für die Konzentrationsmessung der Proben wurde pro Probe nur 1µl verwendet.

Um den Reinheitsgrad der RNA zu beurteilen und somit mögliche RNA-Verunreinigungen ausschließen zu können, ist auf das Verhältnis A260/A280 (Absorptionskoeffizienten bei 260 zu 280nm) und auf den Absorptionsquotient A260/A230 (Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 zu 230nm) zu achten.

Die RNA wird als „rein“ angesehen, wenn ein 260/280-Verhältnis von ~ 2,0 analysiert wird und für das 260/230-Verhältnis sollten die Werte bei 1,8-2,2 liegen. Sind diese Werte deutlich niedriger, deutet dies auf Verunreinigungen durch beispielsweise Proteine, Phenole etc. hin [135].

4.2.5.4 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Für die cDNA Synthese wurden aufgrund der unterschiedlichen Menge an einsetzbarer Gesamt-RNA zwei verschiedene Kits verwendet. Das iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad und das SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific.

Probenvorbereitung mit dem iScript cDNA Synthesis Kit

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
5x iScript Reaction Mix	4µl
iScript Reverse Transkriptase	1µl
Nuklease-freies Wasser	variabel: hier 15µl
Gesamt-RNA (100fg-1µg total RNA)	variabel: hier 500-1000ng
Endvolumen	20µl

Tabelle 28: iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad

Mithilfe der Reversen Transkriptase, RNA-abhängige DNA-Polymerase, wird im ersten Schritt aus der RNA ein komplementärer DNA-Einzelstrang (cDNA) gebildet. Im nächsten Reaktionsschritt wird ein kompletter DNA-Doppelstrang, durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert. Das iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad enthält Oligo-dT-Nukleotid und Random-Hexamer Primer, welche sich an die RNA binden und somit die Reverse Transkriptase katalysieren.

Die RNA-Konzentration wurde in ng/µl angegeben. Für die Ermittlung der einzusetzenden RNA, wurde die RNA-Konzentration der Proben durch die gewünschte RNA-Menge geteilt und anschließend die Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser errechnet.

Bei dem iScript cDNA-Synthesis Kit konnte maximal 1µg Gesamt-RNA eingesetzt werden im Gegensatz zum SuperScript cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific, bei welchem eine Gesamt-RNA von 2,5µg eingesetzt werden konnte.

Probenvorbereitung mit dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
10x SuperScript Enzyme Mix	2µl
5x VILO Reaction Mix	4µl
Nuklease-freies Wasser	variabel: hier 14µl
Gesamt-RNA	2,5µg
Endvolumen	20µl

Tabelle 29: SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific

Bei diesem Kit konnten im Gegensatz zum iScript-Kit 2,5µg Gesamt-RNA eingesetzt werden, welches im Falle der Lgr4-Detektion mit sortierten Zellen sehr wichtig war, da man nur mit einer sehr geringen Zahl an Zellen arbeitete und zusätzlich eine hohe Anzahl an Zyklen (Ct-Values) benötigte, um ein Signal zu erhalten.

Das SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit enthält ebenfalls Random-Primer, wodurch die Umschreibung in cDNA stattfinden konnte.

Die Proben wurden in ein 0,5ml Eppendorf-Tube überführt, mit einem Vortex-Mixer durchgemengt und mithilfe einer Mikrozentrifuge zentrifugiert bevor sie im Thermocycler in cDNA umgeschrieben wurden.

Die Programmierung des Thermocyclers war abhängig vom zuvor benutzten Kit.

Die cDNA Proben konnten für einige Zeit bei 4°C im Thermocycler gelagert werden oder über einen längeren Zeitraum bei -20°C.

Programmierung des Thermocycler mit dem iScript cDNA Synthesis Kit

Endvolumen	20µl	
Programmierung	Primerannealing	5 Min. bei 25°C
	reverse Transkription	20 Min. bei 46°C
	Inaktivierung der RT	1 Min. bei 95°C
	Optional	4°C

Tabelle 30: Programmierung Thermocycler für iScript cDNA Synthesis Kit

Programmierung des Thermocycler mit dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit

Endvolumen	20µl	
Programmierung	Primerannealing	10 Min. bei 25°C
Thermocycler	reverse Transkription	60 Min. bei 42°C
	Inaktivierung der RT	5 Min. bei 85°C
	Optional	4°C

Tabelle 31: Programmierung Thermocycler für SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit

Nachdem die cDNA synthetisiert war, wurde nur noch an einem speziell ausgewiesenen DNA-Arbeitsplatz gearbeitet, ebenfalls nur unter Benutzung von RNase-DNase-freiem bzw. sterilem Einmalmaterial.

Die Proben wurden mit dem Mastermix von Bio-Rad für die RT-PCR vorbereitet. Der Mastermix ist eine „Ready-to-use“-Lösung für die PCR. Diese ist 2-fach konzentriert und enthält alle Komponenten für die PCR, außer den spezifischen Primern (Lgr4 und GAPDH), die DNA-Template und Nuklelase-freies Wasser.

EvaGreen ist ein fluoreszierender, sich interkalierend an die DNA einfügender Nukleinsäurefarbstoff. Die Lösung stellt somit eine speziell schonende DNA-Analyse dar.

Zuerst wurden 18µl des Mastermix, jeweils mit dem Lgr4-und GAPDH-Primer vorgelegt und anschließend je 2µl cDNA (abhängig vom Versuch 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt) hinzugegeben. Jede Probe wurde im technischen Duplikat mit jeweils einer Negativkontrolle ohne cDNA in die 96-Well-PCR-Reaktionsplatte überführt.

Pipettierschema pro Well	Reagenzien	Endkonzentration
	SsoFast EvaGreen Supermix	10µl
	Primer	1µl
	cDNA	2µl (1:10 verdünnt)
	Nuklease-freies Wasser	7µl

Tabelle 32: Pipettierschema der PCR-Reaktionsplatte

Nachdem die Proben fertig pipettiert waren, wurde die Well-Platte mit einer adhäsiven Schutzfolie abgedeckt, gevortext und für 1 Min. bei 1000g zentrifugiert.

4.2.5.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR, quantitative real-time-PCR)

Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Applied Biosystems StepOne Real-time PCR System. Da der Mastermix mit dem Reagenz SsoFast EvaGreen Supermix hergestellt worden ist, handelt es sich um eine fluoreszenz-basierende PCR.

Der EvaGreen-Farbstoff bindet an die doppelsträngige DNA. Während der PCR wird eine bestimmte Gensequenz vervielfältigt und gleichzeitig kann die Detektion und Quantifizierung der PCR-Produkte mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden. Somit erhöht sich die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge des entstehenden doppelsträngigen PCR-Produkts [136].

4.2.5.6 Relative Quantifizierung und PCR- Effizienz

Sobald der EvaGreen Fluoreszenzfarbstoff zu den Proben hinzugegeben wird, bindet dieser an die doppelsträngigen DNA-Sequenzen und fluoresziert. Im nächsten Schritt wird die DNA denaturiert, wodurch der Farbstoff freigesetzt wird und das Fluoreszenzsignal deutlich reduziert wird. Diese geringe Hintergrundfluoreszenz wird automatisch durch den Computer vom späteren eigentlichen Signal subtrahiert. Sobald die Primer ansetzen und die Elongation beginnt, setzt sich der Fluoreszenzfarbstoff an das doppelsträngige PCR-Produkt, wodurch es zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals kommt.

Als Quantifizierungsmethode wurde der Schwellenwert-Zyklus (Ct-Wert, Cycle threshold) verglichen. Der Ct-Wert beschreibt den Anfang des exponentiellen Wachstums, in welchem das Fluoreszenzsignals der Proben erstmals exponentiell über dem Hintergrundsignal (Schwellenwert-Threshold) liegt.

Dieser Schnittpunkt zeigt die Anzahl der Zyklen an, welche benötigt werden um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Dies bedeutet, je niedriger der Ct-Wert einer Probe ist, desto größer ist die Menge der Zielsequenz. Somit sind Ct-Werte umgekehrt proportional zur Menge der Ziel-Nukleinsäure in der Probe.

Bei der relativen Quantifizierung werden die Ct-Werte des Zielgens mit den Ct-Werten einer Kontrollprobe (GAPDH) verglichen. Für die Referenzprobe wurde das Housekeeping Gen GAPDH eingesetzt.

Für die Berechnung der Ratio (Expressionsunterschiede) wurde im ersten Schritt der mittlere Ct-Wert des Referenzgens vom mittleren Ct-Wert des Zielgens subtrahiert, um die Unterschiede der Lgr4-Expression der untersuchten Zelllinien feststellen zu können.

Die mittleren Ct-Werte (Ct-Mean) werden automatisch angegeben.

Formeln zur Berechnung der PCR-Effizienz:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{Referenzgen})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta Ct}$$

4.2.5.7 Optimale Zyklusbedingungen für die Echtzeit-PCR

Zyklusschritte	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung Enzyme	95°C	30 Sek.	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	5 Sek.	40 Zyklen
Primerannealing/Extension	60°C	20 Sek.	
Schmelzkurve	95°C	20 Sek.	
	60°C	1 Min.	1 Zyklus
	95°C	15 Sek.	

Tabelle 33: Zyklusbedingungen der Echtzeit-PCR

Es wurden standardmäßig 40 Amplifikationszyklen durchgeführt, um die Vervielfältigung unerwünschter Sequenzen zu verhindern.

Für den Vergleich der Ergebnisse wurden die Werte aus der Formel $2^{-\Delta Ct}$ verwendet.

4.2.6 Zellsorting

Das Zellsorting fand mithilfe des Durchflusszytometers BD FACS Aria III im Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten (IPEK) statt.

4.2.6.1.1 Vorbereitung der Zellen

Für den Sortiertermin wurden die Zellen wie unter 2.2.1.4 beschrieben isoliert und nach dem extrazellulären Färbungsprotokoll mit dem APC-konjugierten AK gefärbt.

Entscheidend für den Sortierprozess war, dass die Zellen für einen schnelleren Sortierprozess sehr konzentriert in FACS-Puffer vorlagen. Dies bedeutete beispielsweise, dass 7 Mio. Zellen in 1,4ml FACS-Puffer gelöst wurden.

4.2.6.1.2 Voraussetzungen für den Sortierprozess

Zunächst wird ein vordefinierter Sortmode gewählt, „Purity Mask“ oder „Yield Mask“. Sortieren der Zellen auf „Purity“ bedeutet auf Reinheit, auf „Yield“ hingegen bedeutet auf Ausbeute. Für das Sortieren auf den Lgr4-Rezeptor wurde der Sortmode „Purity“ gewählt, dies bedeutete ein Sortierprozess auf eine hohe Reinheit, daraus resultierend aber eine geringere Ausbeute.

Des Weiteren wurde ein stabiler Tropfenabrisspunkt eingestellt, um möglichst wenig Satellitenbildung zwischen den einzelnen Tropfen zu haben. Dies wurde durch den sogenannten „Sweet Spot“ (Autopilot) stabil gehalten und kontrolliert (Abb.10)

Ebenfalls musste der korrekte „Drop Delay“ (Abstand zwischen den Tropfen) gewählt werden.



Abbildung 10 stabiler Tropfenabrisspunkt und wenig Satellitenbildung, mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. rer. nat. Uwe Speck Applikationsspezialist Sorter übernommen (BD Biosciences)

Diese Einstellung ist wichtig, um eine Ladungsübertragung zwischen den einzelnen Tropfen zu verhindern, sodass nur die richtigen Tropfen mit Zellen sortiert werden. Dies wurde mithilfe eines „Auto DropDelays“ mit Beads kontrolliert.

Um ein sicheres und korrektes Gating mit geringem Zellverlust zu ermöglichen, wurde zu jeder gefärbten Zelllinie vorerst die ungefärbten Zellen analysiert.

4.2.6.1.3 Aufbau des BD FACS Aria III

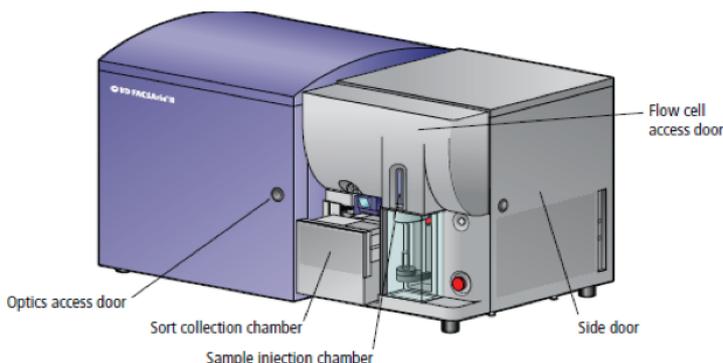


Abbildung 11 Aufbau des BD FACS Aria III [137]

4.2.6.1.4 Sorten

Die Zellen wurden vor dem Sortiervorgang durch ein Tube mit Filterdeckel (30µm Aufsteckfilter) in ein neues FACS-Röhrchen überführt, um mögliche Zelladhäsionen zu minimieren. Für die sortierten Zellen wurden zwei 15ml Falcons mit je 3ml Nährmedium im Sorter fixiert.

Die FACS-Röhrchen wurden dann in die Probenkammer gestellt und vom Sorter aufgezogen. Die Zellen durchwandern einzeln, wie beim Durchflusszytometer ohne Sorter, vorerst den Mikrokanal, in welchem sie durch einen Laserstrahl angeregt werden. Durch eine sogenannte „Micronozzle“ (Öffnung) entstehen Tropfen, in welchen sich die gefärbten Zellen befinden. Die Nozzle kann abhängig von der Zellgröße in 70µm, 85µm und 100µm gewählt werden.

Für die KPC Zelllinie wurde eine 100µm große Nozzle verwendet, da die Zellgröße nicht größer als ¼ des Durchmessers der Nozzle ausmachen sollte. Die Zellgröße der KPC 661 Zelllinie lag zwischen 15-25µm. Des Weiteren wurde eine Frequenz von 30kHz festgelegt, dies bedeutete 30.000 Tropfen/Sekunde. Tropfen, welche die Lgr4 gefärbten Zellen enthalten, wurden elektrisch aufgeladen.

Nicht jeder Tropfen enthält eine gefärbte Zelle, da die Verteilung der Zellen auf die Tropfen zufällig ist. Tropfen, welche keine gefärbten Zellen enthalten, werden nicht elektrisch aufgeladen und nehmen dadurch nicht am Sortierprozess teil.

Durch 2 Hochspannungsplatten, welche positiv und negativ geladen sind, wurden die Tropfen, welche die gefärbten Zellen enthalten, in die gewünschte Richtung nach rechts positiv und links negativ in die zuvor eingelegten Falcons abgelenkt (siehe Abb.12 Sorting Prinzip).

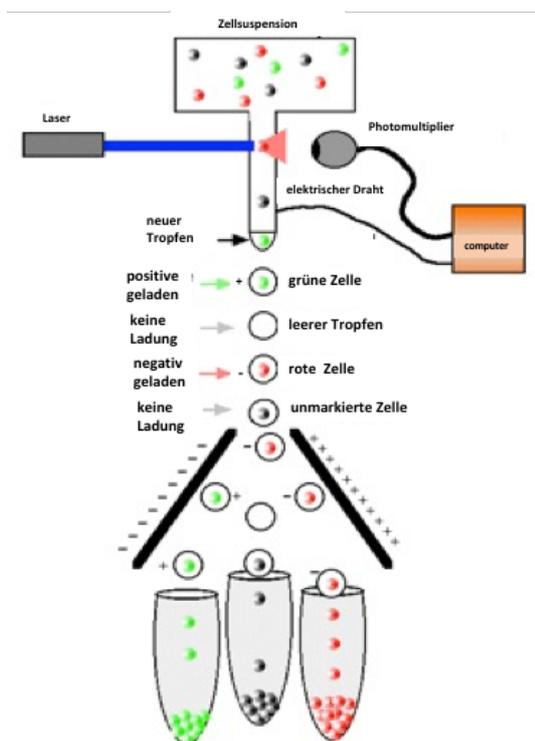


Abbildung 12 Sorting Prinzip Abbildung, mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. rer. nat. Uwe Speck Applikationsspezialist Sorter übernommen (BD Biosciences)

Nach dem Sortierprozess wurden die Zellen so schnell wie möglich zurück ins Forschungslabor nach Großhadern gebracht, um dort die weiteren Experimente mit den sortierten Zellen fortzuführen.

4.2.6.2 Spheroid Formation Assay (SFA)

Die Zellen wurden für den SFA nach dem Sortieren zuerst mit DPBS gewaschen.

Danach wurde das Medium für die Kultivierung vorbereitet. Für das SFA wurde eine beschichtete 96-Well-Platte (low-attachment plate) verwendet. Für die Herstellung des Mediums wurden 5ml Methylzellulose (zur Verhinderung der Bildung von Zellaggregaten) und 5ml DMEM/F12 mit 1% PenStrep in ein 15ml Falcon überführt. Diese beiden Komponenten wurden vermischt, durch einen 0,45µm Filter in ein neues 15ml Falcon gepresst und anschließend mit 200µl B27 (50x) und 1µl FGF-β und EGF versetzt und mithilfe eines Vortex-Mixers vermischt.

Darauffolgend wurden 1000 Zellen im 5-fachen Ansatz eingesät und für eine Woche im Brutschrank kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde 100µl frisches Medium in die Wells gegeben, um das Austrocknen der Zellen zu verhindern.

Die Analyse erfolgte nach 10 Tagen unter dem Mikroskop.

Herstellung des Mediums für das SFA

Reagenz	Menge
Methylzellulose	1%
DMEM/F12 Medium mit 1% PenStrep	5ml
B27 (50x)	200µl
EGF	10ng/ml
FGF-β	20ng/ml

Tabelle 34: Herstellung des SFA-Mediums

4.2.7 Lebend-Tot Versuch der Zellen

Vor den Operationen wurde ein Lebend-Tot-Versuch der KPC 661 Zelllinie durchgeführt, um die Überlebensdauer der Zelllinie besser einschätzen zu können. Hierfür wurden die Zellen nach der gleichen Vorgehensweise wie bei einer Operation behandelt. Stündlich wurde das Lebend-Tot-Verhältnis der Zellen mit Trypanblau und per Durchflusszytometer mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD analysiert.

4.2.8 Tierexperimentelle Versuche

Die Tierversuche erfolgten nach Genehmigung des TV 55.2-1-54-2532-84-2016.

4.2.8.1 Mäuse

Für die Experimente wurde der weitverbreitete Inzuchtstamm C57 Black 6 (C57BL/6) von Charles River verwendet. Jeder Stamm der C57BL/6 Kolonie von Charles River ist genetisch identisch und die Mäuse wiesen schwarzes Haarkleid auf. Für die subkutanen sowie orthotopen Injektionen wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, da diese meist ein geringeres Aggressionspotential in Bezug auf Kannibalismus aufweisen und somit für eine längere Experimentdauer einfacher handzuhaben waren. Zum Zeitpunkt der Injektionen waren die Mäuse 8 Wochen alt.

4.2.8.2 Tierstall

Die Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung im Walter-Brendl-Zentrum (WBZ) entsprechend spezieller Hygienebedingungen bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ gehalten. Erst nach Anlegung sauberer Schutzkleidung, Handschuhen, Mundschutz und Kopfhabe im Vorraum des Tierstalls gelang man über eine Schleuse in den Tierstall. Zwischen Tierstall und dem davorliegenden Reinigungsraum herrschte ein abfallender Druckgradient, um die Einschleppung von Keimen zu verringern.

Abhängig vom Körpergewicht wurde die Käfiggröße und Anzahl der Mäuse pro Käfig festgelegt. Für Mäuse mit einem Körpergewicht von unter 20g wurden Standard Makrolon Käfige des Typ II verwendet mit bis zu 3 Mäusen. Die Käfige waren aus transparentem, schlagfestem Kunststoff.

Ein Käfig- und Flaschenwechsel erfolgte mindestens einmal die Woche, wobei die Käfige in der Käfigspülmaschine gereinigt wurden. Die Käfigdeckel wurden alle 2 Wochen gewechselt und gereinigt.

Beim Einstreu handelte es sich um ein zertifiziertes, staubarmes, grobes Weichholzfasereinstreu (Abbed Nestbaumaterial NGB E-011, Faserbreite 3,5mm, E-012, Faserbreite 4mm+NBU E-014, Faserbreite 120mm). Zusätzlich hatten die Mäuse einen zertifizierten, autoklavierbaren Spieltunnel, Nagerhölzer, weiche weiße Cellulose in Form von Labortüchern (Henry Schein) sowie Zellstofftuper (4x5cm) in ihren Käfigen.

Die Tiere hatten einen Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden und hatten unbeschränkt Zugang zu Futter und Wasser. Die Fütterung erfolgte mit einem standardisiertem, pelletierten Alleinfuttermittel.

Um den Stress für die Tiere möglichst gering zu halten und ihnen eine Anpassung an die neuen Umweltbedingungen im Tierstall zu ermöglichen, wurden die Mäuse frühestens 7 Tage nach Anlieferung im WBZ in den Versuch genommen.

4.2.8.3 Vorbereitung der KPC 661 Zelllinie für die subkutanen Xenotransplantationen

4.2.8.3.1 Subkutane Xenotransplantation mit/ohne sortierte Zellen

Die Zellen wurden passend zum geplanten OP-Zeitpunkt in einer Verdünnung von 1:15 gesplittet, sodass die Zellen am dritten/vierten Tag eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen. Dies war von Bedeutung, da das Zellwachstum zum Zeitpunkt der OP nicht durch eine zu hohe Zelldichte gehemmt werden sollte. Die Herstellung der Zellsuspension fand am Morgen der Operation unter der Sterilbank statt. Die adhärenenten Zellen wurden isoliert und nach dem Zentrifugieren in 2ml DPBS resuspendiert, gezählt und die entsprechende Zellmenge für die OP in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen waren in je 50 μ l DPBS gelöst und in zuvor rasierte Hautstellen s.c. injiziert. Die Injektionsstellen waren lumbar rechts und links sowie hochthorakal ebenfalls beidseitig.

Die sortierten Zellen wurden auf Eis gelagert, zentrifugiert und in der entsprechenden Menge DPBS resuspendiert. Jede Maus erhielt 4 Injektionen einer Verdünnung in je 50 μ l DPBS. Auf der linken Körperhälfte vorne und hinten Lgr4⁺-sortierte Zellen und auf der rechten Körperhälfte die Lgr4⁻-sortierten Zellen (siehe Abb.13). Pro Dilution wurden 3 Mäuse injiziert. Die Negativkontrollmaus wurde mit den 3 Dilutionen unsortierter Zellen injiziert.

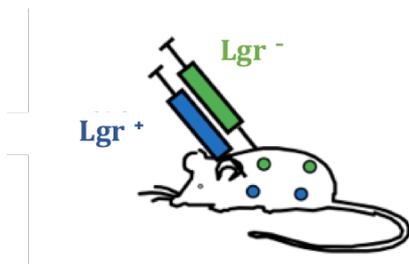


Abbildung 13 Injektionsschema der s.c. Injektionen

4.2.8.4 Orthotopes Mausmodell

4.2.8.4.1 Gewinnen der KPC 661 Zellen für die OP

Für die orthotopen Injektionen wurden die Zellen gelöst in 5µl DPBS injiziert.

4.2.8.4.2 Orthotope Xenotransplantation per Laparatomie

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mit einer Injektionsnarkose durch intraperitoneale Applikation (i.p.) von 2,5µl/g KG der Maus der Narkosemischung MMF (siehe 2.1.8.2.) wird die chirurgische Toleranz nach wenigen Min. erreicht. Jede Maus wurde einzeln in Narkose gelegt. Nachdem eine Maus injiziert ist, wurde Bepanthen-Augensalbe verabreicht, um die Cornea vor dem Austrocknen zu schützen. Um für eine ausreichende Analgesie zu sorgen, wurde den Mäusen vor Operationsbeginn zusätzlich Rimadyl (100µl/10g KGW) s.c. verabreicht. Das Abdomen der Maus wurde in der Medianen substernal und unterhalb des Rippenbogens großzügig rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Die Tiere wurden auf einer Wärmeplatte mit sterilem OP-Tuch in Dorsallage leicht nach rechts gedreht mithilfe von Leukoplast an allen vier Gliedmaßen fixiert, um somit einen möglichst kleinen und präzisen Flankenschnitt unterhalb des Rippenbogens zu ermöglichen. Vor Beginn der Laparotomie wurde die Ausschaltung der Schmerzreflexe durch Kneifen in eine Pfote getestet. Wenn hierbei keinerlei Reaktion stattfand, konnte der erste Scherenschnitt zur Eröffnung des Abdomens stattfinden. Nach Eröffnung des Abdomens war direkt die Milz sichtbar. Durch eine vorsichtige Hervorluxation der Milz mithilfe einer Ösenpinzette, wurde das Pankreas sichtbar. Nach korrekter Lokalisation des Pankreas wurde die gewünschte Dilution von 10.000, 25.000 oder 50.000 Zellen in 5µl PBS mit einer Mikroliterspritze in den Pankreaskopf injiziert. Nach der Implantation wurde die Milz mithilfe der Ösenpinzette für ca. 30Sek. fixiert, um dadurch einen Rückfluss der Zellen zu verhindern. Am Ende wurde das Pankreas in seine anatomische Position rückverlagert. Nach der Reposition des Pankreas erfolgte eine zweischichtige Naht. Die erste Schicht, bestehend aus Peritoneum, Fascia superficialis und den Bauchmuskeln wurde mit einer fortlaufenden Naht und resorbierbaren 5-0 Vicryl Fäden verschlossen. Die zweite Schicht, Kutis erfolgte mit Einzelheften und resorbierbaren 4-0 Vicryl Fäden. Für beide Nähte wurde eine Nadel-Faden-Kombination verwendet. Zusätzlich zu den Einzelheften wurden noch 2 Hautklammern angelegt, welche 7 Tage post OP wieder entfernt wurden. Die Antagonisierung erfolgte mit einer s.c. Injektion von ANF (8,5µl/g KG der Maus). Der operative Eingriff wurde von den Versuchstieren gut vertragen und es kam zu keinen Anästhesie-bedingten Todesfällen. Post-OP erhielten alle Mäuse zur Analgesie drei Tage lang 50µl Rimadyl s.c.. Das Tumorwachstum wurde in regelmäßigen Abständen durch Untersuchung und Palpation der Haut bzw. des Abdomens kontrolliert zusätzlich wurde das Allgemeinbefindens der Tiere mithilfe des Body Condition Score (BCS) überwacht.

4.2.8.5 Tötungskriterien laut TV 55.2-1-54-2532-84-2016

Für die jeweiligen Versuche wurden Empfehlungen der ATBW (Arbeitsgemeinschaft der Tierschutzbeauftragten in Baden-Württemberg) und folgende Abbruchkriterien beachtet.

- ✓ Äußerlich sichtbarer Tumor <1cm³
- ✓ Auftreten von Aszites oder Ikterus
- ✓ Schlechtes Allgemeinbefinden: struppiges Fell, Unterkühlung, Verweigerung der Futteraufnahme, Dehydratation
- ✓ Offensichtliche Zeichen von Schmerz oder Unwohlsein: gekrümmte Haltung, reduzierte Aktivität, Gewichtsverlust <20%
- ✓ Respiratorische Insuffizienz (Dyspnoe)

Generell mussten die Tiere spätestens 60 Tage nach Versuchsbeginn mittels zervikaler Dislokation getötet werden.

4.2.8.6 Präparation von Tumoren

Die tumortragenden Mäuse wurden abhängig von der Größe des Hauttumors in der siebten bis neunten Versuchswoche tierschutzgerecht mittels zervikaler Dislokation getötet. Bei den orthotopen Tumoren wiesen die Mäuse, abhängig von der Menge an injizierten Zellen, drei bis vier Wochen post-OP ein verändertes Allgemeinbefinden auf, worauf die Tiere ebenfalls durch eine zervikale Dislokation erlöst und auf orthotope Tumore, Lymphknoten-, Milz-, und Lebermetastasen hin untersucht wurden. Unmittelbar nach der Tötung der Tiere wurden die Tumoren steril entnommen. Die subkutanen Tumore wurden mithilfe eines Skalpell isoliert. Für die Isolierung orthotoper Primärtumore wurde der Bauchraum eröffnet und die Tumoren samt Metastasen vorsichtig, mithilfe einer anatomischen Pinzette und Schere, entnommen. Abhängig von der darauffolgenden Verarbeitung der Tumore, wurden diese in Kryoröhrchen in Flüssigstickstoff verbracht, in Einbettkassetten mit 4% Formaldehydlösung oder für die Rekultivierung in ein Falcon mit einer Medium-Trypsin Mischung überführt. Die Tumoren wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

4.2.8.7 Verarbeitung von Tumorgewebe

4.2.8.7.1 Gewinnen der Gewebeproben in Paraffinwachs

Die Tumoren wurden nach der Entnahme in Einbettkassetten gelegt und über Nacht in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben für eine Stunde lang unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin wurden die Einbettkassetten in 70%iges Ethanol überführt und im Laufe von 7 Tagen in einem Histomaten (Einbettungsautomaten) automatisch verarbeitet. Im Histomaten werden die Proben mithilfe einer aufsteigender Ethanolreihe entwässert (70%, 96% und 100%), in Xylol getränkt und als letztes in flüssiges Paraffin getränkt.

Das Ausgießen der Proben mit Paraffin erfolgte am gleichen oder spätestens nächsten Tag, somit lag das Gewebe am Ende als schneidfertiger Paraffinblock vor.

4.2.8.7.2 Schneiden von Paraffinblöcken

Für die Färbungen mussten aus den Paraffinblöcken Schnitte hergestellt werden. Die Paraffinblöcke wurden bei -20°C im Kryostat vorgekühlt und anschließend mithilfe eines Microtoms bis zum Tumorgewebe angeschnitten. Es wurden 8µm und 10µm dicke Schnitte hergestellt. Danach wurden diese in das vorgewärmte Paraffinstreckbad überführt und auf die Objektträger aufgenommen. Die Objektträger wurden für eine Stunde im Inkubator bei 37°C getrocknet, deparaffiniert und über Nacht in einem Wärmeschrank gelagert.

4.2.8.7.3 Hämalaun- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung dient zur schnellen, morphologischen Übersicht des Gewebes. Durch das Hämatoxylin werden die Zellkerne blau gefärbt, durch Eosin das Cytoplasma rötlich.

Als erster Schritt wurden die Schnitte 2x für 10Min. in Xylol entparaffiniert und mithilfe von einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 99%, 99%, 96%, 96%, 70% und nochmals 70%) rehydriert. Die Schnitte wurden in jeder Konzentration für 5 Min. inkubiert. Anschließend wurden sie für 5 Min. in Aqua dest. inkubiert und darauffolgend kurz mit Leitungswasser gespült. Als nächstes wurden die Objektträger für 3 Min. in Hämalaun nach Mayer geschwenkt. Das Bläuen geschieht mithilfe von fließendem Leitungswasser, wodurch die Farbe stabilisiert wird. Da erst durch ein saures Milieu die beste Kernfärbung zustande kommt, werden die Schnitte vor der Hämalaun-Lösung in einer 1%HCl 70%-Ethanol-Lösung für kurze Zeit eingetaucht. Nach dem Bläuen wurden die Proben erneut kurz mit Aqua dest. gewaschen und anschließend erfolgte die Gegenfärbung in Eosin für 30 Sek. Nach der Zytoplasmafärbung wurden die Proben kurz mit Leitungswasser gespült und mithilfe von einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%, 96%, 99%) dehydriert. Als letzter

Schritt erfolgte eine Fixierung in Xylol für 5 Min. und die Schnitte wurden am Ende der Färbung mithilfe eines Eindeckmediums und einem Deckglas beschichtet eingedeckt.

Danach konnten die Schnitte unter dem Mikroskop verglichen und begutachtet werden.

Herstellung der Eosin-Lösung

Reagenz	Menge
Eosin	1g
Ethanol 96%	100ml

Tabelle 35: Herstellung der Eosin-Lösung

4.2.9 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism Version 5,6 und 7 durchgeführt. Der Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit dem ANOVA (one way analysis of variance) und dem Bonferroni's post-hoc Test (Bonferroni Korrektur) hergestellt. Mithilfe des ungepaarten t-tests wurden die Mittelwerte zweier unverbundener Gruppen verglichen unter der Voraussetzung, dass die Werte normalverteilt sind.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$, entspricht *, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{**}$ und $p < 0,0001^{****}$ festgelegt.

5 Ergebnisse

Um die angestrebten Ziele ein besseres Verständnis der Rolle des Lgr4-Rezeptors im PDAC zu erreichen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Im Folgenden werden die daraus gewonnenen Erkenntnisse beschrieben.

Da die Rolle des Lgr4-Rezeptors, wie oben erwähnt, im Verdacht steht auf das Tumorneubildungs- und das Metastasierungspotential einzuwirken, wurde im Folgenden vorerst die Lgr4-Expression auf den verschiedenen KPC/KPCZ Zelllinien analysiert. Anschließend wurde die Zelllinie mit der höchsten Expression mithilfe des FACS-Sorting nach Lgr4⁺- Expression und Lgr4⁻ Expression angereichert und für die *in vivo* Versuche genutzt.

5.1 Isotypenkontrolle des Lgr4-Antikörpers im FACS

Vor Beginn der Analyse mit dem Durchflusszytometer wurde die Spezifität des markierenden Lgr4-AKs mithilfe einer Isotypenkontrolle bestätigt.

Die Histogramme der Isotypen aus der Durchflusszytometrie wurden mit den Histogrammen der extrazellulär gefärbten Zellen übereinandergelegt, um die Abwesenheit unspezifischer Bindungen zu demonstrieren. In allen Histogrammen der vier Zelllinien ist die extrazelluläre Lgr4-Lokalisation (Pfeil auf grüne Fläche) zu erkennen (siehe Abb. 14).

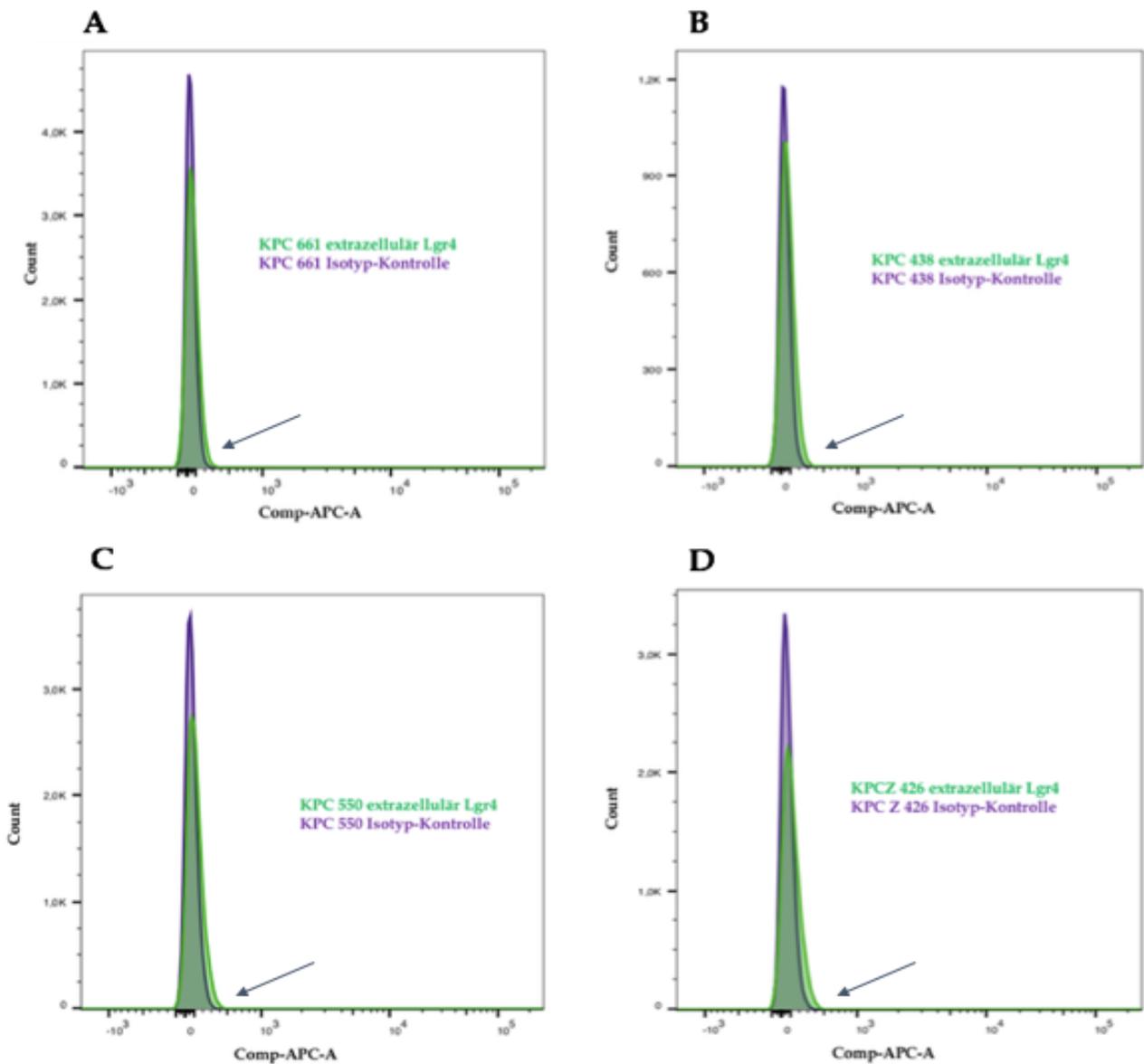


Abbildung 14 Überlagerung der Histogramme der Isotypenkontrollen und extrazellulär gefärbter Zellen

Der Isotyp (lila im Histogramm dargestellt) zeigt die unspezifische Fluoreszenz. In grün wird die spezifische Bindung des AKs an den Lgr4-Rezeptor gezeigt. **[A]** KPC 661 **[B]** KPC 438 **[C]** KPC 550 **[D]** KPCZ 426. n=5

5.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der KPC/KPCZ Zelllinien

Um morphologische Unterschiede der vier Zelllinien detektieren zu können und somit ihren Phänotyp (epithelial, gemischt und mesenchymal) mikroskopisch zu bestätigen, wurden lichtmikroskopische Bilder der Zellen in Kultur angefertigt.

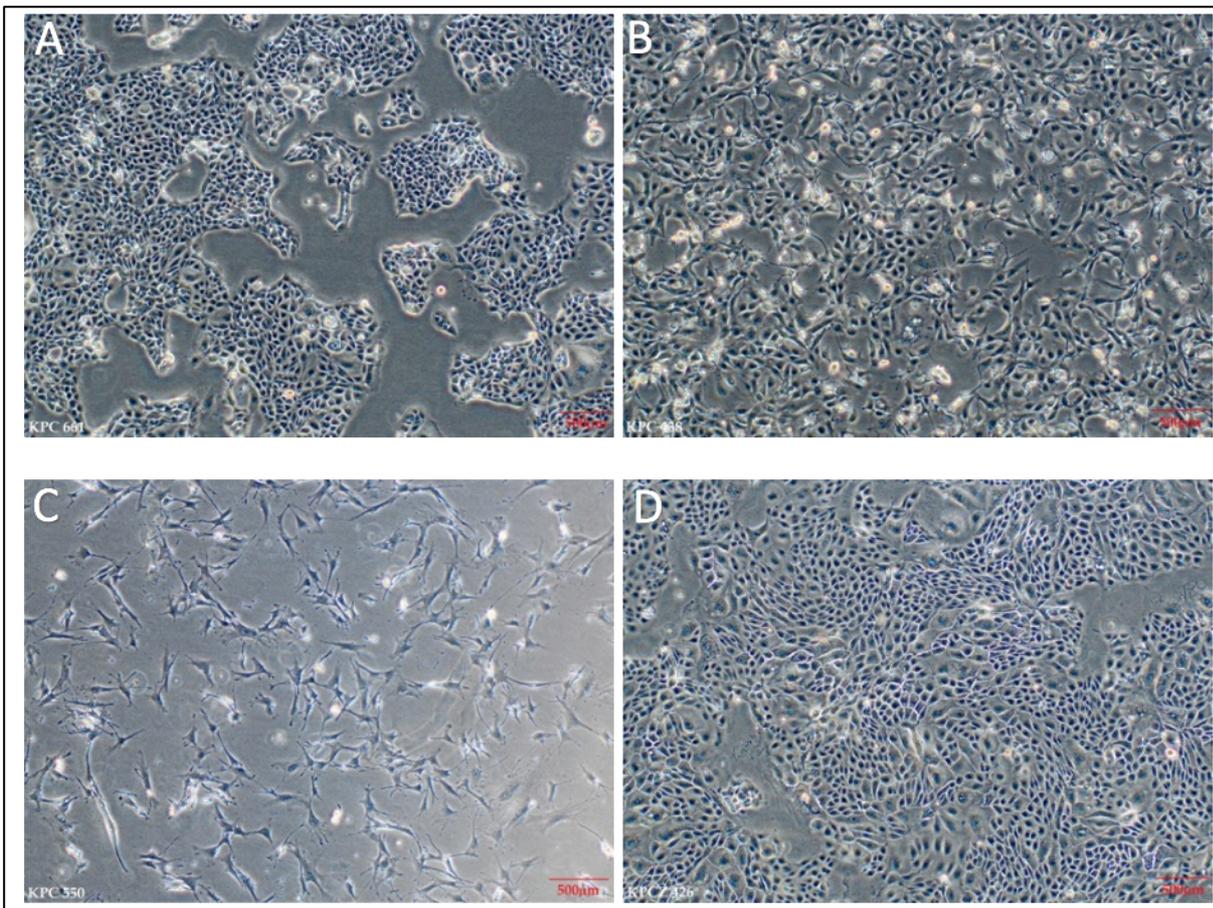


Abbildung 15 lichtmikroskopische Bilder der vier KPC/KPCZ Zelllinien

Lichtmikroskopische Aufnahme bei 10x-Vergrößerung zwei Tage nach Subkultivierung. Die Zellen wurden 1:4 in Kultivierungsmedium in einer T-75 Zellkulturflasche verdünnt. **[A]** epitheliale KPC 661 **[B]** gemischte KPC 438 **[C]** mesenchymale KPC 550 und **[D]** epitheliale KPCZ 426 mit Zeb1-KD [138].

Die KPC/KPCZ Zelllinien wiesen morphologische Unterschiede auf. Während die epithelialen Zelllinien, KPC 661/438 und KPCZ 426 einen eher rundlichen Charakter mit einer deutlichen Zellpolarität und starken Zell-Zell Kontakten aufwiesen, zeigte die mesenchymale Zelllinie KPC 550 hingegen eine längliche, fibroblastenähnliche (spindelförmige) Form mit wenig bis keinen Zell-Zell Kontakten.

Beim Kultivieren hat sich die mesenchymale Zelllinie 550 einfacher aus den Kulturflaschen lösen lassen, während die epithelialen Zelllinien, oftmals zusätzlich mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst werden mussten. Bezüglich des Wachstums in der Kultur waren ebenfalls Unterschiede bemerkbar. Die vier Zelllinien wurden in einem Rhythmus von vier Tagen passagiert. Die Zelllinie KPC 661 zeigte von Anfang an ein sehr konstantes und stabiles Wachstum in Kultur, während die Zellen der KPC 550 anfangs eine deutlich reduzierte Zellverdopplungsrate aufwiesen. Nach einigen Passagen in Kultur zeigten alle Zelllinien ein ähnliches Wachstum mit Ausnahme der Zelllinie KPCZ 426, welche beim Passagieren stärker konzentriert werden musste, da diese meist eine deutlich reduzierte Zellzahl aufwies.

Ein Nachteil der gemischten KPC 438 war das starke Agglutinieren der einzelnen Zellen in der Zellkulturflasche und auch nach der Isolation. Das Vereinzeln der Zellen war auch nach mehrmaliger Resuspension kaum möglich. Aus diesem Grund eigneten sich Zellen dieser Zelllinie nicht für das Sorting und das subkutane/orthotope Tiermodell.

In der Zellkultur erwies sich die KPC 661 aufgrund einer guten Zellverdopplungsrate innerhalb des vier Tage Passagierhythmus als die beste Zelllinie.

5.3 Charakterisierung der Lgr4-Expression auf KPC/KPCZ Zelllinien mithilfe der Durchflusszytometrie

Um die Frage zu beantworten, ob Lgr4 eine oberflächliche Lokalisierung aufweist, wurden die Zellen isoliert, mit dem fluoreszenzmarkierten AK gefärbt und anschließend mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Um die Ergebnisse der extrazellulären Lgr4-Lokalisierung zwischen den verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können, wurde zuerst eine extrazelluläre Gating-Strategie für alle Zelllinien festgelegt.

5.3.1 Extrazelluläre Gating-Strategie der vier Zelllinien

Als erstes wurde mithilfe eines Scatter-Gates durch SSC und FSC und des Vitalfarbstoffes 7AAD die KPC/KPCZ Population in den ungefärbten Zellen der jeweiligen Zelllinie festgelegt. Wie in Abb.17 zu sehen ist, wurden mithilfe des Vitalfarbstoffes 7AAD vorerst die toten Zellen der Probe definiert, um im nächsten Schritt die lebende KPC/KPCZ Population eingrenzen zu können. Nach Festlegung der lebenden Zellen konnte mithilfe eines Gates im Histogramm die Expression des Lgr4-Rezeptors bestimmt werden. Anhand der Fluorescence Minus One (FMO) für Lgr4 auf dem Kanal APC wurde das Gate im Histogramm aus den lebenden KPC/KPCZ identifiziert.

Nach Festlegung der lebenden Zellen KPC/KPCZ konnte anhand der FMO für Lgr4 auf dem Kanal APC das Gate für die Bestimmung der Lgr4-Expression im Histogramm identifiziert werden.

Diese extrazelluläre Gating-Strategie wurde für alle Messungen der KPC/KPCZ-Zellen angewendet.

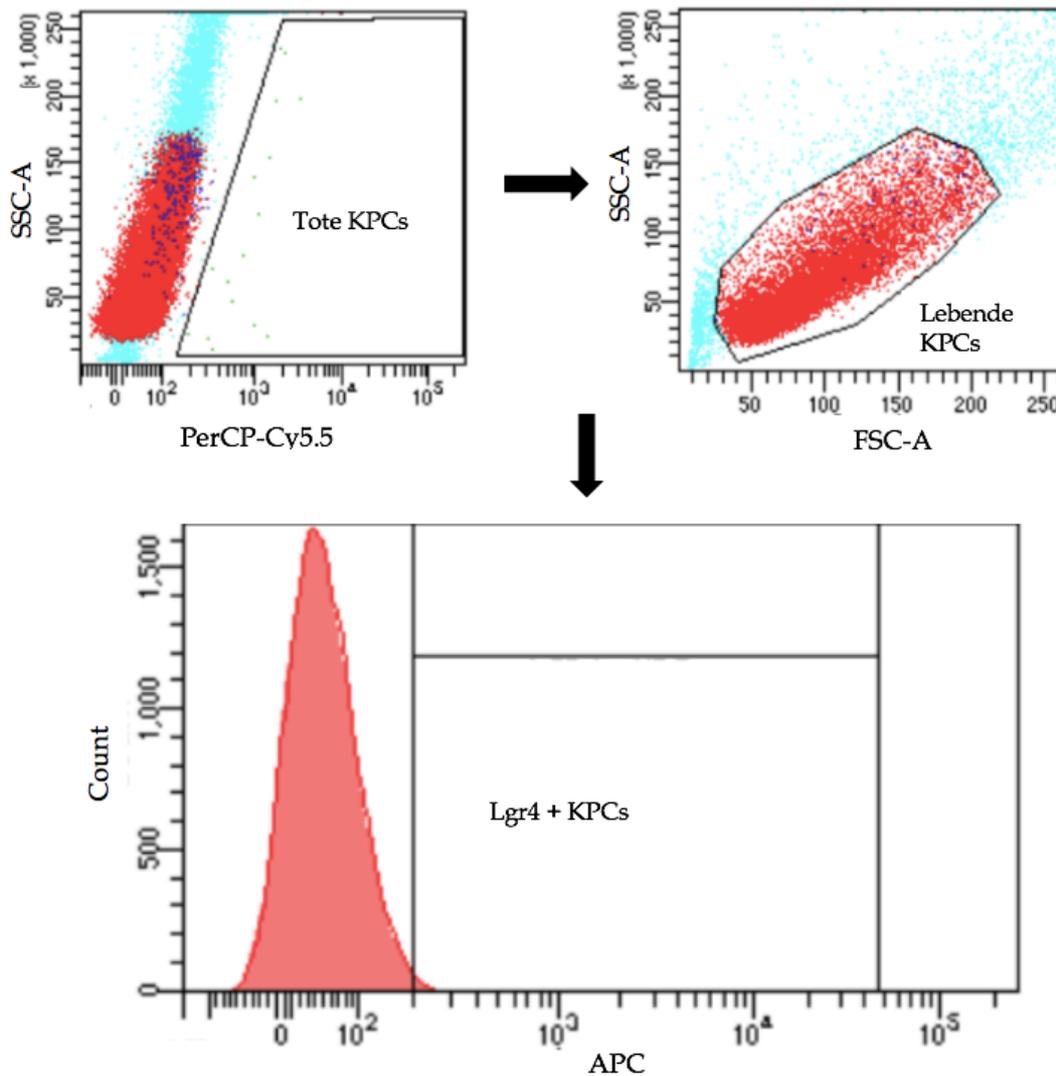


Abbildung 16 Gating-Strategie für extrazelluläres Lgr4

Basis-Gating für jede der KPC/KPCZ Zelllinien zur Messung der extrazellulären Lgr4-Expression. Im ersten Dot-Plot wurden aus der gesamten KPC/KPCZ-Population mithilfe des Vitalfarbstoffes 7-AAD zuerst die toten Zellen definiert. In der nächsten Abbildung (rechts) wurde die lebende KPC/KPCZ Population im Scatter-Gate durch SSC und FSC festgelegt und Zelltrümmer/tote Zellen für weitere Analysen ausgeschlossen. Aus den lebenden Zellen wurde mithilfe eines Histogramms die Lgr4-Expression der jeweiligen Zelllinie durch das richtige Gate bestimmt. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des AKs wurde eine Färbung für die Isotypenkontrolle durchgeführt.

5.3.2 Messung der extrazellulären Lgr4-Expression

Nach Festlegung der extrazellulären Gating-Strategie wurden die Proben analysiert. Für einen Vergleich der Expressionen der vier Zelllinien wurden die Ergebnisse der Messungen in Histogrammen dargestellt.

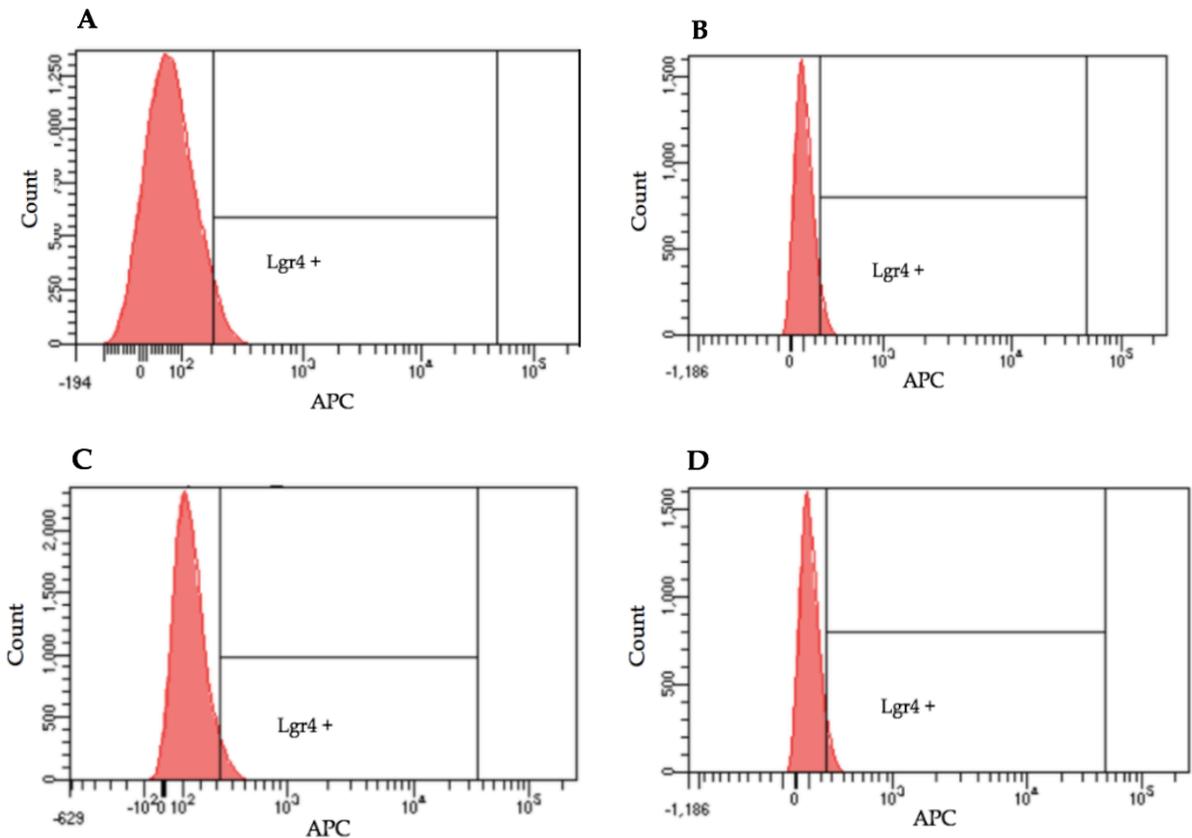


Abbildung 17 Repräsentative Histogramme aus der FACS-Analyse der extrazellulären Lgr4-Expression

Darstellung der extrazellulären Lgr4-Expression in Histogrammen [A] KPC 661 [B] KPC 438 [C] KPC 550 [D] KPCZ 426
 Vergleicht man die Lgr4-Expressionen der KPC/KPCZ Zelllinien dargestellt in Histogrammen (Abb.17) so wird deutlich, dass alle Zelllinien eine ähnlich starke Lgr4-Expression aufweisen.
 Im Anschluss aller Messungen wurden die Ergebnisse verglichen, statistisch erfasst und in Abb.18 dargestellt.

5.3.3 Vergleich der extrazellulären Lgr4-Expression in den KPC/KPCZ

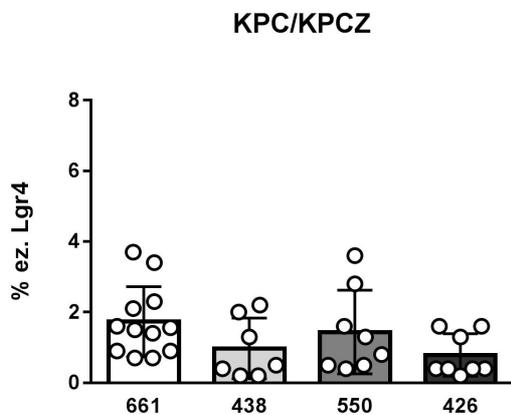


Abbildung 18 Vergleich der extrazellulären Lgr4-Expressionen in den KPC/KPCZ Zelllinien

Darstellung der extrazellulären (ez) Lgr4-Expression in % der vier Zelllinien bei der FACS-Analyse. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen errechnet durch ANOVA mit Bonferroni Korrektur. KPC 661 n=12, KPC 438 n=7, KPC 550 n=8, KPC 426 n=8. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot.

Bei der Messung der extrazellulären Lgr4-Expression im Durchflusszytometer konnten zwar keine signifikanten Unterschiede der Expression innerhalb der vier KPC/KPCZ Zelllinien festgestellt werden, jedoch wies die KPC 661 mit der KPC 550 mit Werten von bis zu 3,7% bzw. 2,8% die höchste extrazelluläre Lgr4-Expression auf.

Um Lokalisierungsunterschiede des Lgr4-Rezeptors auf den KPC/KPCZ zu detektieren wurde als nächstes zusätzlich die intrazelluläre Expression des Lgr4-Rezeptors mithilfe des Durchflusszytometers gemessen.

Für das subkutane/orthotope Tiermodell ist vor allem die extrazelluläre Lokalisierung des Lgr4-Rezeptors von Bedeutung, da bei einer vermehrten intrazellulären Lokalisierung die Zellen nicht sortiert werden können.

5.3.4 Intrazelluläre Gating-Strategie der vier Zelllinien

Auch für die intrazelluläre Messung der Lgr4-Expression wurde eine Gating-Strategie (Abb.19) festgelegt und für die vier Zelllinien angewendet.

Hierfür wurde ebenfalls zuerst mithilfe eines Scatter-Gates durch SSC und FSC die KPC/KPCZ Population in den ungefärbten Zellen der jeweiligen Zelllinie festgelegt.

Im nächsten Schritt wurde die Lgr4-Expression mithilfe des korrekten Gates im Histogramm gemessen.

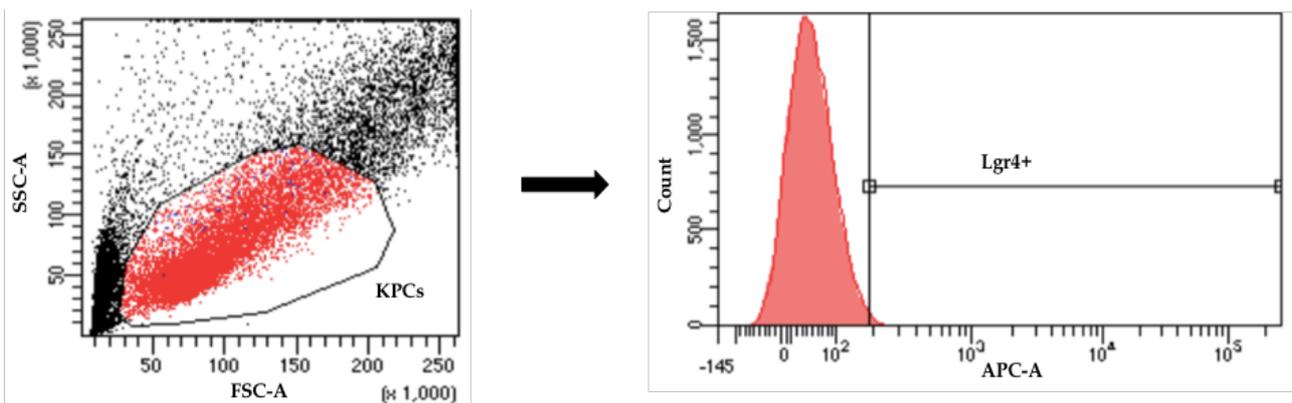


Abbildung 19 Gating-Strategie intrazelluläres Lgr4

Basis-Gating für jede der KPC/KPCZ Zelllinien zur Messung der intrazellulären (iz) Lgr4-Expression. Im ersten Dot-Plot wurde die jeweilige viable KPC/KPCZ-Population im Scatter-Gate mithilfe von SSC und FSC unter Exklusion der Zelltrümmer definiert, um im nächsten Bild (Histogramm) die Lgr4-Expression bestimmen zu können.

5.3.5 Messung der intrazellulären Lgr4-Expression

Mithilfe der intrazellulären Gating-Strategie wurden alle Proben analysiert und die Lgr4-Expression bestimmt. Die Darstellung der intrazellulären Lgr4-Expression wurde ebenfalls in Histogrammen dargestellt. In Abb.20 sind repräsentative Histogramme der vier Zelllinien dargestellt. Die KPC 661 und 438 zeigen signifikant höhere Expressionen als KPC 550 Zellen.

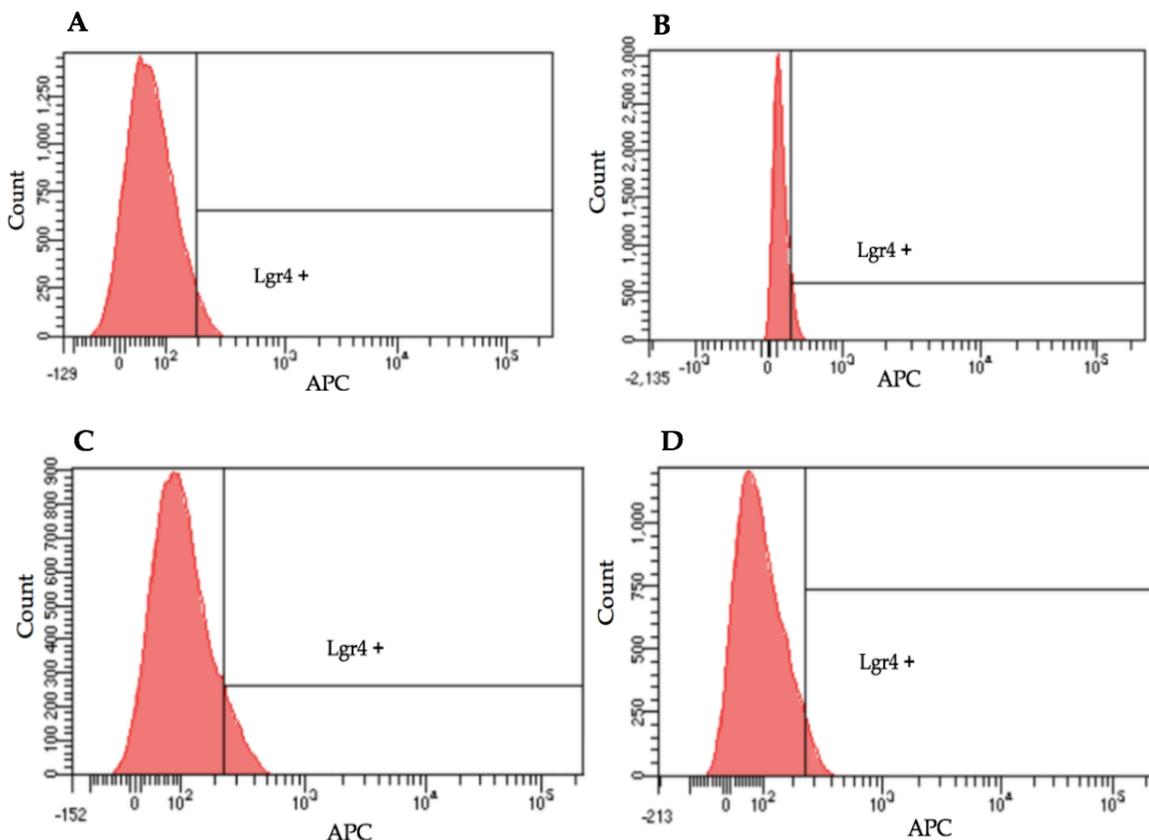


Abbildung 20 Repräsentative Histogramme aus der FACS-Analyse der intrazellulären Lgr4-Expression

Darstellung der intrazellulären Lgr4-Expression in Histogrammen [A] KPC 661 [B] KPC 438 [C] KPC 550 [D] KPCZ 426

Wie in Abb.20 zu sehen ist, zeigen alle vier Zelllinien ebenfalls eine ähnlich hohe intrazelluläre Lgr4-Expression mit Werten zwischen 0,7 bis 1,6%. Um die Expressionen der einzelnen Zelllinien besser vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse wie auch bei der Messung der extrazellulären Lokalisierung von Lgr4 verglichen, statistisch analysiert und in Abb.21 dargestellt.

5.3.6 Vergleich der intrazellulären Lgr4-Expressionen in den KPC/KPCZ

Die intrazelluläre Lgr4-Expression der vier Zelllinien wurde erfasst und miteinander verglichen.

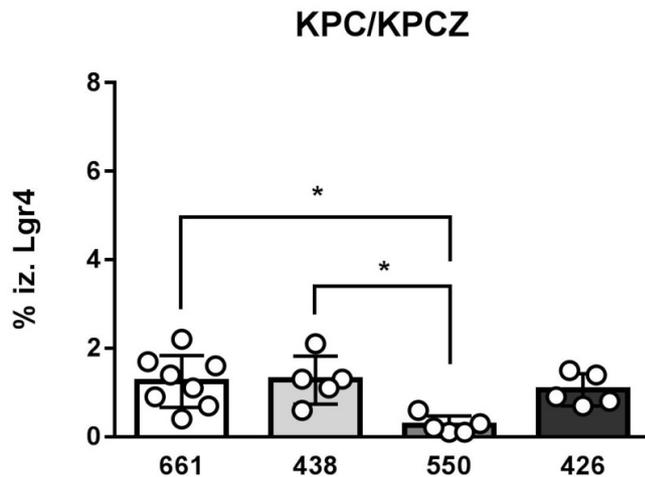


Abbildung 21 Vergleich der intrazellulären Lgr4-Expressionen in den KPC/KPCZ Zelllinien

Darstellung der intrazellulären (iz.) Lgr4-Expressionen in % der vier Zelllinien bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung errechnet durch ANOVA mit Bonferroni Korrektur KPC 661 n=8, KPC 438, KPC 550, KPCZ 426 n=5. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot p<0,05*

Im Gegensatz zur extrazellulären Lgr4-Messung zeigten sich intrazellulär signifikante Unterschiede in der Expression. Die intrazelluläre Lgr4-Analyse der KPC 661 und 438 waren mit Ergebnissen von bis zu 2,2% bzw. 2,1% gemessener Lgr4-Expression signifikant höher als die der KPC 550 (max. 0,6%). Auch die intrazelluläre Expression von Lgr4 in KPCZ 426 mit einer durchschnittlichen Expression von 1,0% war sehr hoch, jedoch zeigte diese Zelllinie in der Zellkultur immer noch eine verminderte Zellverdopplungsrate.

Ebenfalls war für das Sorting und die darauffolgenden subkutanen/orthotopen Injektionen vor allem aber die extrazelluläre Lgr4-Expression von Bedeutung.

Um mögliche Unterschiede in der extra- und intrazellulären Lgr4-Expression nachweisen zu können, wurden die Expressionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Zellkultur analysiert. Hierfür wurden frisch eingesäte KPC 661 Zellen mit länger in der Kultur passagierten KPC 661 Zellen verglichen.

Das Wachstum der Zellen mit verschiedener Anzahl von Passagen wies keine Unterschiede auf. Beide Passagen zeigten eine ähnlich hohe Zellverdopplungsrate und konnten wie die übrigen Zellen im 4-Tages-Rhythmus passagiert werden.

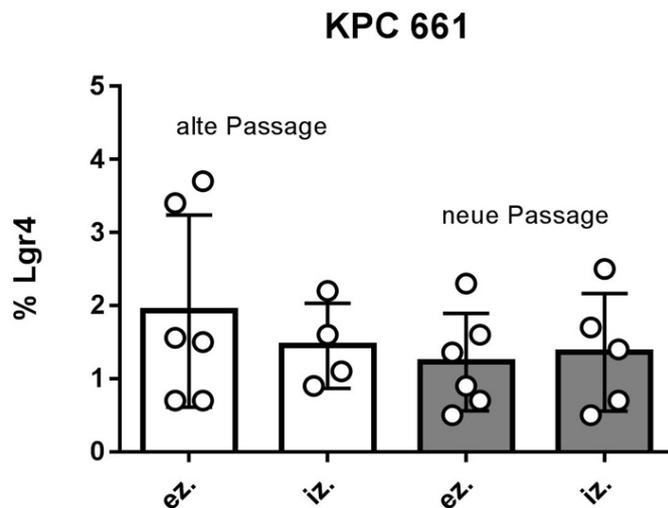


Abbildung 22 Durchflusszytometrische-Analyse alte Passage vs. neue Passage KPC 661

Darstellung der extra (ez.) - und intrazellulären (iz.) Lgr4-Expression in % in älteren Passagen 26-32 und neueren Passagen 10-16. Alte Passage ez. n=6 iz. n=4, neue Passage ez. n=6 iz. n=5. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter DotPlot.

Auch zwischen älteren und neueren Passagen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression des Rezeptors detektiert werden. Für das Sorting wurde die Zelllinie KPC 661 verwendet, welche eine konstante Zellverdopplungsrate aufwies und nicht über 30 Passagen in Kultur war.

Zusätzlich wurde die Lgr4-Expression bei unterschiedlicher Lösung der Zellen in Kultur gemessen.

5.3.7 Vergleich der Lgr4-Expression bei Lösung der Zellen mit Trypsin und Zellschaber

Zusätzlich wurde die extra- und intrazelluläre Lgr4-Expression der Zellen in Kultur bei Lösung mit Trypsin-EDTA oder mithilfe eines Zellschabers analysiert. Anschließend wurden zur Verdeutlichung die Ergebnisse der Messungen statistisch verglichen.

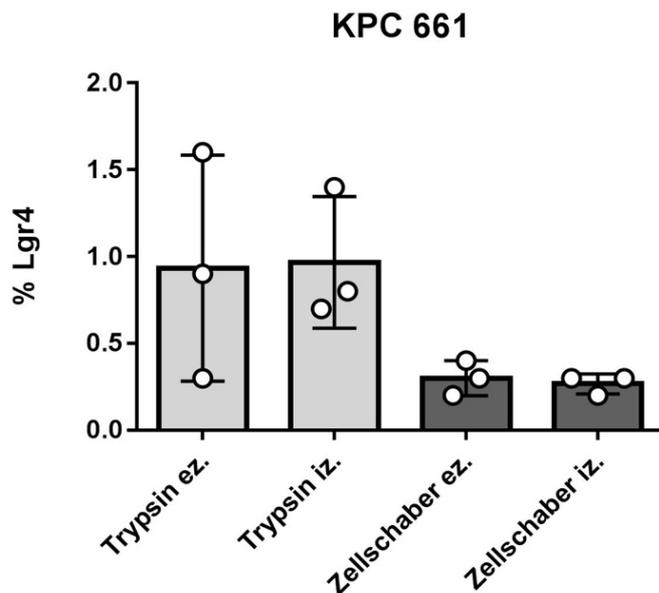


Abbildung 23 Analyse mit dem Durchflusszytometer bei Lösung der Zellen mit Trypsin und Zellschaber

Darstellung der extra (ez.)- und intrazellulären (iz.) Lgr4-Expression in % bei Lösung der Zellen in Zellkultur mit Trypsin-EDTA und einem Zellschaber ohne Trypsin-EDTA. Trypsin ez. n=3 iz. n=3, Zellschaber ez. n=3 iz. n=3. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot.

Bei unterschiedlicher Lösung der Zellen zeigten sich zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch führte die Lösung der Zellen mit Trypsin zu einer tendenziell höheren extra- sowie intrazellulären Menge an Lgr4-Expression. Aufgrund dessen wurden die Zellen auch für das FACS-Sorting weiterhin mit Trypsin aus den Zellkulturflaschen gelöst.

Um weitere Unterschiede der Expressionen detektieren zu können, wurden zusätzlich zu normalen, adhärenen Zellkulturen, Sphäroidkulturen der vier Zelllinien angelegt. Es wurde überprüft, ob in den multizellulären Sphäroiden eine unterschiedliche Lgr4-Expression vorlag. Vorerst wurden morphologische Unterschiede der Sphäroide verglichen.

5.3.8 Begutachten der Morphologie von Sphäroiden im Lichtmikroskop

Um wie auch in der normalen Zellkultur der KPC/KPCZ Zellen morphologische Unterschiede feststellen zu können, wurden zur Detektion morphologischer Unterschiede zwischen den Sphäroiden der vier Zelllinien phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

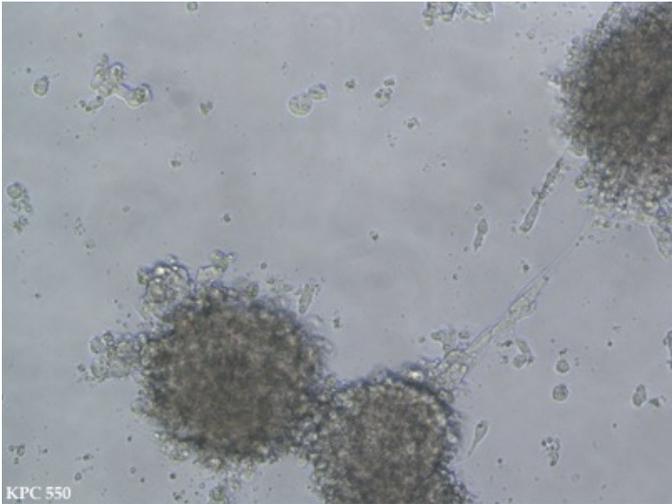


Abbildung 24 Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahme multizellulärer Tumoraggregate der KPC 550 Zelllinie

Bildung kompakter dreidimensionaler Sphäroide der KPC 550 Zelllinie

Nur die mesenchymalen KPC 550 Zellen bildeten nicht adhärenente, dreidimensionale Sphäroide. Die KPC Zelllinien 661 und 438, sowie KPCZ 426 sind trotz Sphäroidmediums weiter als adhärenente Kulturen gewachsen und bildeten nur sehr wenig dreidimensionale, vielzellige Sphäroide. Um die Sphäroide für die Analyse mit dem Durchflusszytometer zu isolieren, wurden sie wie beschrieben aus der Kultur entnommen und mit dem Lgr4-AK gefärbt. Die Ergebnisse der Messungen wurden verglichen und in Abb.25 dargestellt.

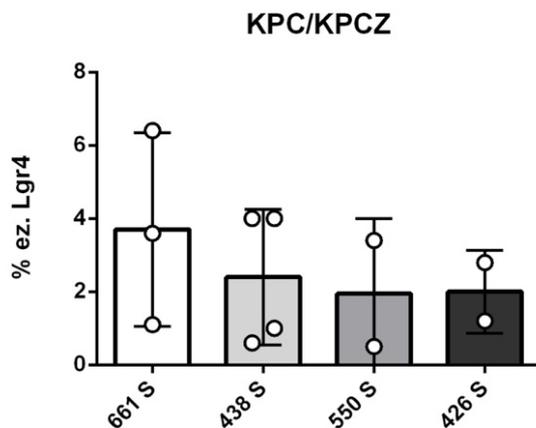


Abbildung 25 extrazelluläre Lgr4-Expression in Sphäroiden der KPC/KPCZ

Darstellung der extrazellulären Lgr4-Expression in % der vier Zelllinien bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung ermittelt durch ANOVA mit Bonferroni Korrektur. KPC 661 n=3, KPC 438 n=4, KPC 550 KPCZ426 n=2. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot

Auch die statistische Analyse der Lgr4-Expressionen in den Sphäroiden der jeweiligen Zelllinien zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Expression zwischen den einzelnen Messungen war wenig beständig. Ähnlich wie die Messungen der normalen, adhärenente Zellen zeigten hier die

KPC 661 mit durchschnittlich 3,7% Lgr4-Expression und 438 mit durchschnittlich 2,4% die höchsten Expressionen.

Die Ergebnisse der extrazellulären Lgr4-Expression war in den Sphäroiden zwar etwas höher im Gegensatz zu normalen, adhärennten Zellen, jedoch war die Expression nicht konstant höher.

Zusätzlich zur Analyse der Zellen mit dem Durchflusszytometer wurden weitere Methoden zur Lgr4-Messung angewandt.

5.4 Charakterisierung der Lgr4-Expression in KPC/KPCZ mithilfe des Western Blots

Für die Analyse der Lgr4-Expression (intra- und extrazellulär) im Proteinisolat wurde ein Western Blot der vier Zelllinien sowie deren Sphäroide durchgeführt.

5.4.1 Western Blot von adhärennten sowie sphäroidalen Kulturen der KPC/KPCZ Zelllinien

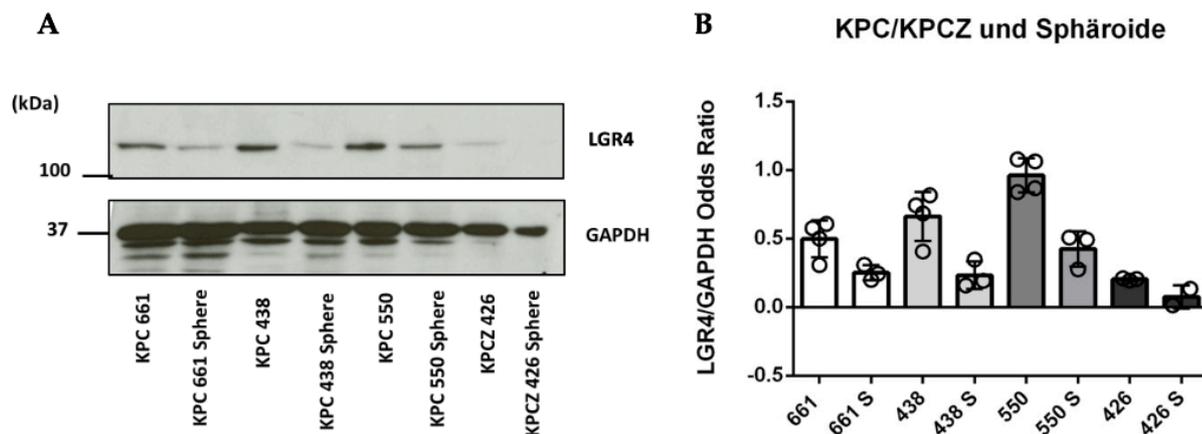


Abbildung 26 Western Blot zur Messung der Lgr4-Expression in KPC/KPCZ und deren Sphäroiden

[A] Western Blots von Lgr4 (obere Bande, 104kDa) und Housekeeping Protein GAPDH (untere Bande, 37kDa). **[B]** Quantifizierung der Bandenintensität von [A] mit ImageJ. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot. KPC 661,438,550 n=4, KPCZ426 n=3, Sphäroide n=3, 426S n=2

Im Western Blot konnte die höchste Proteinexpression von Lgr4 in KPC 550 und KPC 438 festgestellt werden, während die KPCZ 426 im Vergleich die niedrigste Expression aufwies.

Um im Weiteren genauer die Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien detektieren zu können, wurden die Zelllinien einzeln statisch verglichen.

5.4.1.1 Vergleich der Lgr4-Expression in den einzelnen Zelllinien im Western Blot

Es konnten signifikant unterschiedliche Lgr4-Expressionen zwischen den KPC und KPCZ Zelllinien detektiert werden.

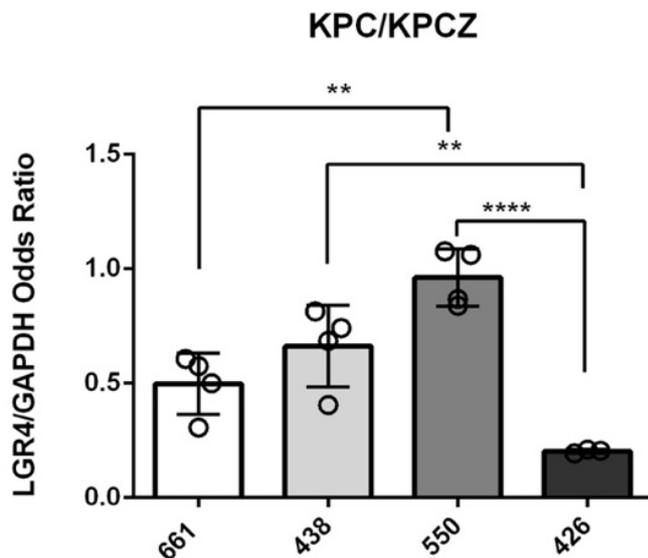


Abbildung 27 Analyse des Western Blot der KPC/KPCZ

Darstellung der relativen Intensität der einzelnen Banden im Odds Ratio. Mithilfe von ANOVA mit Bonferroni Korrektur konnten signifikante Unterschiede in der Lgr4-Expression gezeigt werden. KPC 661, 438, 550 n=4, KPCZ 426 n=3. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot $p < 0,01^{**}$, $p < 0,0001^{****}$

Es konnte gezeigt werden, dass im einzelnen Vergleich signifikante Unterschiede in der Lgr4-Expression vorhanden waren. Die Zelllinien KPC 550, 438 und 661 wiesen die höchsten Lgr4-Expressionen auf. Dieses Ergebnis ist mit denen der extrazellulären FACS-Analyse in adhärenter bzw. Sphäroidkulturen vergleichbar. Auch bei diesen Messungen erwiesen sich die KPC 661, 438 und 550 als Zelllinien mit der höchsten Expression.

Im Unterschied zur FACS-Analyse allerdings zeigte beim Western Blot die KPC 550 mit einer durchschnittlichen Bandenintensität von 0,96 mit etwas Abstand die höchste Expression, welche bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer eher eine etwas niedrigere Expression von extrazellulär 1,44% und intrazellulär 0,26% aufwies.

Um wie auch bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer mögliche Expressionsunterschiede zwischen normalen, adhärennten Zellen aus der Kultur und dreidimensionalen Sphäroiden feststellen zu können, wurden im nächsten Schritt die einzelnen Zellen mit deren Sphäroiden statistisch verglichen.

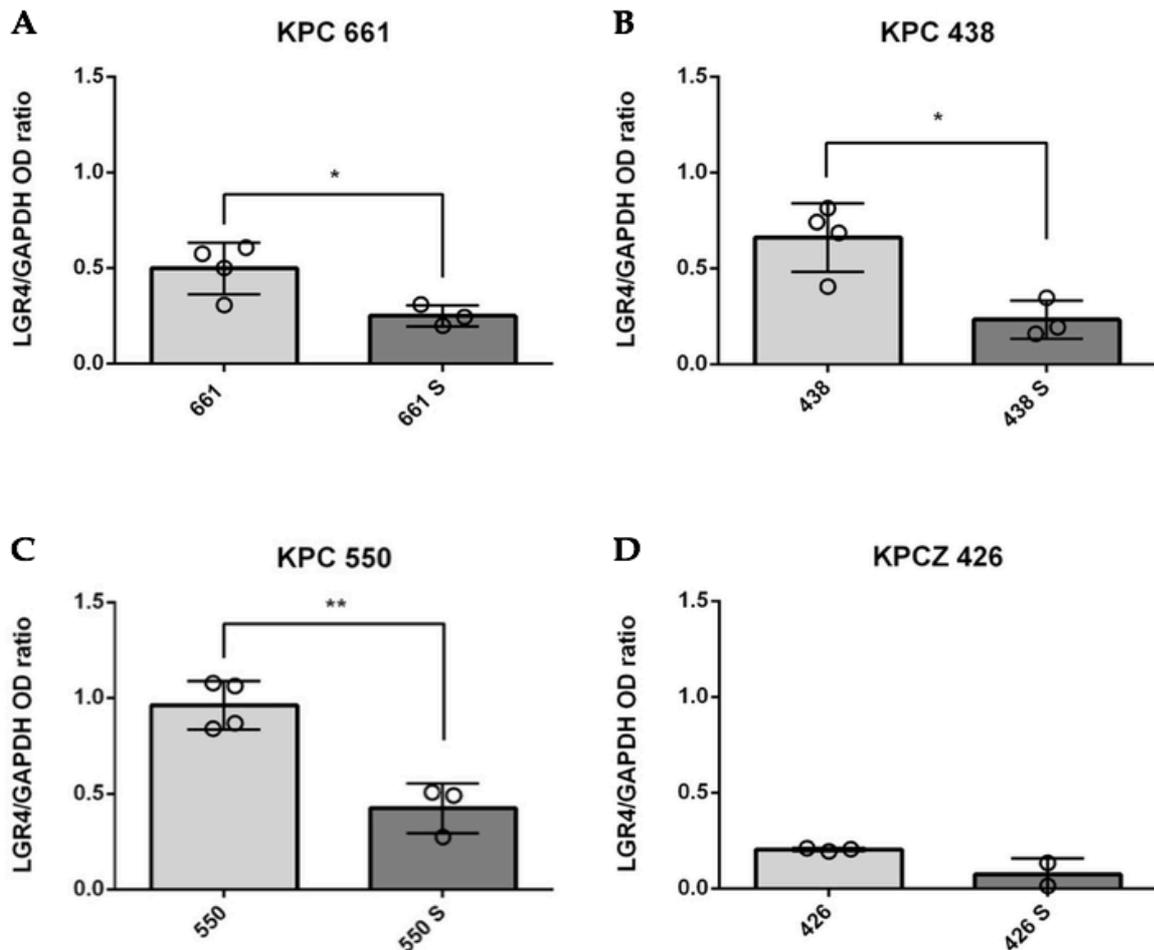


Abbildung 28 Vergleich der *Lgr4*-Expression in KPC/KPCZ und deren Sphäroide

Darstellung der Intensität der einzelnen Banden aus Abb.27 [A]. Mithilfe des ungepaarten t-test konnten bei den adhärennten KPCs eine signifikant höhere *Lgr4*-Expression als in ihren Sphäroiden nachgewiesen werden. **[A]** KPC 661 n=4, 661 Sphäroide n=3 **[B]** KPC438 n=4, 438 Sphäroide n=3 **[C]** KPC 550 n=4, 550 Sphäroide n=3 **[D]** KPCZ 426 n=3, 426 Sphäroide n=2. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$

Beim Vergleich der Western Blot Ergebnisse der einzelnen Zellen und deren Sphäroide wurde eine signifikant (mit Ausnahme der KPCZ 426) höhere *Lgr4*-Expression in den normalen Zellen nachgewiesen als in ihren Sphäroiden.

5.5 Charakterisierung der *Lgr4*-Expression in KPC/KPCZ mithilfe von PCR

Als nächstes wurde die *Lgr4* mRNA-Expression in den vier Zelllinien mithilfe von qRT-PCR analysiert.

5.5.1 Vergleich der *Lgr4* mRNA-Expression in KPC/KPCZ und Sphäroiden

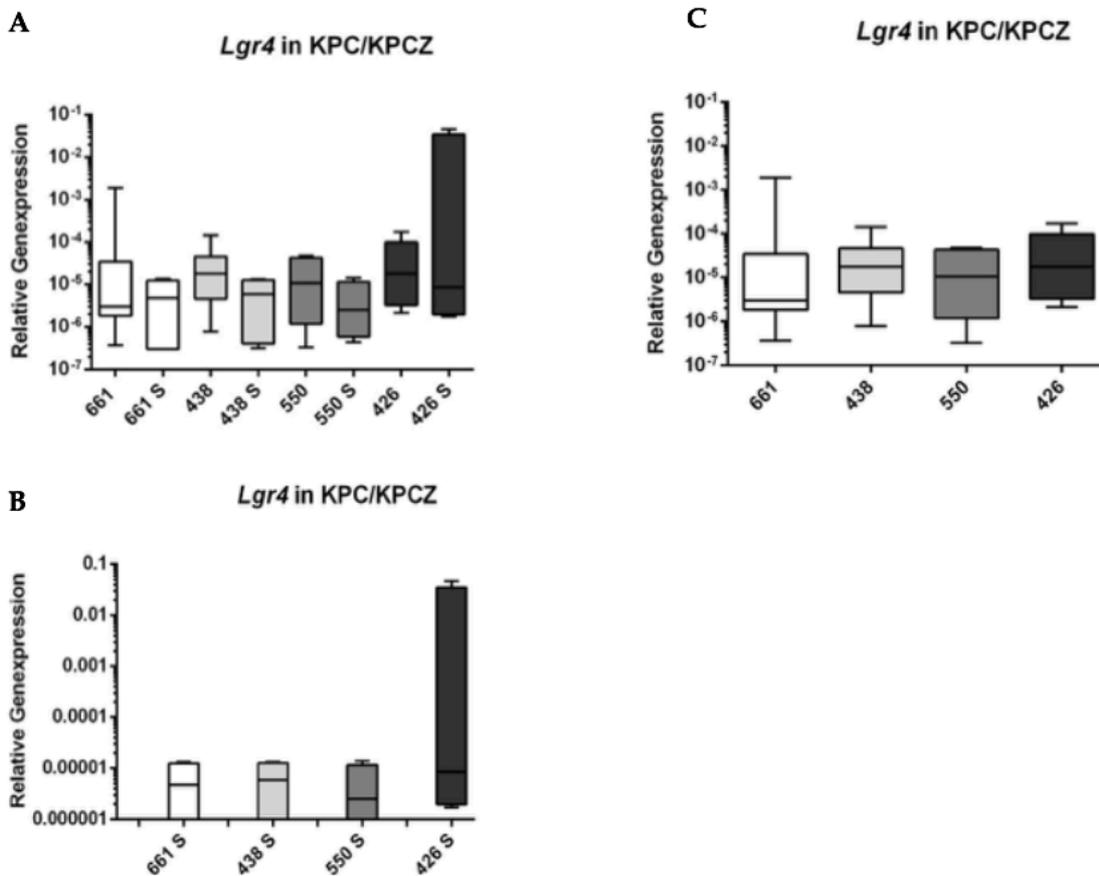


Abbildung 29 Vergleich der *Lgr4* mRNA-Expression in KPC/KPCZ und deren Sphäroide

Darstellung der Mittelwerte der relativen Genexpression (Ratio= $2^{-\Delta Ct}$) in den vier Zelllinien. **[A]** Vergleich aller KPC/KPCZ und deren Sphäroide **[B]** Vergleich der KPC/KPCZ-Zellen **[C]** Vergleich der Sphäroide. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der *Lgr4*-Expression zwischen den Zelllinien und deren Sphäroide detektiert werden. Darstellung der Min. bis Max. Werte in Box und Whiskers-Graphen.

Die Ergebnisse der PCR wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Expression auf. Wie auch beim Western Blot zeigte sich eine höhere Expression in den normalen, adhärennten Zellen unter Ausnahme der KPCZ 426.

Die mithilfe dieser Zelllinie gewonnenen Ergebnisse sind allerdings wenig repräsentativ, da sich die Versuche mit dieser Zelllinie äußerst schwer darstellten und häufig keine Ergebnisse lieferten. Alle drei Zelllinien KPC 661, 438 und 550 wiesen tendenziell ein ähnliches *Lgr4*-Expressionslevel auf.

5.6 Analyse der Lgr4-Expression auf den KPC/KPCZ Zelllinien mittels Immunfluoreszenz

Für weitere Vergleiche der Lgr4-Expression wurden Immunfluoreszenzfärbungen der vier Zelllinien durchgeführt.

Mithilfe der Immunfluoreszenz sollte die intra- und extrazelluläre Expression des Lgr4-Rezeptors lokalisiert und verglichen werden. In Abb. 30 sind repräsentative Aufnahmen der vier Zelllinien nach Färbung der Zellen mithilfe des Lgr4-AKs im FITC Kanal und einer DAPI-Färbung zur Detektion der DNA dargestellt.

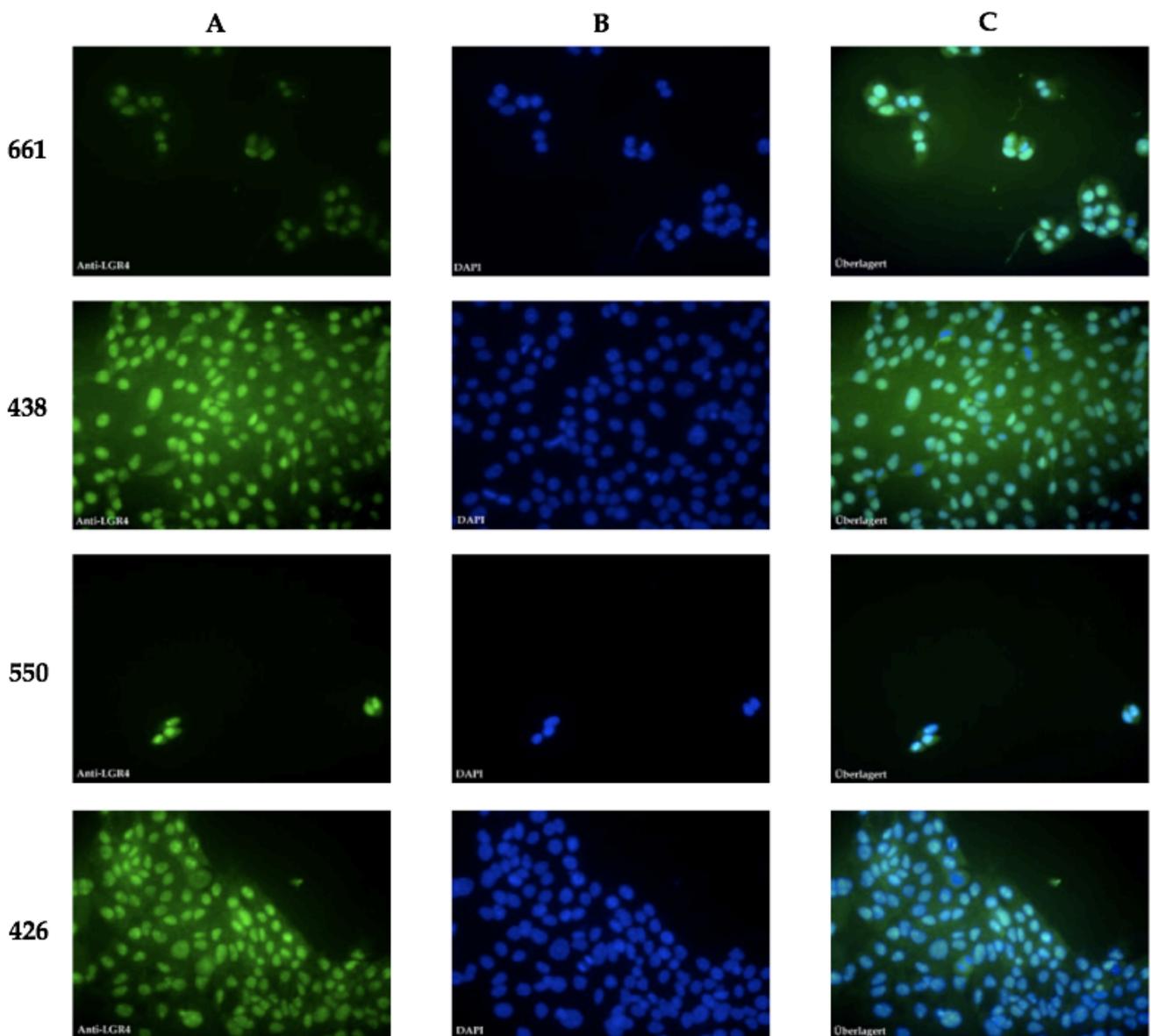


Abbildung 30 Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz Lgr4-gefärbter Zellen

[A] Färbung der Zellen mit Lgr4-AK (FITC-Kanal) **[B]** sowie Gegenfärbung der Zellkerne (DNA-Färbung) DAPI-Kanal **[C]** FITC und DAPI-Kanal überlagert.

Bei den Zelllinien KPC 661, KPC 438 und der KPCZ 426 befand sich der Lgr4-Rezeptor tendenziell stärker an der Zellmembran (extrazellulär) und weniger innerhalb des Nukleus. Bei der

mesenchymalen Zelllinie KPC 550 hingegen erstreckte sich der Lgr4-Rezeptor über die gesamte Zelle, intra- sowie extrazellulär. In Tab. 36 ist die Quantifizierung der Lgr4-Expression in den vier Zelllinien im Vergleich zu sehen.

Zelllinie	Extrazelluläres Lgr4	Nukleäres Lgr4
KPC 661	++	+
KPC 438	++	+
KPC 550	+++	+++
KPCZ 426	+	(+)

Tabelle 36 Lokalisierung und Quantifizierung der Lgr4-Expression

Um eine eventuelle Korrelation der CHD-1-Expression und Lgr4-Expression darzustellen, wurden alle Zelllinien zusätzlich mit dem epithelialen Marker CDH-1 simultan zu Lgr4 gefärbt.

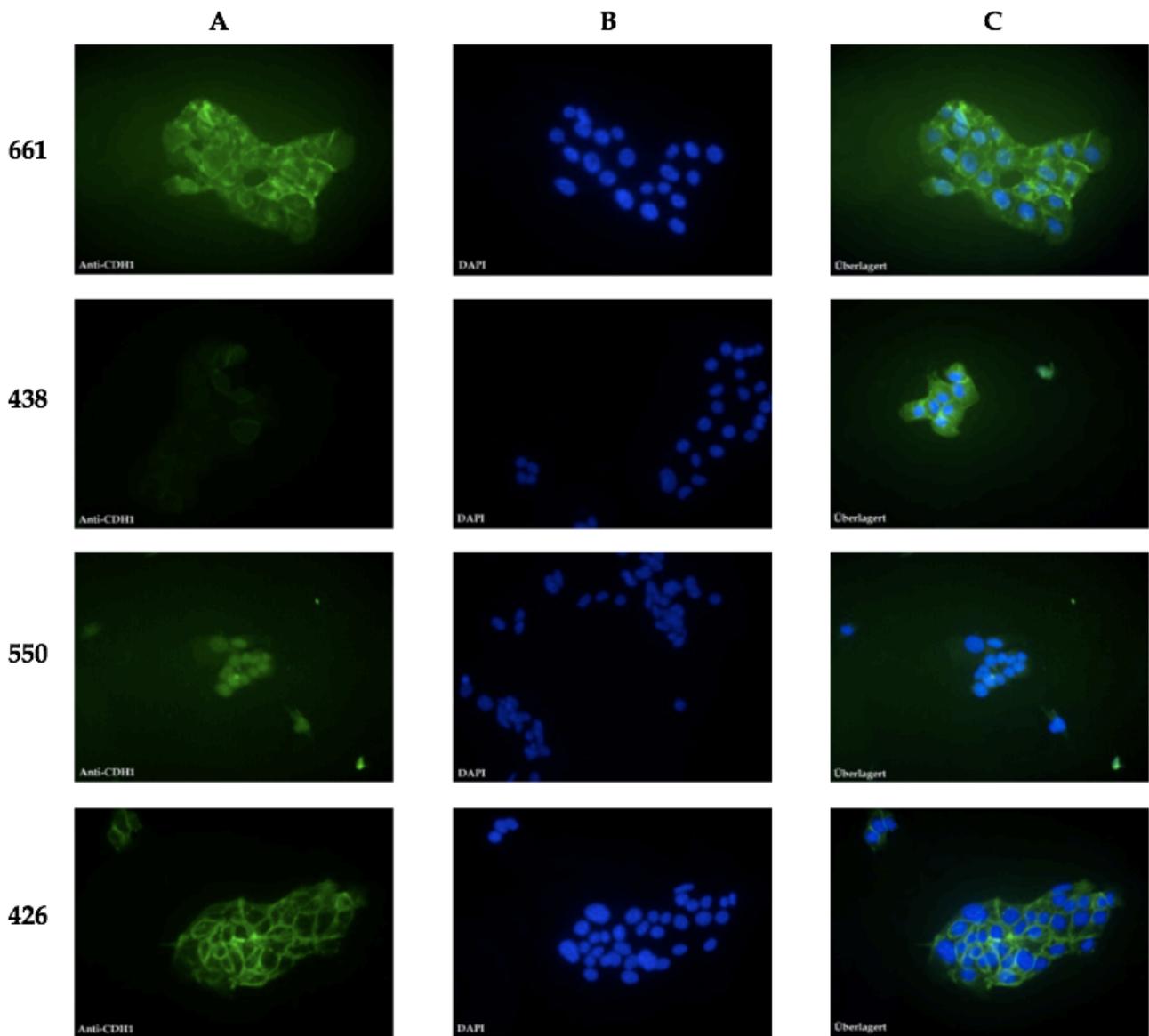


Abbildung 31 Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz CDH-1 gefärbte Zellen

[A] Färbung der Zellen mit CDH1- AK (FITC-Kanal) **[B]** sowie Gegenfärbung der Zellkerne (DNA-Färbung) DAPI-Kanal **[C]** FITC- und DAPI-Kanal überlagert.

Die Zelllinien KPC 661 und KPCZ 426 zeigten beide eine (deutliche) extrazelluläre Lokalisation von CDH-1 mit einer sehr geringen nukleären Expression von CDH-1. Gegensätzlich hierzu zeigte sich bei der mesenchymalen Zelllinie KPC 550 eine stärkere nukleäre Expression. Die KPC 438 Zelllinie war die einzige der Zelllinien, bei welcher sich das CDH-1 über die gesamte Zelle erstreckte. In Tab. 38 ist der Vergleich der Lokalisierung und Quantifizierung in den einzelnen Zelllinien zu sehen.

Zelllinie	Extrazelluläres CDH-1	Nukleäres CDH-1
KPC 661	++	+
KPC 438	+	+

KPC 550	+	++
KPCZ 426	+++	(+)

Tabelle 37 Lokalisierung und Quantifizierung der CDH-1 Expression

Auch die Quantifizierung der Immunfluoreszenz der KPC 661 Zelllinie zeigte eine tendenziell stärkere extrazelluläre Lgr4-Expression.

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem epithelialen Marker CDH-1 und dem Lgr4-Rezeptor zu detektieren, wurden die vier Zelllinien simultan mit dem AK CDH-1 gefärbt.

Da mesenchymale Zellen ein aggressiveres, metastatisches Wachstum aufweisen und somit eine schnellere Tumorprogression besitzen, liegt eine inverse Korrelation zwischen CDH-1 und Lgr4 nahe. Somit würde auch die Hypothese einer erhöhten Lgr4-Expression und daraus resultierend einer erhöhten Malignität im Tumorwachstum der Wahrheit entsprechen.

Bei Überprüfung der Korrelation gefärbter Zellen ist bei extrazellulärer Korrelation eine inverse Korrelation zwischen Lgr4- und CDH-1 zu beobachten. Bei einer moderaten Expression was beispielsweise bei der epithelialen Zelllinie 661 der Fall ist, ist keine inverse Korrelation zu beobachten. Hingegen aber liegt bei der Zelllinie KPC 550 und KPCZ 426 eine inverse Korrelation vor, dies bedeutet bei hoher extrazellulärer Lgr4-Expression ist eine niedrige CDH-1 Expression zu sehen.

extrazellulär	Lgr4		CDH-1
KPC 661	++		++
KPC 438	++		+
KPC 550	+++	↔	+
KPCZ 426	+	↔	+++

Bei nukleärer Lokalisation hingegen ist eine normale Korrelation zu beobachten.

nukleär	Lgr4		CDH-1
KPC 661	+	↔	+
KPC 438	+	↔	+
KPC 550	+++		++
KPCZ 426	(+)		(+)

Aus allen Methoden zur Messung der intra- und extrazellulären Lgr4-Expression stellte sich heraus, dass die KPC 661 Zelllinie im Vergleich der drei anderen Zelllinien die beste Zelllinie für weitere Versuche ist.

Von Bedeutung war vor allem die stabile Zellverdopplungsrate ohne Bildung von Zellaggregaten, eine hohe extrazelluläre Lgr4-Expression in Durchflusszytometer, Western Blot und Immunfluoreszenz. Für die darauffolgenden Versuche, das FACS-Sorting und anschließender subkutaner/orthotoper Injektionen der Zellen, war vor allem die extrazelluläre Lgr4-Expression wichtig, daher wurde für die nächsten Experimente nur noch mit der KPC 661 Zelllinie gearbeitet.

5.7 Vitalitätskontrolle der KPC 661 unter OP-Bedingungen

Vor den ersten *in vivo* Versuchen wurde ein Lebend-Tot Versuch unter simulierten OP-Bedingungen durchgeführt. Dies war vor allem für die Beurteilung der Vitalität der injizierten Zellen zum Zeitpunkt der OP von Bedeutung. Somit konnten mögliche Fehlerquellen (fehlendes Tumorstadium aufgrund toter injizierter Zellen) ausgeschlossen werden. Die Prüfung der Überlebensdauer wurde mithilfe des Vitalitätsfarbstoffes 7AAD, sowie der simultanen Trypanblaufärbung und anschließender Zählung unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Am Anfang waren durchschnittlich 89% der Zellen am Leben, während nach 6 Stunden noch durchschnittlich 72,9% der Zellen vital waren. Somit ergab die Messung, dass innerhalb der ersten 6 Stunden mit stündlicher Vitalkontrolle kein relevanter Anstieg an toten Zellen vorhanden war.

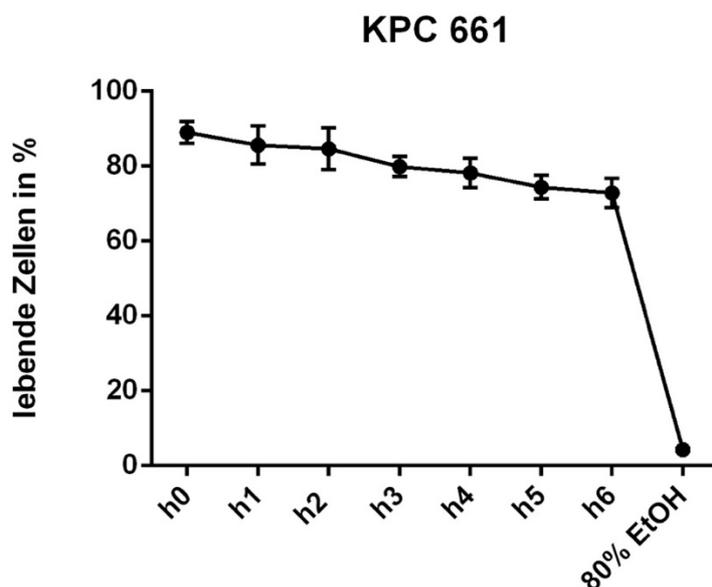


Abbildung 32 Lebend-Tot Versuch

Darstellung lebender Zellen in % von Stunde 0 bis zu 6 Stunden unter simulierten OP-Bedingungen, Lagerung der Zellen in PBS auf Eis bei Raumtemperatur. Stündliche Messung lebender Zellen mittels 7AAD Färbung im Durchflusszytometer, sowie Zählung toter Zellen mittels Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer. Durch Zugabe von 80%igem Ethanol wurden die Zellen nach 7 Stunden getötet. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Symbol-one symbol per column-Graph.

Von der Isolierung aus der Zellkultur bis zur Injektion der ersten Maus vergingen bei subkutaner Injektion ca. 15 min und bei orthotoper Injektion ca. 25 min (ohne vorheriges FACS-Sorting). Durch

diesen Versuch konnte davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Injektionen die Zellen zum größten Teil noch am Leben waren, da nach 6h immer noch nahezu 80% der Zellen am Leben waren. Der Sortierprozess dauerte abhängig von der eingesetzten Zellzahl ca. 30 min.

5.8 Zellsorting

Für das Sorting wurden die Zellen aus der Kultur isoliert, extrazellulär gefärbt und auf Eis in das Labor für das Sorting gebracht.

5.8.1 Gating-Strategie beim Sorting

Vor Beginn des Sorting wurden wenige Zellen für die korrekte Gating-Strategie analysiert, um für später möglichst „reine“ Populationen von Lgr4^{+/−} sortierten Zellen zu erhalten.

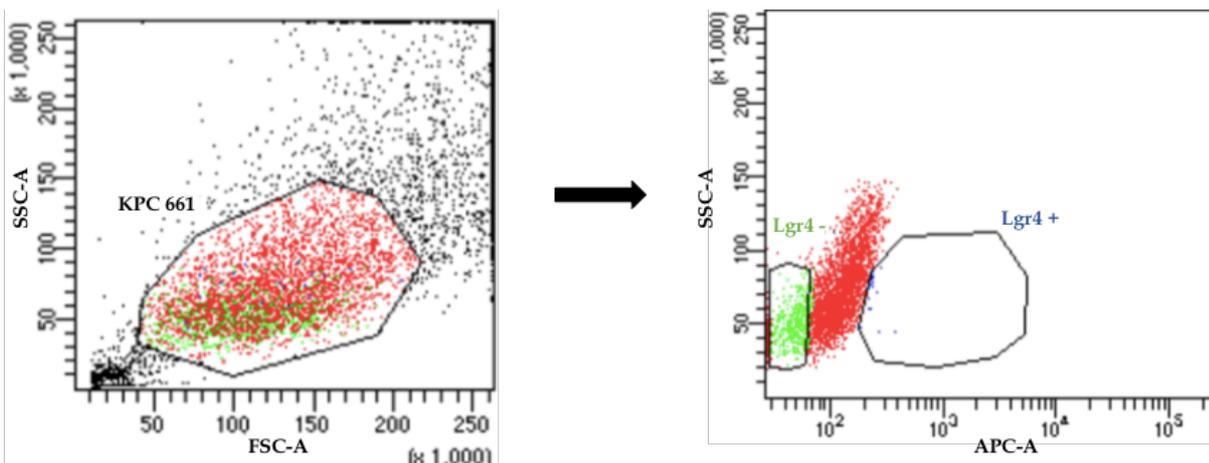


Abbildung 33 Gating-Strategie beim Zellsorting

Darstellung der ungefärbten Zellen: mithilfe eines Scatter-Gate Dot-Plot (links) wurde die KPC 661-Population definiert. Gaten der Lgr4-positivsten und Lgr4-negativsten KPC 661-Zellen (rechts).

Zuerst wurde die KPC 661 Population mithilfe der ungefärbten Zellen festgelegt (Abb.33), um im nächsten Schritt die Gates für die Lgr4^{+/−} Zellen definieren zu können. Im Anschluss des korrekten Gatings wurden die gefärbten Zellen nach einer hohen und niedrigen Lgr4-Expression sortiert. Es sind jeweils eine deutliche Lgr4[−], sowie eine deutliche Lgr4⁺ Population beim Gating der gefärbten Zellen sichtbar (Abb.34). Auch die Darstellung der positiven Zellen im Histogramm war deutlich zu erkennen.

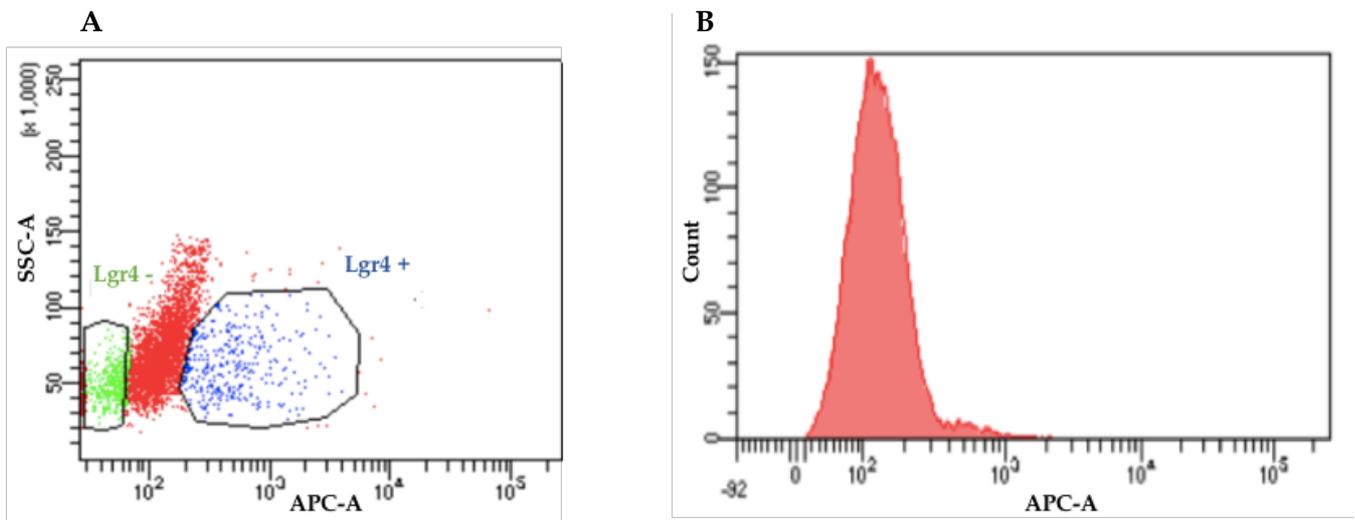


Abbildung 34 Repräsentatives Bild der Lgr4⁺- und Lgr4⁻-Zellen beim Sorting

[A] Dot-Plot der sortierten Populationen Lgr4⁺ und Lgr4⁻ [B] Lgr4-Expression im Histogramm

Wie in Abb.34 zu erkennen ist, war nach dem ersten Zellsorting der KPC 661 deutlich sortierte Populationen im Dot-Plot und Histogramm sichtbar. Mithilfe dieser Daten aus dem Durchflusszytometer wurde zur Verdeutlichung des erfolgreichen Sortierprozesses eine Überlagerung der Histogramme der Fluoreszenzmessung gefärbter und ungefärbter KPC 661 Zellen durchgeführt (Abb.35).

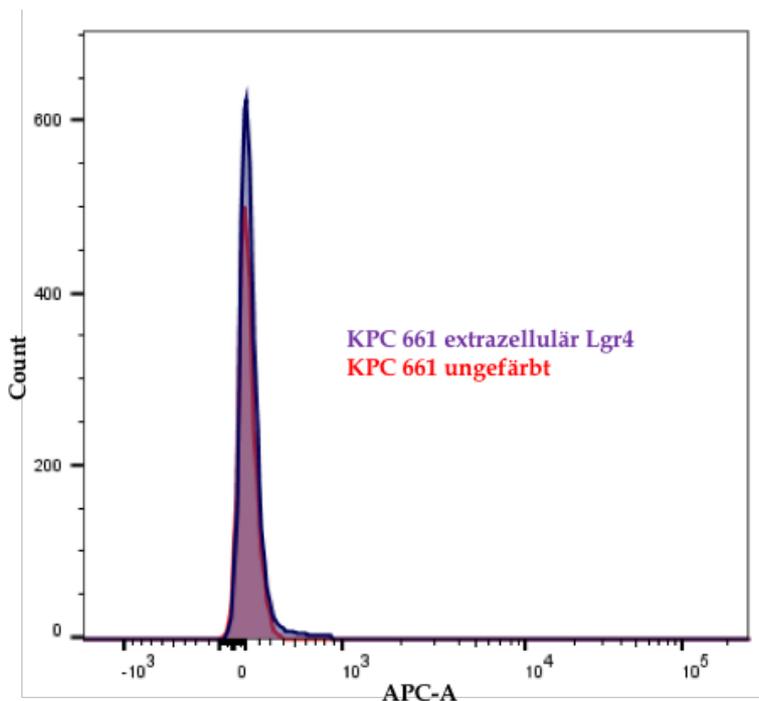


Abbildung 35 Overlay der Histogramme KPC 661 beim Sorting

Überlagerung der Histogramme ungefärbter und extrazellulär gefärbter KPC 661 sortierter Zellen

In Abb.35 ist das deutlich positive Fluoreszenzsignal der extrazellulär gefärbten Zellen sichtbar. Im Anschluss an das Sorting wurden die Zellen auf Eis zurück ins Labor gebracht und für die weiteren Versuche vorbereitet.

5.8.2 Spheroid-Formation-Assay SFA

Mit den Lgr4^{+/-} sortierten Zellen wurde ein SFA angelegt. Nach 7-10 Tagen in Kultur wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der dreidimensionalen Kulturen für den Vergleich der Morphologie sowie eine Quantifizierung angefertigt.

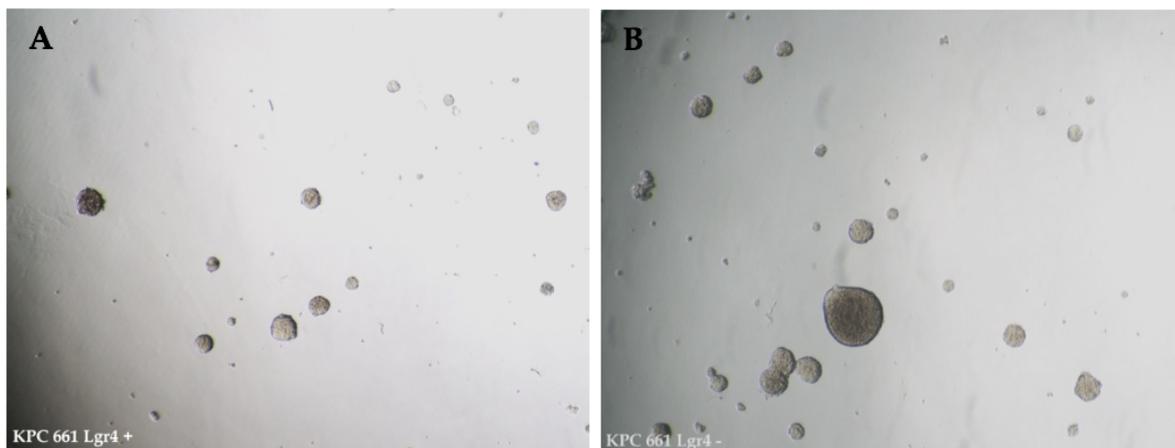


Abbildung 36 Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen multizellulärer Tumoraggregate sortierter KPC 661-Zellen

Darstellung der Wachstums- und Größenunterschiede der Sphäroide der KPC 661-Zellen [A] Lgr4⁺ -bzw. [B] Lgr4⁻ -sortierte Zellen

Die Sphäroide wurden morphologisch unter dem Mikroskop verglichen und Sphäroide, ab einer Anzahl von 50 agglutinierten Zellen, als Sphäroide quantifiziert. Anschließend wurde die Anzahl der Lgr4^{+/-} sortierten Sphäroide verglichen (Abb.37).

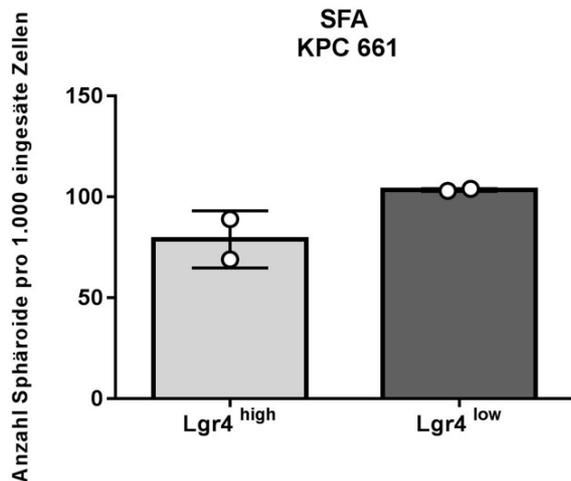


Abbildung 37 Vergleich der Anzahl der Sphäroide pro 1000 eingesäte Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte der Anzahl der Sphäroide mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot.

Die Lgr4⁻ sortierten Zellen bildeten mehr und tendenziell etwas größere Sphäroide als die Lgr4⁺ sortierten Zellen. Die Fähigkeit Sphäroide auszubilden ist ein besonderer Unterschied zwischen malignen und nicht malignen Zellen und hat vor allem im Bereich der Tumorforschung eine große Bedeutung. Allerdings konnten zwischen den zwei sortierten KPC 661 Zellen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Sphäroide nachgewiesen werden.

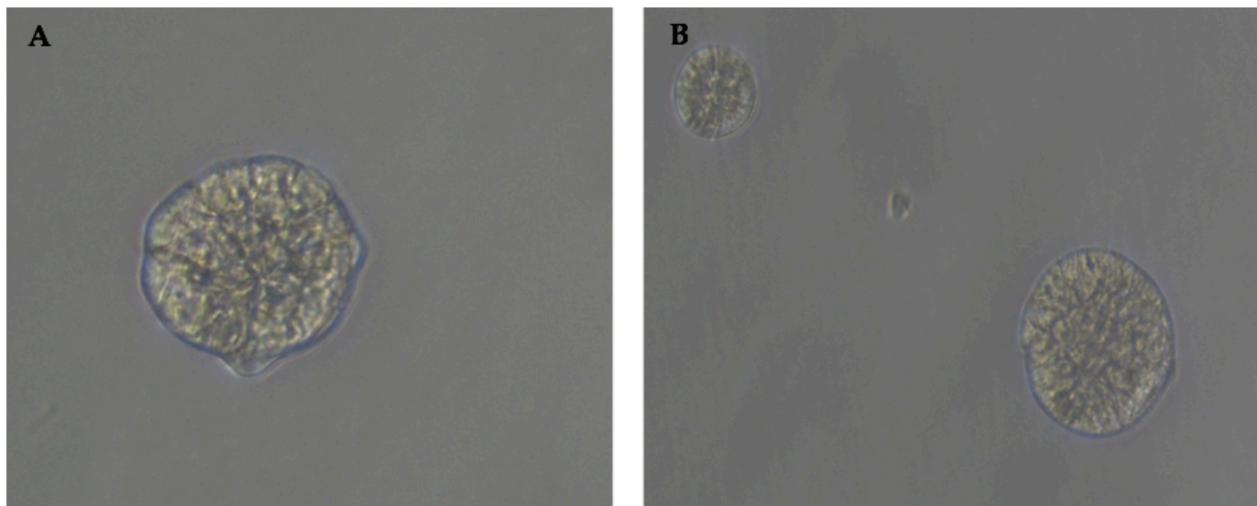


Abbildung 38 Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Lgr4⁺ und Lgr4⁻ -sortierten Zellen im SFA zur Unterscheidung der Morphologie

Darstellung der Morphologie der Sphäroide im lichtmikroskopischen Bild **[A]** Lgr4⁺ **[B]** Lgr4⁻

In der Morphologie zwischen den Lgr4⁺ und Lgr4⁻-sortierten KPC 661 Sphäroiden konnten keine Unterschiede in ihrer Morphologie festgestellt werden. Bis auf geringe Größenunterschiede waren sie nicht voneinander zu unterscheiden.

Zusätzlich zur dreidimensionalen Kultur wurden s.c. Injektionen an Mäusen mit den sortierten Zellen durchgeführt.

5.8.3 Vergleich des Tumorwachstums zwischen Lgr4⁺ und Lgr4⁻ sortierten Zellen

Zur Beurteilung des Tumorneubildungspotentials und des invasiven Wachstums wurde in engen Zeiträumen Tumorgöße und das Allgemeinbefinden der Mäuse kontrolliert.

Die Mäuse wurden nach 60 Tagen getötet und die Tumoren entnommen.

5.8.3.1 Darstellung des Tumorwachstums und der Tumorentnahme

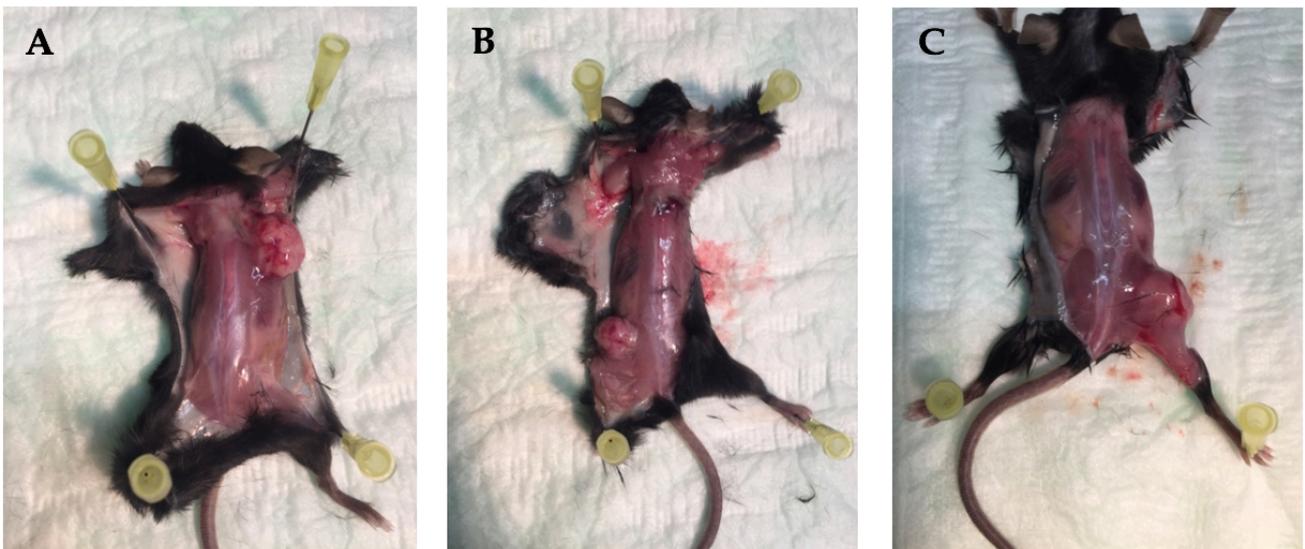


Abbildung 39 Aufnahmen subkutaner Tumore

Darstellung des Tumorwachstums nach Injektion sortierter Zellen **[A]** Lgr4⁻ hochthorakaler Tumor **[B]** Lgr4⁺ lumbaler Tumor **[C]** Lgr4⁻ lumbaler Tumor

Wie in Abb.39 zu sehen ist, wiesen alle Tumoren ein invasives Wachstum in das umliegende Gewebe auf.



Abbildung 40 Repräsentative Aufnahme thorakaler Tumorentnahme

Entnahme eines Lgr4⁺ hochthorakalen Tumors. Invasives Wachstum des Tumors in die Thoraxmuskulatur.

Nach der Tumorentnahme wurden Teile der Tumoren für histologische Schnitte in Paraffin für eine spätere HE-Färbung eingebettet. Andere Teile der Tumore wurden mit Trypsin-EDTA verdaut und in der Zellkultur rekultiviert, um die Expression des Rezeptors per Durchflusszytometer zu detektieren.

Das Tumorstadium hat unabhängig von Lgr4⁺ bzw. Lgr4⁻ sortierten Zellen nach 4 Wochen begonnen (Abb.41). Allerdings hingegen war das Tumorstadium in den Lgr4⁻ sortierten Zellen tendenziell etwas schneller.

Es wurden insgesamt 10 Mäuse injiziert, pro Dilution der Tumorsuspension wurden 3 Mäuse verwendet. Die Dilutionen waren 5000, 1000 und 500 Zellen.

Bei 500 s.c. injizierten Zellen war kein Tumorstadium zu sehen. Der Versuch wurde daher nach 60 Tagen abgebrochen.

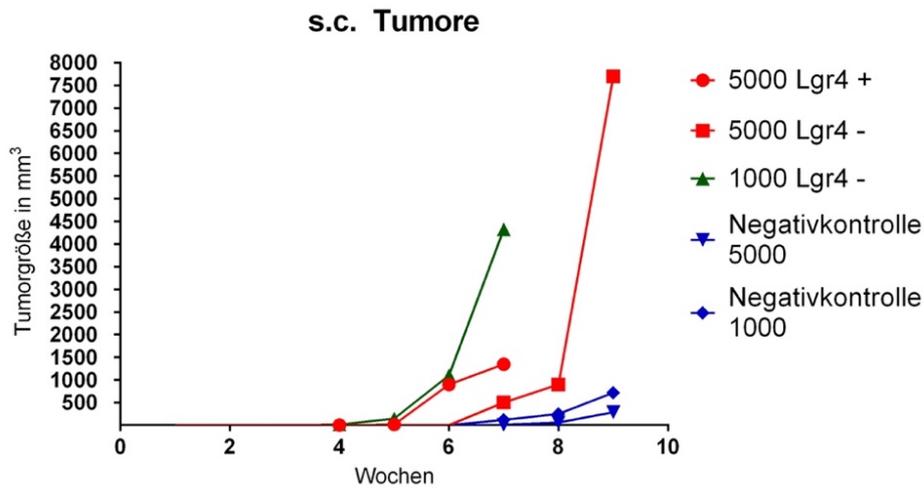


Abbildung 41 Wachstumskurve der subkutanen Tumore

Darstellung der Tumorgöße in mm³ innerhalb von bis zu 8,5 Wochen, dargestellt in einer Wachstumskurve.

Die für die Histologie entnommenen Proben wurden mittels HE gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert.

5.8.3.2 Histologische Schnitte und HE-Färbung der Tumore

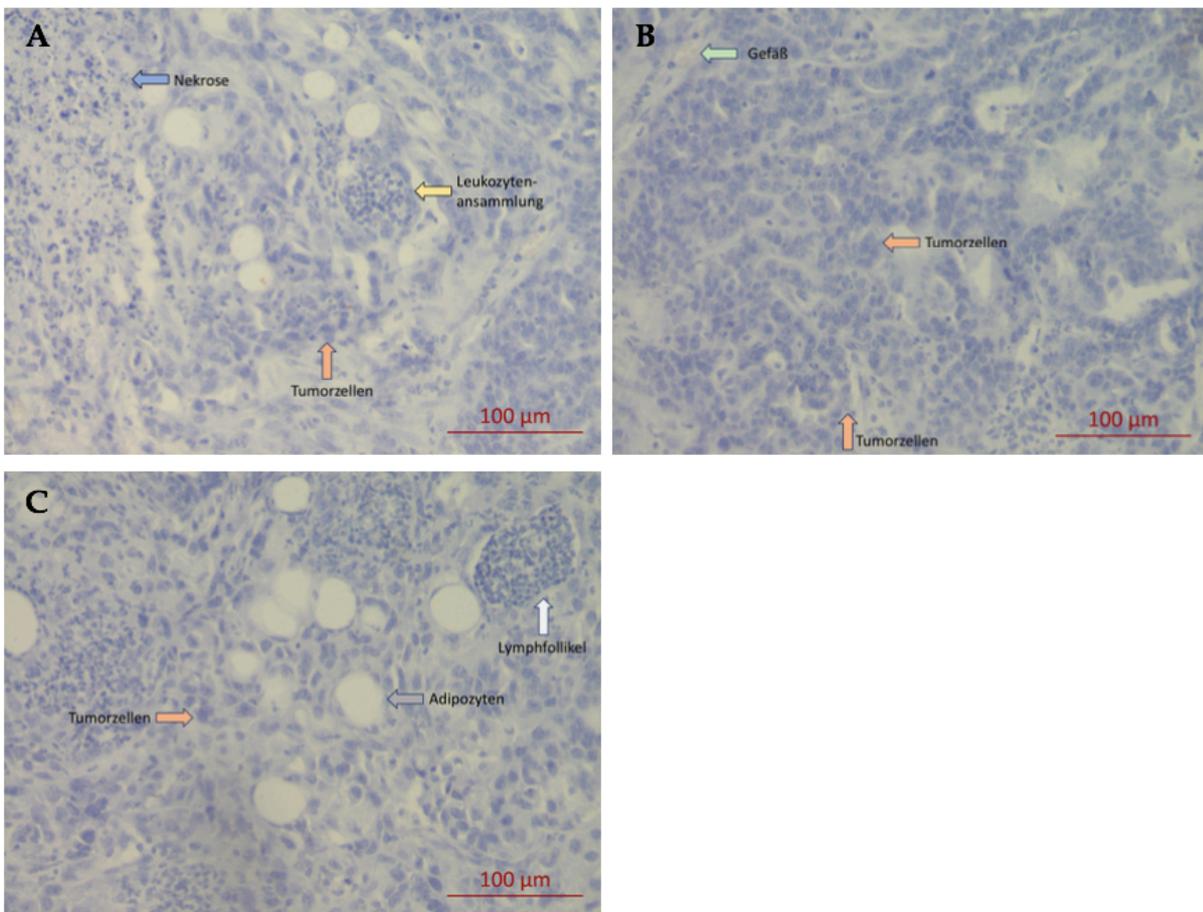


Abbildung 42 HE-Färbungen der subkutanen Tumore

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der HE-Färbungen. **[A]** blauer Pfeil: Nekrosen, gelber Pfeil: Leukozytenansammlung, oranger Pfeil: Tumorzellen **[B]** grüner Pfeil: Gefäße, oranger Pfeil: Tumorzellen **[C]** grauer Pfeil: Adipozyten, weißer Pfeil: Lymphfollikel und oranger Pfeil: Tumorzellen

Alle Schnitte wiesen eine starke Blaufärbung aufgrund der Basophilie der Tumorzellen auf. Des Weiteren wiesen die Schnitte eine tumortypische Nekrose im Tumorzentrum sowie eine Leukozytenansammlung auf. Restliche Befunde der histologischen Schnitte waren typisch für das ursprüngliche Muskelgewebe wie Adipozyten, wenig Blutgefäße aufgrund des schnellen Wachstums des Tumors und Lymphfollikel, welche für die Vermehrung und Differenzierung der B-Lymphozyten sind.

5.8.4 Orthotope Injektion unsortierter Zellen

Um herauszufinden wie viele Zellen für ein orthotopes Tumorwachstum nötig sind, wurde eine orthotope Xenotransplantation mit je zwei Mäusen pro Dilution unsortierter KPC 661- Zellen durchgeführt. Dabei wurden drei verschiedene Dilutionen (50.000, 25.000 und 10.000 Zellen) im Duplikat erprobt.

Bereits nach zwei Wochen waren die Tumoren höherer Konzentrationen abdominal palpierbar. Zwei Mäuse wurden während des Versuchs tot aufgefunden. Diese wiesen einen Tag zuvor ein unauffälliges Allgemeinbefinden auf, zeigten aber bei der postmortalen Untersuchung ein progressives Tumorwachstum mit starken Metastasierungen in Leber, Peritoneum und Omentum. Die übrigen Mäuse mussten nicht aufgrund der Tumorgöße, sondern aufgrund des gestörten Allgemeinbefindens erlöst werden. Dies steht im Gegensatz zu den s.c. implantierten Zellen, bei welchen die Mäuse aufgrund der Tumorgöße und der Dauer erlöst werden mussten.

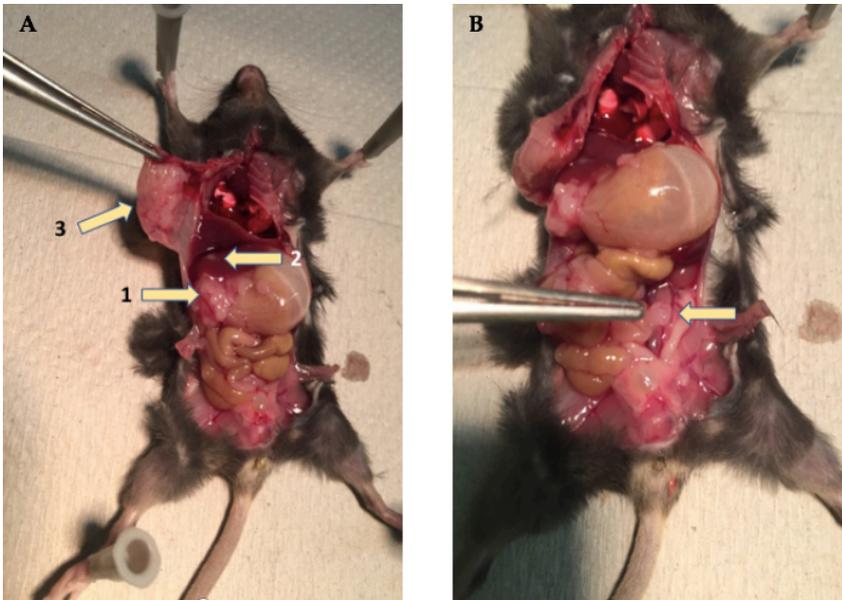
In Tab.39 ist ein Überblick über die Tumorgöße der orthotop isolierten Tumore sowie ihrer Metastasierungslokalisation in das umliegende (ferne) Gewebe aufgelistet.

Dilution	Zeitpunkt	Primärtumor (PT)	Fernmetastase
50.000 Zellen	21. Tag post injectionem	PT: 1,2x0,9x0,9cm	Ikterische Verfärbungen
50.000 Zellen	21. Tag post injectionem	PT: 0,3x0,8x0,2cm	<u>Leber</u> 0,3x0,2x0,4 <u>Peritoneum</u> 0,8x0,5x0,2
25.000 Zellen	26. Tag post injectionem	PT: 1,9x2,8x2,4cm	<u>Omentum</u> 0,3x0,1x0,2 <u>Peritoneum</u> 0,2x0,1x0,1

25.000 Zellen	27. Tag post injectionem	PT: 0,8x1,0x0,4cm	-
10.000 Zellen	26. Tag post injectionem	PT: 2,5x3,0x1,9	<u>Leber</u> 0,2x0,1x0,1 <u>Milz</u> 0,3x0,2x0,1 <u>Darm-Lnn</u> 0,2x0,1x0,2 Extrem dilatierter Magen→Ileus
10.000 Zellen	27. Tag post injectionem	PT: 2,0x1,8x2,2	<u>Diaphragma</u> 0,2x0,1x0,1cm <u>Leber</u> 0,3x0,2x0,2 <u>Darm</u> 0,2x0,2x0,1 Extrem dilatierter Magen

Tabelle 38 Übersicht Tumorwachstum und Metastasierung orthotoper Tumore

Unabhängig von der Dilution ist bei allen Verdünnungen das Tumorwachstum sehr schnell fortgeschritten und auch das Metastasierungspotential war extrem aggressiv und weitreichend, beispielsweise wiesen drei der Mäuse Metastasierungsherde in der Leber auf. (siehe Abb.43)



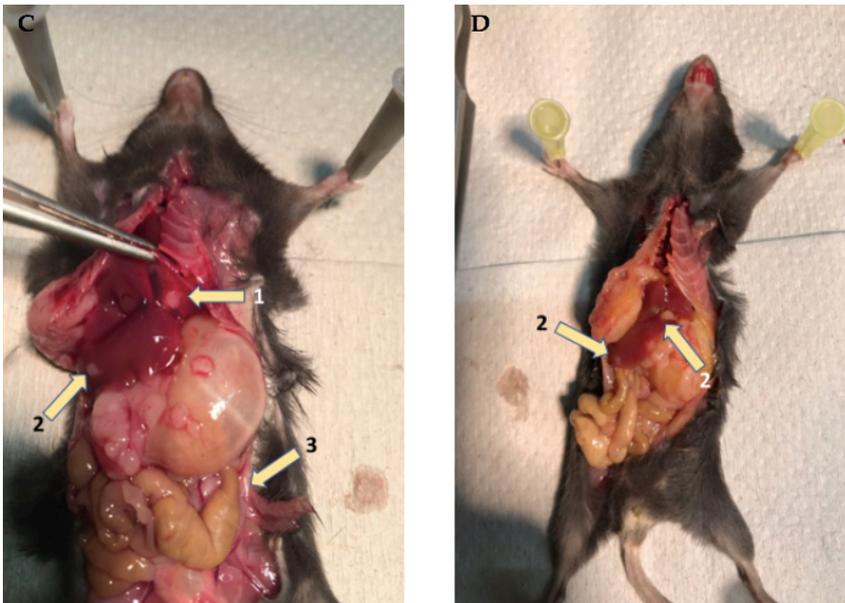


Abbildung 43 Aufnahme orthotoper Tumore

Darstellung der Tumorbildung, (Fern-) metastasierung und ikterischen Verfärbungen **[A]** 1 Primärtumor, 2 Lebermetastase und 3 Metastase an Peritoneum **[B]** Darmmetastasen **[C]** Fernmetastasen an 1 Diaphragma und 2 Leber sowie ein 3 dilatierter Magen-Darm-Trakt **[D]** ikterische Verfärbungen von Schleimhäuten, Serosa des Darms und 2 kleinen Metastaseherden auf der Leber.

Als Folge des invasiven Wachstums sowie durch den raumfordernden Primärtumor kam es bei einer Maus zur Magenausgangsstenose mit konsekutiv dilatiertem Magen-Darm-Trakt. Wie bereits oben erwähnt, wurden Teile der Tumore nach der Entnahme verdaut und kultiviert um die Lgr4-Expression innerhalb eines isolierten, rekultivierten Tumors beurteilen zu können. Hierfür wurde ein s.c. Tumor aus Lgr4-sortierten Zellen, eine Positivkontrolle der s.c. Tumore und ein orthotoper Tumor verdaut und in die Zellkultur aufgenommen. Nachdem die Zellen eine beständige Zellverdopplungsrate aufwiesen, wurden sie wie gewohnt aus der Kultur isoliert und extrazellulär für die anschließende Analyse mit dem Durchflusszytometer gefärbt. In Abb.44 ist der Vergleich der Analyse mit dem Durchflusszytometer zur Messung der intra- und extrazellulären Lgr4-Expression dargestellt.

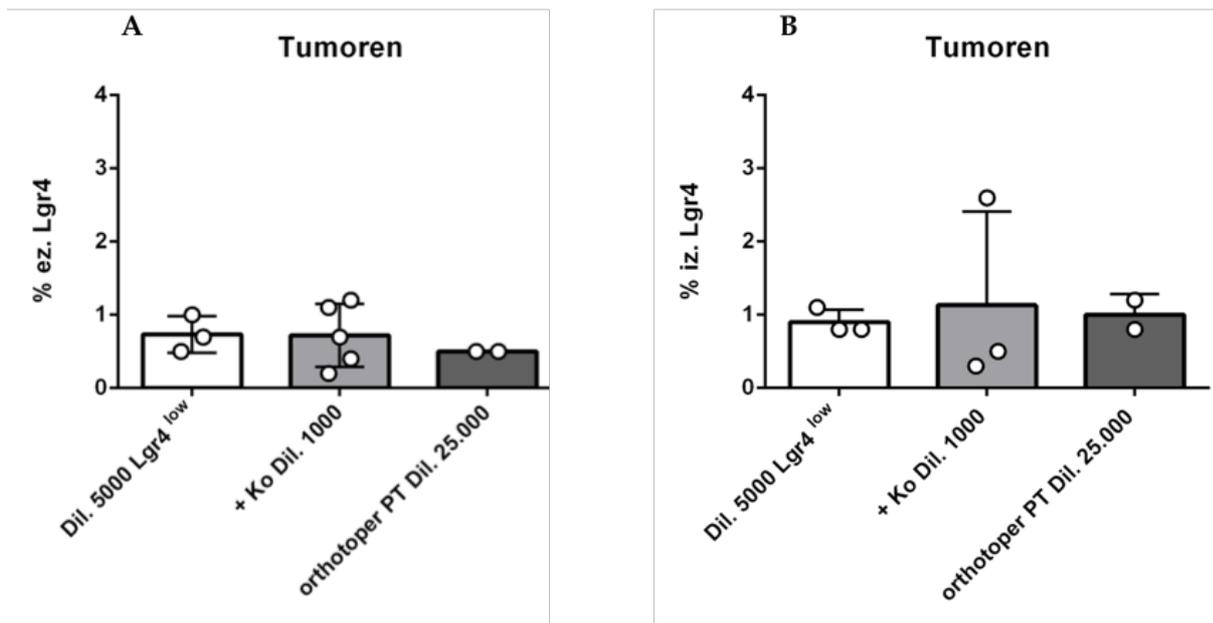


Abbildung 44 Lgr4-Expression in kultivierten Tumoren

Messung der **[A]** extrazellulären Lgr4-Expression **[B]** intrazellulären Lgr4-Expression. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot

Zwischen den beiden s.c. Tumoren der sortierten Zellen waren keine Unterschiede in der Lgr4-Expression zu detektieren. Auch der orthotope Tumor der unsortierten Zellen zeigte nahezu dasselbe Lgr4-Expressionslevel.

5.9 EMT-Stimulation der Zellen

Das Zytokin TGF- β 1 spielt vor allem während der Embryogenese in Bezug auf Zell-Zell Interaktionen eine Rolle. Aber auch im adulten Organismus reguliert das multifunktionelle Zytokin den Organismus. TGF- β 1 moduliert unter anderem die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum sowie die Proliferation entsprechender Zielzellen [139]. Eine Behandlung der Krebszellen mit TGF- β 1 führt zu einer Epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), welche unter anderem in Metastasierungsprozessen des PDAC von großer Bedeutung ist [140].

Bei der EMT wandeln sich epitheliale Zellen in mesenchymale, fibroblasten-ähnliche Phänotypen, wodurch es zur Änderung der Expression verschiedener Adhäsionsproteine und Glykoproteine kommt. Als Folge der EMT kommt es zu verminderter interzellulärer Zelladhäsion (Verminderung der Zell-Zell Kontakte und Adhäsionen der Zellen) durch geringere E-Cadherin Expression bei gleichzeitig vermehrter Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin (Protein des Zytoskeletts), N-Cadherin und Fibronektin. Durch diesen Prozess kommt es zu einer schnelleren und aggressiveren Tumorzellinvasion bzw. -migration in das umliegende bzw. fernegelegene Gewebe [140-144].

5.9.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen stimulierter KPC Zellen

Drei Tage nach dem Passagieren bei täglicher Stimulation mit TGF β -1 wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der epithelialen KPC 661 Zelllinie und der gemischten KPC 438 Zelllinie im Vergleich zu unbehandelten Zellen angefertigt.

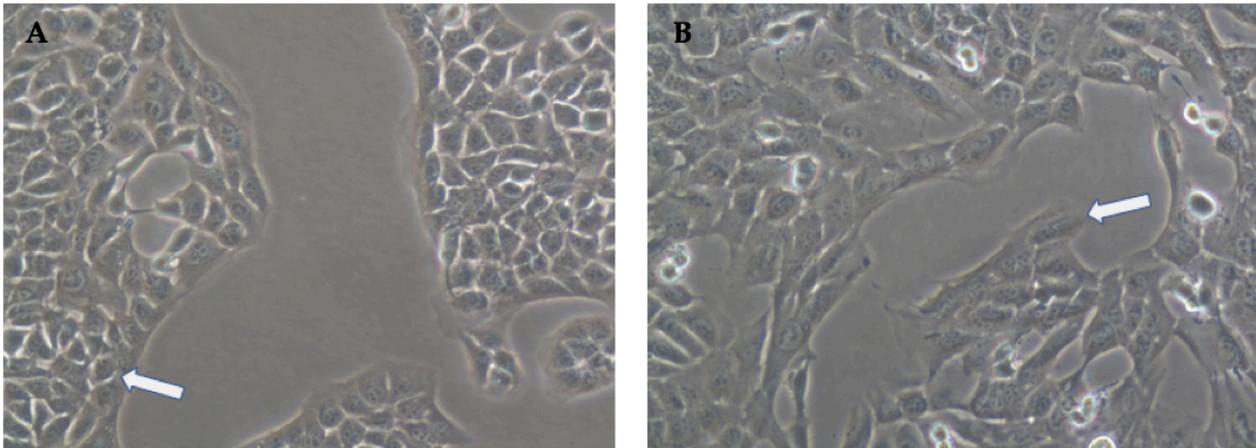


Abbildung 45 Lichtmikroskopische Aufnahme stimulierter KPC 661

Aufnahme bei 20x Vergrößerung zwei Tage nach Zugabe von Zytokin TGF β -1 **[A]** Ko–keine Stimulation: Pfeil rundliche, adhären gewachsene Zellen **[B]** TGF- β 1 Stimulation tgl. (5ng/ml): Pfeil längliche, adhären gewachsene Zellen. **[A]** und **[B]** wiesen dieselbe Konfluenz auf.

Bei der epithelialen KPC 661 Zelllinie war die erfolgreiche EMT durch die Umwandlung zu einer fibroblastenähnlichen Morphologie der Zellen zu erkennen (Abb.45 **[B]**, weißer Pfeil). Im Gegensatz zur Kontrolle Abb.45 **[A]** (Zellen mit eher rundlichem Charakter) zeichnen sie sich in Abb.45 **[B]** durch einen eher länglichen fibroblastenähnlichen Charakter aus. Die Zellverdopplungsrate war bei der Kontrollgruppe und den stimulierten Zellen gleich.

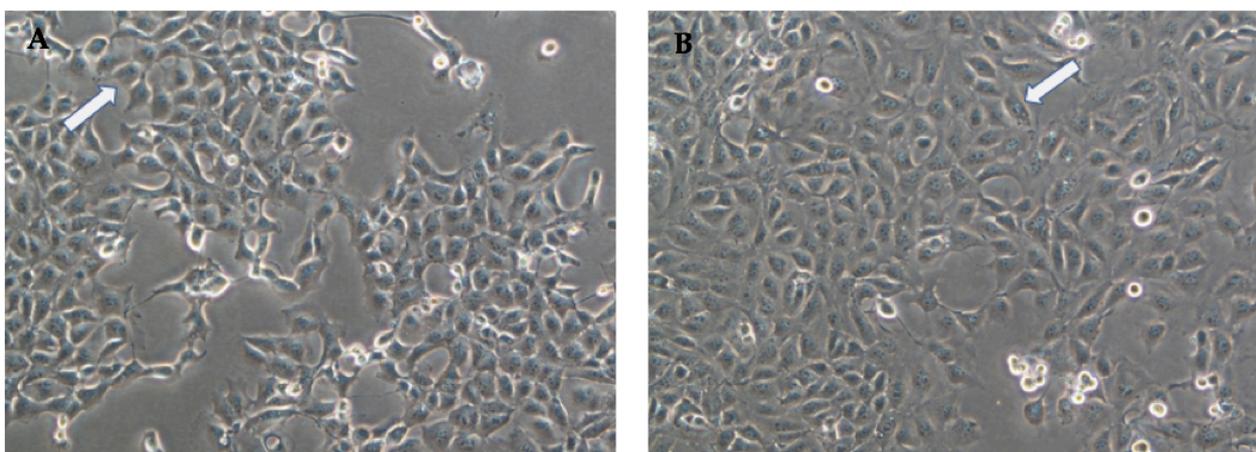


Abbildung 46 Lichtmikroskopische Aufnahme stimulierter KPC 438

Aufnahme bei 20x Vergrößerung zwei Tage nach Zugabe von Zytokin TGF β -1 **[A]** Ko–keine Stimulation **[B]** TGF- β 1 Stimulation tgl. (5ng/ml). Beide wiesen rundlich, adhären gewachsene Zellen auf. **[A]** und **[B]** wiesen dieselbe Konfluenz auf.

Bei der gemischten KPC 438 Zelllinie hingegen waren die phänotypischen Änderungen der Zellen weniger deutlich. Das Wachstum dieser Zelllinie war konfluent im Vergleich zur KPC 661 Zelllinie. Hier zeigte die Zelllinie trotz täglicher Stimulation keine stark auffallenden Änderungen in der Morphologie.

5.9.2 Analyse stimulierter KPC Zellen mit dem Durchflusszytometer

Die stimulierten KPC 661 und KPC 438 Zellen wurden zusätzlich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen nach fünf bzw. sieben Tagen aus der Kultur isoliert, extrazellulär gefärbt und ihre Lgr4-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Abb.47 ist der Vergleich der drei Gruppen, Kontrolle, Langzeitbehandlung der Zellen mit TGF β -1 und Kurzzeitbehandlung der Zellen (TGF β -1) dargestellt.

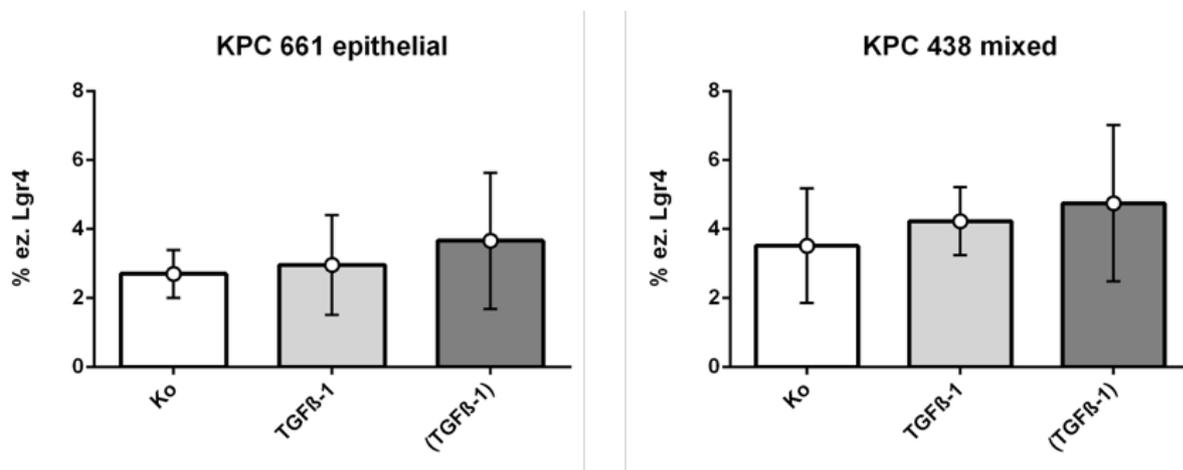


Abbildung 47 Extrazelluläre Lgr4-Expression in stimulierten KPC 661 und KPC 438

Darstellung der extrazellulären Lgr4-Expression in % per Durchflusszytometrie gemessen. Ko= Kontrolle ohne Stimulation, Langzeitbehandlung **TGF β -1** tgl. Stimulation für 5 bzw. 7d, Kurzzeitbehandlung (**TGF β -1**) 3 Tage Stimulation. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot.

Mithilfe der graphischen Darstellung der Ergebnisse aus der Stimulation der KPC 661 und KPC 438 konnte gezeigt werden, dass durch eine Kurzzeitbehandlung und anschließendes Aussetzen der Zytokinbehandlung (TGF β -1) die Expression des Lgr4-Rezeptors steigt. Bei der statistischen Analyse konnten jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede detektiert werden. Die Kurzzeitbehandlung der Zellen bewirkt somit tendenziell eine etwas höhere Expression des Lgr4-Rezeptors als ohne Zytokinbehandlung.

Im Anschluss der Analyse stimulierter und nicht stimulierter Zellen wurde versucht die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in einem Western Blot zu replizieren.

5.9.3 Western Blot stimulierter KPC Zellen

Hierfür wurden die Zellen nach demselben Behandlungszeitraum stimuliert und für den Western Blot aus der Kultur isoliert. In Abb.48 sind die Banden der Lgr4-Expression im Western Blot zu sehen.

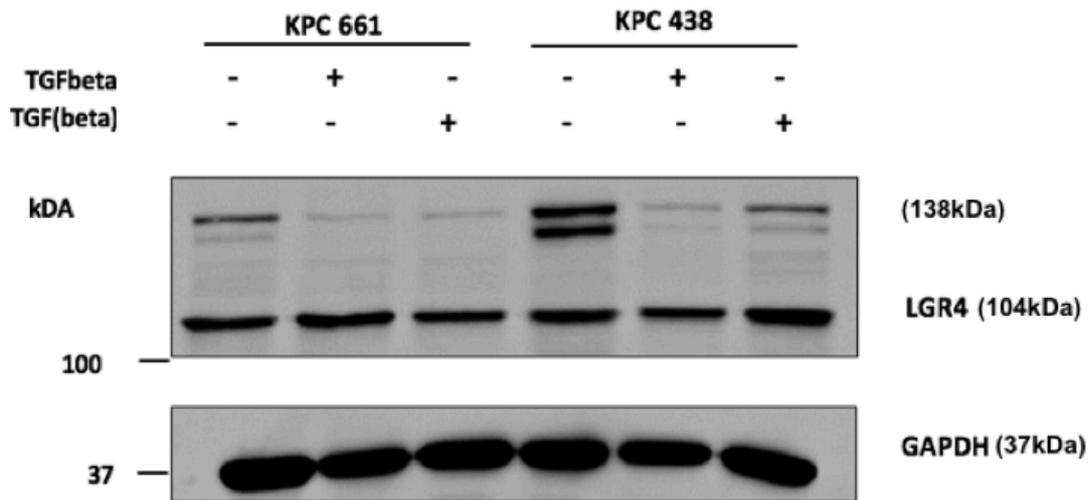


Abbildung 48 Western Blot der stimulierten KPC 661 und KPC 438

KPC 661 Ko, TGFβ-1, (TGFβ-1), KPC 438 Ko, TGFβ-1, (TGFβ-1)

Der Lgr4-Rezeptor wurde vor allem in den Kontrollgruppen sowie in den kurzzeitig stimulierten Zellen exprimiert. Das Ergebnis der KPC 438 war hier deutlicher als die Banden der KPC 661 Zelllinie.

Somit wurde durch den Western Blot bestätigt, dass durch eine kurzzeitige Stimulation der Zellen mit dem Zytokin TGFβ-1 eine höhere Expression von Lgr4 erreicht werden kann als bei einer Langzeitbehandlung der Zellen.

Für eine genauere statistische Analyse der drei Gruppen wurden im Folgenden die Banden auf Höhe von 104kDa und 138kDa einzeln und in Kombination mithilfe des Programms ImageJ quantifiziert und graphisch dargestellt.

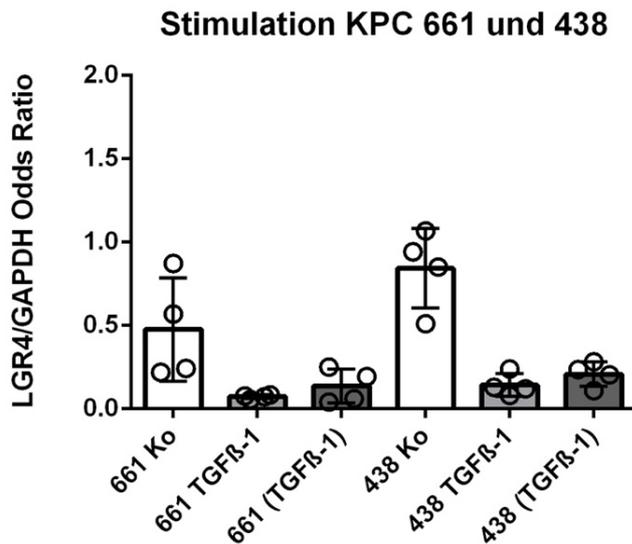


Abbildung 49 densitometrische Analyse der oberen Banden 138kDa

Darstellung der Farbtiefe der einzelnen oberen Banden im OD Ratio der beiden KPC Zelllinien. n=4. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot.

Wie bereits an den Banden zu erkennen war, ergab die densitometrische Auswertung, dass die Kontrollgruppe beider Zelllinien die höchste Lgr4-Proteinexpression aufwies. Das Expressionslevel der kurzzeitig behandelten Zellen (TGFβ-1) war höher als das der Langzeitbehandlung, TGFβ-1, jedoch lagen beide unter dem Expressionsniveau der Kontrollgruppe.

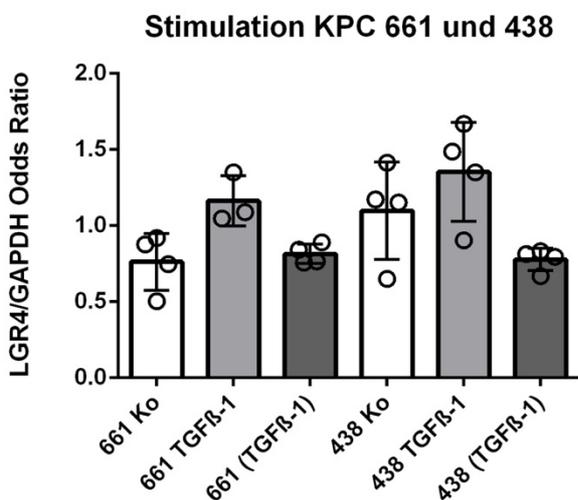


Abbildung 50 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 104kDa

Darstellung der Farbtiefe der einzelnen Banden im Odds Ratio der beiden KPC Zelllinien. n=4, 661TGFβ-1 n=3. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot.

Bei der einzelnen densitometrischen Analyse der Banden auf Höhe des Lgr4-Rezeptors (104kDa) zeigten die Langzeitbehandlungen der Zellen mit TGFβ-1 die höchste Expression gefolgt von den

kurzzeitig behandelten Zellen. Jedoch ergaben sich bei keinem der Vergleiche signifikante Unterschiede der Expressionslevel.

Für weitere statistische Auswertungen wurden vier einzelne Graphen der beiden Zelllinien erstellt. Hierfür wurden die Banden auf Höhe von 104kDa und 138kDa densitometrisch analysiert und für die jeweilige KPC Zelllinie dargestellt.

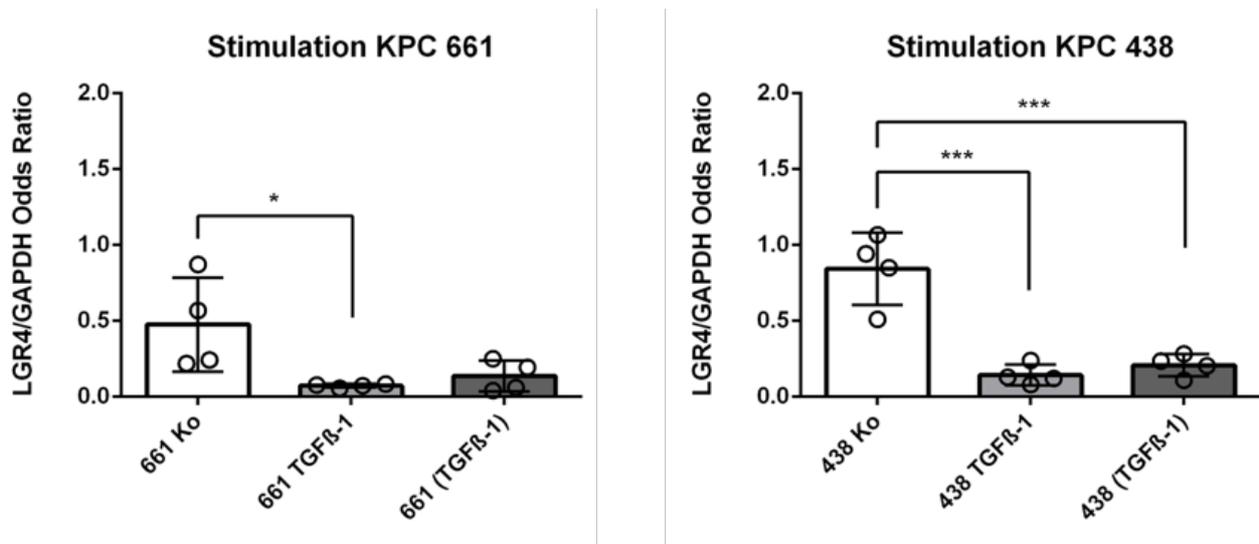


Abbildung 51 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 138kDa in KPC 661 und KPC 438

Vergleich der Densometrie der Banden auf Höhe von 138kDa im Odds Ratio. Mithilfe des ANOVA mit Bonferroni Korrektur konnten signifikante Unterschiede in der Lgr4-Expression im Western Blot nachgewiesen werden. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot, $p < 0,05^*$, $p < 0,001^{***}$.

Bei der statistischen Analyse der Banden auf Höhe von 138kDa der KPC 661 und KPC 438 konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Bei beiden Zelllinien war das Lgr4-Expressionslevel in den Kontrollgruppen signifikant höher als in dauerhaft stimulierten TGFβ-1 bzw. kurzzeitig stimulierten Zellen, (TGFβ-1).

Des Weiteren wurde zwar keine Signifikanz zwischen einer dauerhaften Stimulation verglichen mit kurzzeitiger Stimulation detektiert, jedoch konnte hier eine tendenziell höhere Expression bei kurzzeitig stimulierten Zellen nachgewiesen werden.

Bei der statistischen Analyse der Banden auf Höhe von 104kDa der KPC 661 Zellen hingegen konnte eine signifikant höhere Lgr4-Expression in dauerhaft stimulierten Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

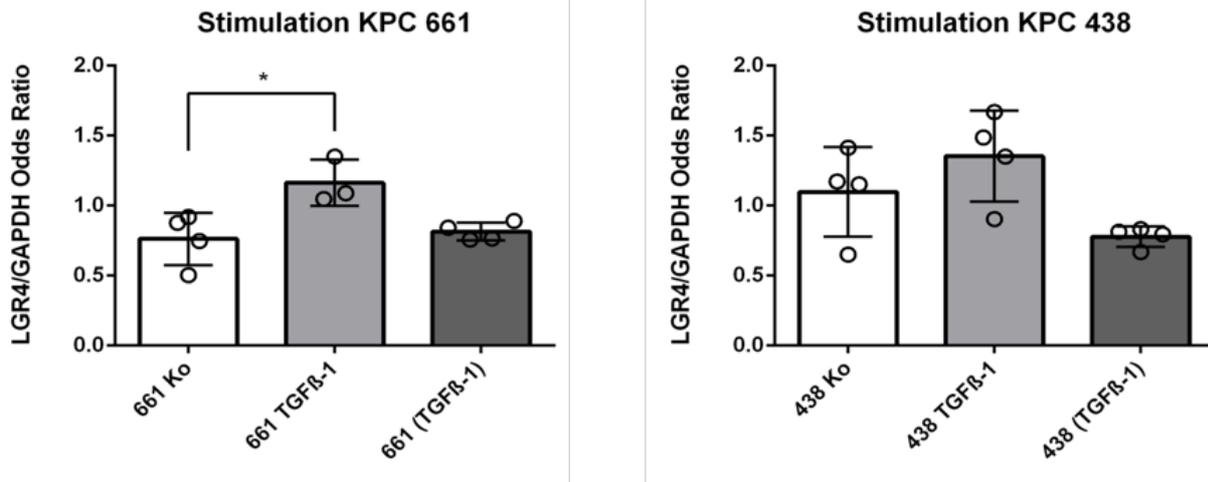


Abbildung 52 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 104kDa in KPC 661 und KPC 438.

Vergleich der Densometrie der Banden auf Höhe von 104kDa im Odds Ratio. Mithilfe von ANOVA mit Bonferroni Korrektur konnte eine Signifikanz in der Lgr4-Expression zwischen 661 Ko und 661 TGFβ-1 nachgewiesen werden n=4, 661TGFβ-1 n=3. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter Dot-Plot, p<0,05*.

Als letzte Analyse der Banden des Western Blots aus der Stimulation wurde die Kombination der Banden auf Höhe von 104kDa und 138kDa quantifiziert und verglichen.

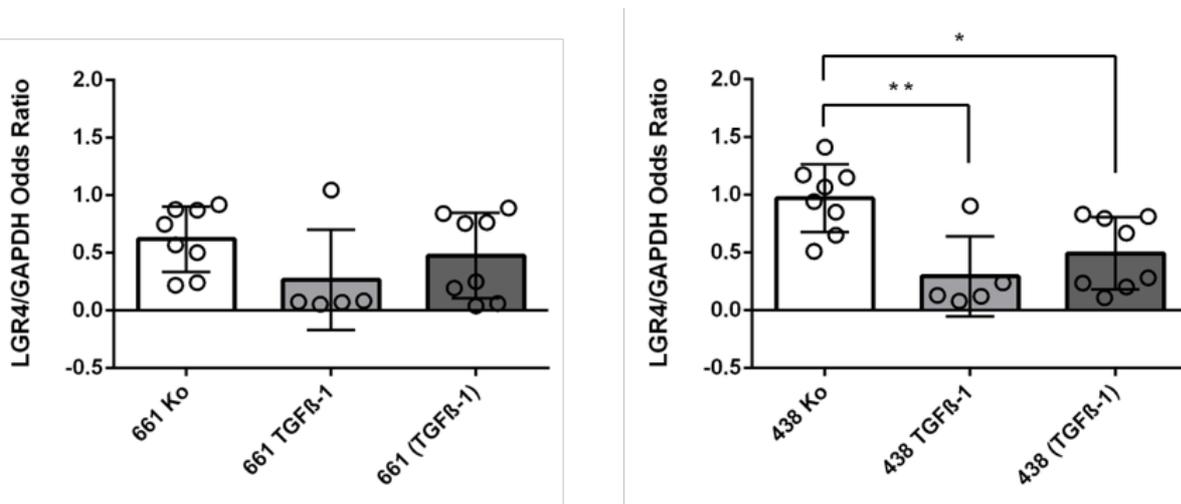


Abbildung 53 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 138kDa und 104kDa

Vergleich der Farbtiefe der Banden im Odds Ratio. Mithilfe von ANOVA mit Bonferroni Korrektur konnte eine Signifikanz in der Lgr4-Expression zwischen 438 Ko und 438 TGFβ-1 und zwischen 438 Ko und 438 (TGFβ-1) aufgewiesen werden. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung im Scatter DotPlot, p<0,05*, p<0,01**.

Bei der Analyse der Banden auf Höhe von 104 und 138kDa konnten signifikant höhere Expressionen des Lgr4-Rezeptors zwischen der Kontrolle und den kurzzeitig behandelten Zellen (TGFβ-1) sowie der Kontrolle und den dauerhaft behandelten Zellen, TGFβ-1, in den KPC 438 Zellen nachgewiesen werden. Bei den KPC 661 Zellen hingegen konnten tendenziell höhere Lgr4-Expressionen in der Kontrolle, sowie in den kurzzeitig stimulierten Zellen (TGFβ-1) nachgewiesen

werden. Im Anschluss an den Western Blot wurde zusätzlich eine PCR der stimulierten Zellen durchgeführt.

5.9.4 PCR stimulierter KPC Zellen

Auch hier wurden die Zellen im selben Rhythmus stimuliert und für die Durchführung der PCR isoliert. Die Ergebnisse wurden anschließend quantifiziert und analysiert.

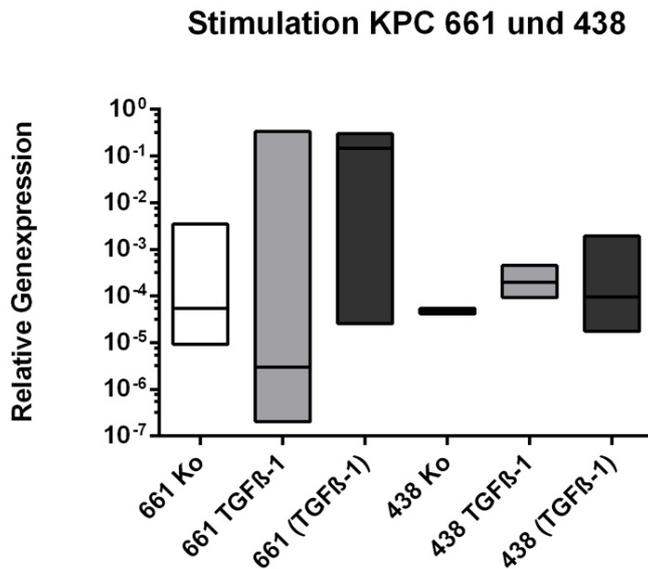


Abbildung 54 mRNA-Expression von Lgr4 in KPC 661 und KPC 438

Darstellung der Mittelwerte der relativen Genexpression ($\text{Ratio} = 2^{\Delta - \Delta Ct}$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Lgr4-Expression festgestellt werden. Darstellung der Line at median in Floating bars (min to max).

Die Ergebnisse der PCR ergeben die höchste Expression in den kurzzeitig stimulierten Zellen und den Kontrollen. Zwar zeigt die dauerhafte Stimulation der Zellen ebenfalls eine hohe Expression, jedoch sind die Ergebnisse bei KPC 661 sehr weitreichend, von einer sehr niedrigen bis zu einer hohen Expression. Bei KPC 438 hingegen zeigt die kurzzeitige Stimulation stärkere Unterschiede im Lgr4-Expressionslevel.

Jedoch konnten bei keiner der Zellen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

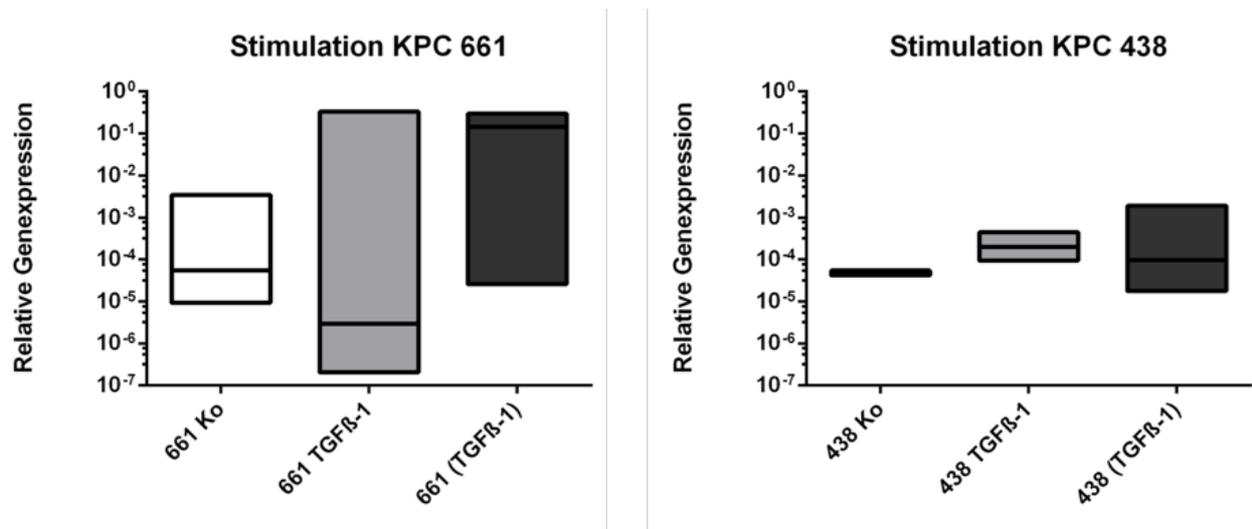


Abbildung 55 statistische Analyse der KPC 661 und KPC 438

Darstellung der Mittelwerte der relativen Genexpression (Ratio= $2^{-\Delta Ct}$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Lgr4-Expression zwischen der Ko-Gruppe, stimulierten TGF β -1 und den kurzzeitig stimulierten Zellen (TGF β -1) nachgewiesen werden. 661 Ko n=3, TGF β -1 n=6, (TGF β -1) n=3, 438 n=3, (TGF β -1) n=4. Darstellung der Linie at median in Floating bars (min to max).

Wie beim Western Blot der stimulierten Zellen zeigte sich auch in der PCR tendenziell das höchste Expressionslevel in den kurzzeitig behandelten Zellen (TGF β -1) und der Kontrollgruppe.

Insgesamt konnte in dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass die Quantifizierung der Lgr4-Expression auf den vier Zelllinien mithilfe der verschiedenen Methoden starken Schwankungen unterlag. Relativ konstante Ergebnisse konnten nur im Durchflusszytometer und dem Western Blot mit unstimulierten Zellen erzielt werden.

Bei der PCR und den stimulierten Zellen ergaben sich keine gleichbleibenden Expressionslevel. Bei einer kurzzeitigen TGF β -1 Stimulation wiesen die Zellen eine tendenziell höhere Lgr4-Expression auf und bei einer Langzeitbehandlung sinkt die Lgr4-Expression unter das Level der unstimulierten Kontrollgruppe.

Bei der subkutanen Implantation der KPC 661 konnte bei allen Mäusen ein sehr aggressives und metastatisches Wachstum, auch in fernes Gewebe, nachgewiesen werden. Jedoch konnten nur Tendenzen für ein größeres subkutanes Tumorwachstum in Lgr4⁻-sortierten Zellen aufgezeigt werden.

6 Diskussion

Das PDAC stellt mit über 95% die weitaus häufigste maligne Form des Pankreaskarzinoms dar. Aufgrund des sehr aggressiven Wachstums und der daraus resultierend äußerst geringen Überlebenschancen, nimmt es bei beiden Geschlechtern den Platz der vierthäufigsten Krebstodesursache ein. Wegen der spät und unspezifisch auftretenden Symptome und des schnellen invasiven Metastasierungspotentials ist die Chance auf Heilung weiterhin sehr gering.

Neueste Erkenntnisse zeigen, dass die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) eine maßgebliche Rolle bei der Entwicklung invasiver Eigenschaften im PDAC spielt. Durch die Umwandlung in einen mesenchymalen Phänotyp erlangen Krebszellen die Fähigkeit zu metastasieren. Zudem zeigen verschiedene Studien, dass EMT Krebsstammzellen (CSC) hervorbringen kann. Die Plastizität, sowie die essentielle Eigenschaft zur Selbsterneuerung, führt letztendlich zu einer hohen Therapieresistenz beim PDAC mit erheblich sinkenden Therapiemöglichkeiten und schlussendlich einer schlechten Prognose für den Patienten [145].

Angesichts des Erlangens dieser neuen Eigenschaften und der daraus resultierend hohen Chemoresistenz sowie einer geringen kurativen Resektionsrate sind die Therapiemöglichkeiten bisher nicht ausreichend, um die Prognose beim PDAC zu verbessern.

Aufgrund dessen sind neue zielgerichtete molekulare Therapien von großer Notwendigkeit. Aktuelle Studien berichten über Stammzell-basierte Therapieansätze, allerdings ist die Regulierung zur Selbsterneuerung und Differenzierung der CSC bisher noch unzureichend erforscht.

Aus Vorarbeiten ist bereits bekannt, dass die Regulation von Krebsstammzellen im PDAC u.a. durch den Lgr-RSPO Komplex passiert. Durch Bindung der Liganden (RSPO 1-4) an die Lgr-Rezeptoren wird die Wnt/ β -Catenin Signalkaskade verstärkt, wodurch es zur Proliferation epithelialer Zellen kommt.

Die Lgr-Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche mit ca. 800 Mitgliedern die größte Gruppe der Membranproteine im Säugetiergenom darstellen. Eine ihrer wichtigen Funktionen ist die Erhaltung von Stammzellen.

Kato und Barker et al. zeigten, dass die Lgr-Rezeptoren Marker für gewebesansässige Stammzellen verschiedener Organe, wie der Niere oder dem Darmepithel [83, 84, 145, 146] sind. Aber auch im Magen, den Haarfollikeln oder der Haut sind Lgr-Rezeptoren vertreten [147]. Nichtsdestotrotz ist es bisher unklar, ob die Lgr-Rezeptoren nur Marker dieser Zellen darstellen, oder ob ihnen sogar eine zentrale Rolle bei der Umsetzung der Eigenschaften dieser Stammzellen zugeteilt werden kann.

Die GPCR sind Zielstrukturen vieler bereits zugelassener Medikamente (bereits 36% der Arzneimittel sind gegen GPCR gerichtet) und werden seit Jahrzehnten erforscht. Mittlerweile ist bekannt, dass sie auch auf die Pluripotenz und Differenzierung der Stammzellen einwirken [148]. Aufgrund dieser neuen Erkenntnis müssen GPCR weiter erforscht werden, um ihre Wirkung auf

Stammzellen und CSCs besser verstehen zu können und die Chancen zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zu nutzen.

Bereits 2017 wurde gezeigt, dass der Lgr4-Rezeptor eine Kernfunktion bei der Aktivierung der EMT und Metastasierung im Prostatakarzinom einnimmt und dadurch auf die Tumorprogression und die Verkürzung des Rezidiv-freien Überlebens einwirkt [149].

Das Ziel dieser Arbeit lag darin, die Wirkung des Lgr4-Rezeptors im Pankreaskarzinom genauer zu untersuchen. Hierfür wurde mit speziellen Pankreastumorzellen (Pankreaskarzinomzellen aus genetisch modifizierten Mäusen, KPC/KPCZ) gearbeitet. Durch ein besseres Verständnis der Funktionen des Lgr4-Rezeptors und seiner Wirkung in Bezug auf die Tumorentwicklung und -progression könnte er den Schlüssel neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze darstellen. Die nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen sollten zeigen, ob eine unterschiedliche Lgr4-Expression Einfluss auf das Tumorneubildungspotential, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie das Metastasierungspotential *in vivo* nimmt. Hierfür wurde die Lgr4-Lokalisierung und das Expressionsniveau auf KPC/KPCZ-Zellen mittels verschiedener Methoden analysiert und eine der Zelllinien mit der höchsten Lgr4-Expression für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche verwendet. Im Folgenden werden die dafür verwendeten Methoden und deren Ergebnisse diskutiert.

In dieser Arbeit wurde die extra-, sowie die intrazelluläre Lgr4-Expression, sowohl in den Pankreastumorzellen, den KPC/KPCZ-Zellen, als auch in den aus Mäusen gewonnenen Tumoren untersucht. Die Bestimmung der Lokalisierung, sowie die Bestimmung des Lgr4-Expressionsniveaus, wurde mittels verschiedener Methoden durchgeführt. Mithilfe der Durchflusszytometrie, des Western Blots, der PCR sowie der Immunfluoreszenz wurde die extra- und intrazelluläre Lgr4-Expression gemessen und miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die Expression des Lgr4-Rezeptors in dreidimensionalen Kulturen untersucht. Mithilfe des Zytokins TGF β wurden die verwendeten Zellen stimuliert, um somit Änderungen der Lgr4-Expression zu detektieren. Neben den *in vitro* Versuchen wurden zusätzlich *in vivo* Versuche zur Untersuchung der Tumorprogression, abhängig von der Expression des Lgr4-Rezeptors, durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Messung des Lgr4-Rezeptors vielen noch nicht bekannten Einflüssen unterliegt und mit den derzeit zur Verfügung stehenden Antikörpern nur wenig konstante Ergebnisse mithilfe verschiedener Methoden erzielt werden konnten.

Im Gesamten ergaben die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie und des Western Blots, dass die drei Zelllinien KPC 661, 438 und 550 die höchsten Lgr4-Expressionen aufwiesen.

Beim Western Blot beispielsweise zeigte die KPC 550 Zelllinie mit einer durchschnittlichen Bandenintensität von 0,96 mit etwas Abstand die höchste Lgr4-Expression. Allerdings ist zu beachten, dass bei einem Western Blot keine getrennte Messung zwischen extra- und intrazellulär lokalisiertem Lgr4 möglich ist, wodurch Unterschiede in der Quantifizierung des Lgr4-Rezeptors entstehen könnten.

Krebs et al. beschrieben 2017, dass ein Knockout des Zeb1 Gens (KPCZ) zu geringerer Malignität führt. Dies bedeutet eine reduzierte Heterogenität innerhalb des Tumors, geringere

Fernmetastasen und verminderte lokale Invasion im Vergleich zu KPC Tumoren [138]. Tatsächlich konnte dies in unseren Versuchsreihen repliziert werden. Die Zelllinie KPCZ 426 zeigte in den meisten Messungen die geringste Lgr4-Expression und im Western Blot sogar eine signifikant geringere Lgr4-Expression als die anderen drei KPC Zelllinien. Auch Luo et al. 2017 beschrieben den Zusammenhang zwischen dem Lgr4-Rezeptor und dem Transkriptionsfaktor Zeb. Der KD von Lgr4 führt zu verminderter Migration, Invasion und MET (mesenchymale-epitheliale Transmission), wodurch epitheliale Marker wie E-Cadherin hochreguliert werden und der Transkriptionsfaktor Zeb herunterreguliert wird [149]. Genauso konnten in der Zellkultur Unterschiede zwischen den Zelllinien detektiert werden. Die KPCZ 426 Zelllinie wies die geringste Zellverdopplungsrate und Zellzahl bei der Isolation im Gegensatz zu den KPC 661, 438 und 550 Zellen, welche eine hohe Zellverdopplungsrate und abhängig von der Zelllinie, ein eher adhärentes Wachstum in den Zellkulturflaschen aufwiesen.

Zusätzlich konnten unsere Untersuchungen aufzeigen, dass das Lgr4-Expressionslevel in normalen, adhärent wachsenden Kulturen ein signifikant höheres Expressionsniveau als in dreidimensionalen Kulturen aufwies. Ergebnisse der Untersuchungen aus dem Jahr 1966 von Halpern et al. zeigten, dass ein Kennzeichen maligner Zellen die Bildung dreidimensionaler Zellaggregate darstellt. Dies würde bedeuten, dass eine erhöhte Lgr4-Expression zu gesteigerter Bildung von Zellaggregaten führt, was wiederum die genannte Hypothese, dass eine gesteigerte Lgr4-Expression in erhöhter Malignität im Tumorgeschehen resultiert (ein erhöhtes Tumorneubildungspotential, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ein gesteigertes Metastasierungspotential), stützt. Jedoch weisen die vorliegenden Daten dieser Arbeit eher das Gegenteil auf. Die Fähigkeit zur Bildung dreidimensionaler Sphäroide in normalen Zellkulturplatten mit speziellem Sphäroidmedium konnte nicht bei allen Zelllinien nachgewiesen werden, weswegen möglicherweise auch keine erhöhte Lgr4-Expressionsanalyse der Sphäroide im Durchflusszytometer gezeigt werden konnte. Die Bildung dreidimensionaler Sphäroide war vor allem in der gemischten KPC 500 Zelllinie zu beobachten, bei den drei anderen Zelllinien hingegen waren weniger Sphäroide und eher ein normales, adhärentes Zellwachstum zu beobachten. Ergebnisse zuvor durchgeführter Untersuchungen zeigten, dass mesenchymale Zelllinien aufgrund des Verlusts der Zell-Zell-Kontakte durch Reduktion des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin die Fähigkeit zur Migration erlangen und somit ein aggressiveres Wachstum im Vergleich zu epithelialen Zelllinien zeigen [140, 150]. Dies könnte eine Erklärung für die repräsentative Bildung dreidimensionaler Sphäroide der mesenchymalen KPC 550 Zelllinie sein. Jedoch wurde bei Messung der extrazellulären Lgr4-Expression im Durchflusszytometer keine erhöhte extrazelluläre Lgr4-Expression in den KPC550 Zellen festgestellt.

Aus unseren Ergebnissen können wir den Rückschluss ziehen, dass ein erhöhtes Potential zur Bildung dreidimensionaler Sphäroide nicht zwingend mit einer Expressionssteigerung des Lgr4-Rezeptors vonstatten geht, sondern von anderen Faktoren beeinflusst wird. Eine Studie über die Rolle von Lgr4 in Bruststammzellen aus dem Jahr 2013 zeigte, dass ein Mangel des Lgr4-

Rezeptors nicht zwingend mit der Größe oder Anzahl der Sphäroide zusammenhängt, sondern durch das Signalprotein Wnt3a beeinflusst wird [151]. Auch die Ergebnisse der PCR waren bei allen Versuchsreihen sehr inkonstant und wiesen keinerlei Kontinuität im Lgr4-Expressionslevel auf. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der Proben aus der PCR eine äußerst geringe Lgr4-Menge. Jedoch entgegen aller Ergebnisse zur Expressionsanalyse der KPCZ 426 zeigte diese Zelllinie hier die höchste Expression. Diese Werte konnten allerdings in keiner anderen Versuchsreihe repliziert werden.

Um die Inkonstanz der PCR-Ergebnisse zu ändern und höhere Werte zu erreichen wurde versucht durch Änderungen der Lysepuffermenge mehr RNA aus den Zellpellets zu isolieren. Jedoch konnten auch dadurch keine überzeugenden Ergebnisse geliefert werden. Auch mithilfe der eingesetzten Zellmenge von $0,5 \times 10^6$ bis zu $1,0 \times 10^6$ Zellen konnten keine konstanten Ergebnisse erzielt werden. Allerdings ist die Effizienz einer PCR von vielen Faktoren abhängig was die inkonstanten, nicht verwendbaren Ergebnisse erklären könnte. Eine Ursache für DNA-Kontaminationen ist beispielsweise ein PCR-Carryover (PCR-Produkt aus voriger Analyse). Trotz Einhaltung der Maßnahmen zur Minimierung von Probenkontaminationen u.a. durch Tragen sauberer Laborkittel und Handschuhe, Verwendung von Pipetten mit Abschlussfilter etc. können Mikrokontaminationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden und bilden daher eine plausible Erklärung für geringe Messfehler, gerade, dann wenn es sich um hochsensitive Messverfahren wie eine PCR handelt [136]. In der Versuchsreihe wurde probiert durch Erhöhung der Zyklenanzahl auch sehr geringe Mengen von mRNA nachzuweisen. Allerdings besteht hierbei die Gefahr der Entstehung von Primerdimeren (Hybride aus zwei Primern, die nicht mehr zur Amplifikation verwendet werden können). Dies bedeutet, es kommt zur Ansammlung falscher, unspezifischer Produkte, welche die Ergebnisse verfälschen. Jedoch konnte auch durch Erhöhung von 40 Zyklen auf 50 Zyklen keine Besserung der Ergebnisse erreicht werden, weshalb die Versuche weiterhin mit 40 Zyklen durchgeführt wurden.

Aus unserer Versuchsreihe lässt sich dennoch erschließen, dass die Detektion und somit die Quantifizierung der Lgr4-Expression auf den KPC/KPCZ-Zellen mit den derzeit zur Verfügung stehenden Antikörpern äußerst schwierig ist. Die Gründe für die inkonstanten Ergebnisse zwischen den einzelnen Versuchen und Methoden bleiben unklar, da die genauen Mechanismen des Lgr4-Rezeptors bisher nicht ausreichend erforscht sind. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Lgr4-AK möglicherweise bei den einzelnen Methoden nicht spezifisch an die antigenen Teile des Lgr4-Rezeptors binden oder die verwendete murine Pankreastumorzelllinie ein niedriges Lgr4-Expressionsniveau besitzt.

Eine andere Auslegung wäre die Sensibilität des transmembranen Lgr4-Rezeptors, welcher eventuell bei Änderungen der Konditionen, beispielsweise Mediumswechsel, Temperaturschwankungen, Stress etc. in das Innere der Zelle transloziert und somit extrazellulär nicht mehr detektiert werden kann. Dies würde ebenfalls die Inkonstanz der Ergebnisse, vor allem die der PCR, erklären.

Wie aus zuvor durchgeführten Untersuchungen bekannt ist, hat der Lgr4-Rezeptor Einfluss auf die Tumorentwicklung und -progression [146, 149]. Um die *in vivo* Funktionen des Lgr4-Rezeptors besser verstehen zu können und Rückschlüsse zuvor durchgeführter Studien zu bestätigen, wurde die KPC 661 Zelllinie nach Lgr4⁺ und Lgr4⁻ Zellen sortiert und s.c. implantiert.

Bei der s.c. Implantation der Zellen konnten erstaunlicherweise die zu erwartenden Unterschiede bezüglich des Tumorwachstums nicht bestätigt werden. Bezüglich der Invasivität des Tumorwachstums gab es keine Unterschiede zwischen Lgr4^{+/-} sortierten Zellen. Beide wiesen ein starkes, infiltrierendes Wachstum in die umliegende Muskulatur auf.

In weiteren Versuchen könnte eine Änderung der Zellzahl oder ein anderer Zeitpunkt des Versuchsendes gewählt werden. Des Weiteren wäre eine Resuspension der Zellen in einer Anwachshilfe denkbar. Hierbei könnten die Zellen in Matrigel, welches der extrazellulären Matrix einer Basalmembran ähnelt und somit als Wachstumsgrundlage dient, suspendiert und anschließend injiziert werden.

Bei Anlegung eines SFA sortierter Zellen in speziellen 96-well Platten und speziellem Sphäroidmedium, welche beide für eine geringe Anhaftung der Zellen sorgen, bildeten Lgr4⁺ und Lgr4⁻ sortierte KPC 661 Zellen dreidimensionale Sphäroide. Wie bereits oben erwähnt, ist ein Kennzeichen der Malignität die Ausbildung dreidimensionaler Tumoraggregate [152].

Wie bei den s.c. Tumoren bildeten die Lgr4⁻ sortierten Zellen tendenziell größere und mehr Sphäroide im Gegensatz zu Lgr4⁺ sortierten KPC 661 Zellen. Jedoch wurde auch hier keine Signifikanz nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass aus Lgr4KO Mäusen isolierte Zellen zwar in der ersten Passage eine unveränderte Sphäroidbildung aufweisen, jedoch mit zunehmender Passage mehr und mehr ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung verlieren [151]. Im Kontrast hierzu konnten wir nachweisen, dass unsere Lgr4-Zellen initial in der ersten Passage eine bessere Fähigkeit zur Sphäroidbildung aufwiesen.

Dies würde bedeuten, dass die Lgr4-Zellen zwar initial mehr Sphäroide bilden, was als ein Indiz für ein aggressiveres Tumorgeschehen steht, jedoch durch den Mangel an Lgr4 ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren [151].

In Bezug auf die geringen Unterschiede im Tumorwachstum und die Bildung dreidimensionaler Sphäroide sind die Ursachen weitreichend. Wie auch in den *in vitro* Versuchsreihen kommen hier ursprünglich unspezifische Bindungen des AKs, möglicherweise bereits beim Sortierprozess der Zellen, Konditionsänderungen und natürlich unzureichende Erkenntnisse über die funktionellen Mechanismen des Lgr4-Rezeptors in Frage.

Ebenso wären andere Eigenschaften des Lgr4-Rezeptors entgegen der Hypothese denkbar, sodass der Lgr4-Rezeptor keine derart relevanten Funktionen in der Tumorprogression einnimmt, sondern vielmehr durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs und dessen Folgen agiert.

Da Ergebnisse zuvor durchgeführter Studien zeigten, dass die EMT Wirkung auf die Tumorprogression hat, wurden infolgedessen die KPC Zellen als nächstes mit dem Zytokin TGF β -1 stimuliert, um eine EMT zu induzieren [149]. Dies war vor allem für die epitheliale KPC 661

Zelllinie von Bedeutung, da durch Umwandlung zum mesenchymalen Phänotyp ein aggressiveres Wachstum zu erwarten wäre, was laut der gestellten Hypothese mit einer Steigerung der Lgr4-Expression resultieren würde.

Somit sollte mithilfe der EMT-Induktion die Lgr4-Expression in den KPC Zellen erhöht werden. Durch Zugabe des Zytokin TGF β -1 wird eine EMT ausgelöst. Das Wachstum epithelialer Zellen wird durch TGF β -1 inhibiert, während das Wachstum mesenchymaler Zellen stimuliert wird. Die Entwicklung von einem frühen Karzinom zu einem invasiven, aggressiven Malignom und somit einer aggressiven Tumorprogression steht in Verbindung mit der Dedifferenzierung und der Funktionsänderung von Tumorzellen sowie dem Verlust des epithelialen Phänotyps zur Umwandlung eines mesenchymalen Phänotyps [153]. Durch diese Transdifferenzierung erhalten diese (normalen oder auch neoplastischen) Zellen innerhalb eines Tumors Charakteristika von Krebsstammzellen [153-156]. Beim Pankreaskarzinom weisen dedifferenzierte, mesenchymale Zellen eine erhöhte Tumorzellinvasion- und Migrationsfähigkeit auf. Durch die erhöhte Malignität der Zelllinien kommt es zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte durch Reduktion des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin, wodurch eine Zellstreuung folgt. Ebenso eine erhöhte Angiogenese und langfristig gesehen ein erhöhtes Metastasierungspotential [139, 140, 157].

Die Untersuchungen zeigten, dass bei der epithelialen Zelllinie KPC 661 in den lichtmikroskopischen Aufnahmen eine deutliche Änderung in der Morphologie zum fibroblastenförmigen Phänotyp stattfand, was als Indiz einer aktivierten EMT interpretiert werden kann [153-155, 157]. Bei der gemischten Zelllinie KPC 438 hingegen waren keine morphologischen Unterschiede zu sehen. Dies entspricht Ergebnissen zuvor durchgeführter Studien, welche belegen, dass das Zytokin TGF β -1 stimulierend und inhibierend auf Zellen einwirken kann. Somit inhibiert es das Wachstum epithelialer Zellen und stimuliert das Wachstum mesenchymaler Zellen [139]. Bei der gemischten Zelllinie KPC 438 wurde somit keine EMT aktiviert und dadurch das Wachstum und die Morphologie dieser Zelllinie nicht beeinflusst.

Jedoch besteht auch die Möglichkeit, dass die phänotypische Umwandlung bei einem gemischten Zelltyp (KPC 438) weniger sichtbar ist als bei einer epithelialen Zelllinie. Charakteristischerweise zeigen epitheliale Zellen eine deutliche Zellpolarität im Vergleich zu mesenchymalen Zellen mit keiner eindeutigen Struktur. Dies könnte bedeuten, dass auch bei der gemischten Zelllinie, KPC 438, das Wachstum durch Aktivierung einer EMT stimuliert wurde aber nicht so deutlich im Lichtmikroskop zu erkennen war.

Bei beiden Zelllinien konnten die höchsten Lgr4-Expressionen bei den Kontrollgruppen ohne Stimulation bzw. bei den kurzzeitig stimulierten Zellen mittels Durchflusszytometrie, Western Blot und PCR nachgewiesen werden. Durch die phänotypische Umwandlung in der EMT (ausgenommen KPC 438) und Änderungen in der Lgr4-Expression der KPC 661 und 438 liegt die Vermutung einer Korrelation zwischen einer TGF β /EMT und Änderung der Lgr4-Expression nahe. Eine andere Annahme hingegen wäre, dass bei der KPC 438 die morphologischen Änderungen weniger sichtbar waren, da es sich um eine gemischte Zelllinie handelt. Somit würde das Zytokin

TGF β in dieser Zelllinie das Wachstum stimulieren und eine EMT auslösen, jedoch aber keine Umwandlung in der Morphologie aktivieren. Daraus folgt, dass möglicherweise bei beiden Zelllinien eine EMT ausgelöst wird, was sich in Änderungen des Lgr4-Expressionslevels nach kurzzeitiger TGF β -1 Stimulation widerspiegelt.

Um Klarheit darüber zu erlangen, müssten Versuche mit anderen Zelllinien, darunter auch mesenchymalen Zelllinien, durchgeführt werden. Des Weiteren wäre eine Immunfluoreszenz stimulierter Zellen mit anschließender Färbung auf Lgr4 und CDH-1 ein Ansatz, neue Erkenntnisse über eine Korrelation mesenchymaler Umwandlung und Steigerung der Lgr4-Expression zu erlangen.

Erstaunlicherweise entstanden beim Western Blot der Zellen der Kontrollgruppe, sowie sehr schwach in den kurzzeitig stimulierten Zellen, Doppelbanden.

Die Ursachen für die Entstehung von Doppelbanden im Western Blot sind weitreichend.

Diese bei der Stimulation entstandenen Doppelbanden können als technische Artefakte oder als forschungsrelevante Ergebnisse, dies bedeutet als ein gesteigertes Lgr4-Expressionslevel, interpretiert werden.

Mögliche Ursachen könnten beispielsweise eine posttranslationale Proteinmodifikation sein, bei welcher diese größeren Banden zustande kommen könnten. Modifikationen wie u.a. eine Glykosylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung des Targetproteins kommen hierbei in Frage. Auch durch die Bildung von Dimeren kann es zu unspezifischen Bindungen des AKs und daraus resultierend zur Bildung von Banden mit einem höheren Molekulargewicht kommen.

Des Weiteren könnten technische Artefakte nicht komplett ausgeschlossen. Die Spezifität des Primärantikörpers wurde in den vorherigen Versuchen bei Messung der Lgr4-Expression auf den KPC/KPCZ Zellen gezeigt, bei welchen er spezifisch bei 104kDa gebunden hat.

Um unsere Ergebnisse zu replizieren sollten die Versuche wiederholt werden und zusätzlich unbehandelte Proben der KPC Zelllinien und eine Negativkontrolle (Wasser) analysiert werden.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass bei beiden Zelllinien im Durchflusszytometer und im Western Blot die höchsten Lgr4-Expressionen in den unbehandelten (Ko) und kurzzeitig behandelten Zellen ((TGF β -1)) nachgewiesen werden konnten.

Den Ergebnissen zufolge würde das pleiotrope Zytokin TGF β und somit die EMT nicht auf die Lgr4-Expression einwirken. In unseren Versuchen konnten wir Übereinstimmungen aus anderen Studien bezüglich der reversiblen Wirkung von TGF β finden. Laut Shipley et al. können Zellen, welche zuvor mit TGF β behandelt wurden, nach einem Mediumswechsel normal weiterwachsen [158] und auch eine aktuelle Studie aus 2001 zeigte die reversible EMT in Pankreaskarzinomzellen [140]. In unseren Untersuchungen konnte dies bestätigt werden. Nach einem Mediumswechsel und keiner weiteren Zugabe von TGF β ist die Lgr4-Expression wieder gestiegen. Somit würde TGF β mit der Expression des Lgr4-Rezeptors korrelieren.

Insgesamt kommen wir zu dem Resultat, dass die Rolle des Lgr4-Rezeptors im Pankreaskarzinom eine mögliche Rolle bei der Tumorprogression spielt, jedoch müssen wir davon ausgehen, dass

mit den derzeit zur Verfügung stehenden Materialien und Methoden keine verlässlichen Expressionsanalysen durchgeführt werden können.

Möglicherweise hängt das Expressionsmuster des Rezeptors aufgrund der inkonstanten Ergebnisse unserer Untersuchungen stark von äußeren Einflüssen wie beispielsweise Umweltbedingungen (Temperatur, Medium etc.) ab. Vor allem müsste dies in weiteren Untersuchungen erforscht werden, um möglichst genaue und konstante Ergebnisse zu erhalten.

Primär sollte somit in Zukunft eine verlässliche, analytische Methode zur Expressionsmessung gefunden werden, um damit funktionelle Untersuchungen des Rezeptors in Bezug auf die Tumorprogression im PDAC untersuchen zu können.

Es liegt nahe, dass eine gesteigerte Lgr4-Expression in zahlreichen Karzinomen, wie bereits im Prostatakarzinom erforscht, auf die Tumorprogression (Metastasierung, Invasivität etc.) einwirkt. Jedoch stellt sich die Frage, ob dies die Folge einer erhöhten Rezeptorexpression ist oder ob der Rezeptor durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs zu Beginn Einfluss auf die Karzinogenese nimmt. Wir finden in dieser Arbeit keine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Lgr4-Rezeptor und der Tumorprogression im PDAC. Möglicherweise hat der Lgr4-Rezeptor keinen direkten Einfluss auf die Malignität des Tumors, sondern wirkt über seine Liganden (RSPO1-4) bei der Tumoruminitiation durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs, wodurch es zur Proliferation der Zellen kommt.

Wie bereits oben erwähnt kann hier über den Zeitpunkt des Versuchsendes, die gewählte Zellzahl oder die Resuspension der Zellen in Matrigel diskutiert werden. In Zukunft wäre auch ein genetisches Modell mit Herstellung je einer Zelllinie mit hoher, sowie niedriger Lgr4-Expression denkbar. Hierbei könnte beispielsweise mithilfe von small interfering RNA (siRNA, RNA-Interferenz) die zielgerichtete genetische Ausschaltung des Lgr4-Gens in der Zellkultur durchgeführt werden. Somit könnten darauffolgend mit dieser Lgr4-KD Zelllinie neue Versuche *in vitro* und *in vivo* durchgeführt werden. Ebenfalls denkbar wäre ein KD oder eine Überexpression des Lgr4-Gens mithilfe einer viralen Gentransduktion. Hierbei wird das gewünschte Gen mithilfe eines Virus zellulär integriert und folglich stabil exprimiert. Virale Gentransduktionen können mithilfe verschiedener Viren durchgeführt werden, wobei die lentivirale Gentransduktion aufgrund der Möglichkeit einer Gen-Übertragung in teilende und nicht teilende Zellen häufig in der Grundlagenforschung eingesetzt wird.

Insgesamt kommen wir zur Schlussfolgerung, dass die allgemeine Detektion, Lokalisierung und Bestimmung des Expressionslevels des Lgr4-Rezeptors mit den derzeit zur Verfügung stehenden Materialien in den murinen KPC/KPCZ Zellen äußerst schwierig ist, was auch die Ursache der starken Schwankungen bei der Expressionsanalyse erklären könnte. Dies bedeutet, dass als nächstes in weiteren Versuchsreihen die Ursachen und eine gegebenenfalls erhöhte Sensibilität des Lgr4-Rezeptors gegenüber Umweltbedingungen definiert und exkludiert werden muss, um dann konstante Ergebnisse in der Expressionsanalyse zu erhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass neue Therapiemöglichkeiten bei der Diagnose eines PDAC von großer Notwendigkeit sind und die Lgr-Rezeptoren aufgrund ihrer bereits bekannten Funktionen potentielle Ziele bei der Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen könnten, müssen weitere Untersuchungen zur Detektion und Charakterisierung des Lgr4-Rezeptors und dessen funktionelle Rolle im PDAC durchgeführt werden. Im Vordergrund stehen vor allem auch mögliche Zusammenhänge einer hohen und niedrigen Lgr4-Expression in Bezug auf das Tumorwachstum und das Metastasierungspotential, sowie *in vitro* Veränderungen bei einer Über- und Unterexpression des Lgr4-Rezeptors.

Möglicherweise spielt der Lgr4-Rezeptor alleine keine Rolle in der Tumorprogression, sondern besitzt mithilfe seiner Liganden und dem Wnt-Signalweg eine zentrale Wirkung auf die Tumorprogression.

7 Zusammenfassung

Bezeichnend für das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) sind das äußerst aggressive, invasive Wachstum, das hohe Metastasierungspotential, sowie die bisher unzureichenden Therapiemöglichkeiten durch eine sehr hohe Chemo- und Radiotherapieresistenz. Diese Eigenschaften werden unter anderem auch Krebsstammzellen zugesprochen, welche auch im PDAC nachgewiesen und charakterisiert wurden. Aufgrund der bereits angesprochenen unzureichenden Therapiemöglichkeiten und der sehr unspezifisch und vor allem spät auftretenden Symptome, ist die Prognose bei der Diagnose PDAC äußerst schlecht. Wie bereits bekannt, spielt der kanonische Wnt-/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg eine essentielle Rolle für normales Zellwachstum in der Embryogenese, Differenzierung und Zellproliferation. R-Spondine agieren als Agonisten der Wnt-Signalkaskade und potenzieren durch ihre Bindung an Lgr-Rezeptoren ein Signal. Defekte oder Fehlregulierungen des Wnt-Signalwegs können zu bösartigen Entartungen wie z.B. Kolon- oder Ovarialkarzinomen führen. Das Ziel dieser Arbeit mit dem Titel **„Die Untersuchung der Rolle von Lgr4 im PDAC im Hinblick auf das Tumorneubildungs-, Selbsterneuerungs- und Metastasierungspotential *in vivo*“** lag darin, den Lgr4-Rezeptor auf seine tatsächliche Rolle in Bezug auf das Tumorgeschehen in murinen Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen mittels verschiedener Methoden zeigten, dass die allgemeine Detektion sowie Lokalisierung des Lgr4-Rezeptors zur Messung des Expressionslevels starken Schwankungen unterlag. Ebenso wurde eine Expressionsanalyse in dreidimensionalen Kulturen durchgeführt, wo sich herausstellte, dass ein erhöhtes Potential zur Bildung dreidimensionaler Sphäroide nicht zwingend mit einer Expressionssteigerung des Lgr4-Rezeptors vonstatten geht, sondern womöglich von anderen Faktoren beeinflusst wird. Bei den tierexperimentellen Untersuchungen des Lgr4-Rezeptors bezüglich der Unterschiede im Tumorstadium bzw. der Tumorstadien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Lgr4⁺ und Lgr4⁻-sortierten Zellen festgestellt werden. Nach Auslösung einer EMT durch Zugabe des Zytokins TGF β wurde die phänotypische Umwandlung sowie die Expressionsanalyse mittels verschiedener Methoden durchgeführt und untersucht. Unseren Ergebnissen zufolge bewirkt das pleiotrope Zytokin und somit die EMT keine erhöhte Lgr4-Expression.

Daraus resultiert, dass der Lgr4-Rezeptor bei der Tumorstadien im Pankreaskarzinom eine mögliche Rolle spielt, jedoch müssen wir zum jetzigen Zeitpunkt davon ausgehen, dass mit den derzeit zur Verfügung stehenden Materialien und Methoden keine verlässlichen Expressionsanalysen durchgeführt werden können.

Zusammengefasst würde dies bedeuten, dass bei unseren Untersuchungen keine eindeutige Assoziation zwischen einer erhöhten Lgr4-Expression und der Tumorstadien im PDAC in den vorliegenden Ergebnissen detektiert werden konnte, somit bleibt die genaue Rolle des Lgr4-Rezeptors im PDAC zunächst unklar. Es müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die funktionelle Rolle des Lgr4-Rezeptors im PDAC besser verstehen zu können.

8 Summary

The important characteristic of the ductal adenocarcinoma of the pancreas (PDAC) is its extremely aggressive, invasive growth, the high potential for metastasis and until now the inadequate therapeutic options due to a very high chemo- and radiotherapy resistance. These characteristics are also attributed to cancer stem cells, which were also detected and characterized in the PDAC. Due to the already mentioned inadequate therapeutic options and the very nonspecific and especially late symptoms, the prognosis for PDAC diagnosis is extremely poor. As already known, the canonical Wnt/ β -catenin signal transduction pathway plays an essential role for normal cell growth during embryogenesis, differentiation and cell proliferation. R-spondins function as agonists of the Wnt signaling cascade by potentiate a signal through their binding to Lgr-receptors. Deficiencies or dysregulations in the Wnt signaling pathway can lead to malignant degenerations, e.g. colon- or ovariancancer. The aim of this work with the title "**The role of Lgr4 in PDAC: tumor growth, self-renewal and metastatic potential *in vivo***" was to investigate the role of Lgr4 in its role in tumorigenesis in murine to examine pancreatic carcinoma cells.

The results of our investigations by various methods showed that the general detection and localization of the Lgr4-receptor for measuring the expression level was subject to strong fluctuations. Likewise, an expression analysis was carried out in three-dimensional cultures, where it was found that an increased potential for the formation of three-dimensional spheroids does not necessarily lead to an increase in expression of the Lgr4-receptor, but maybe influenced by other factors. We couldn't detect significant differences between Lgr4⁺ and Lgr4⁻ sorted cells in the animal experiments of the Lgr4-receptor on differences in tumor growth or tumor progression. After triggering an EMT by adding the cytokine TGF β , the phenotypic conversion as well as the expressionanalysis were performed and investigated by various methods. According to our results, the pleiotropic cytokine and thus the EMT does not cause increased Lgr4 expressions.

As a result, the Lgr4-receptor plays a potential role in tumor progression in pancreatic carcinoma, but at the present time we must assume that reliable expression analyzes can not be performed with currently available materials and methods.

In summary, this would mean that in our studies no clear association between increased Lgr4 expression and tumorigenicity in the PDAC could be detected in the present results, so the exact role of the Lgr4-receptor in the PDAC initially remains unclear. Further investigations are needed to better understand the functional role of the Lgr4-receptor in the PDAC.

9 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G. Duale Reihe Anatomie Thieme; 2007.
2. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. Physiologie. 5. Auflage ed: Elsevier Urban & Fischer 2008.
3. Putz R, Pabst R. Sobotta - Anatomie des Menschen (Der komplette Atlas in einem Band). 22. Auflage ed: Elsevier Urban & Fischer; 2007.
4. S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom Oktober 2013, Version 1.0 [Available from: https://www.onkopedia.com/de/wissensdatenbank/wissensdatenbank/pankreaskarzinom/AWMFS3_Leitlinie2013.pdf] [09/14/2018].
5. V. EgVfdRK-ludGdeKiDe. Krebs in Deutschland 2007/2008 2012 8. Ausgabe [Available from: <https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?blob=publicationFile>] [08/19/2019].
6. di Magliano MP, Logsdon CD. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1220-9.
7. e.v. GPDzfKudGdeKiD. Krebs in Deutschland für 2013/2014 2017 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?blob=publicationFile] [10/12/18].
8. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 November 2016 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?blob=publicationFile] [08/14/2018].
9. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, et al. Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(3):252-61.
10. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med*. 1993;328(20):1433-7.
11. Luo J, Iwasaki M, Inoue M, Sasazuki S, Otani T, Ye W, et al. Body mass index, physical activity and the risk of pancreatic cancer in relation to smoking status and history of diabetes: a large-scale population-based cohort study in Japan--the JPHC study. *Cancer Causes Control*. 2007;18(6):603-12.
12. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*. 2008;393(4):535-45.
13. Larsson SC, Permert J, Hakansson N, Naslund I, Bergkvist L, Wolk A. Overall obesity, abdominal adiposity, diabetes and cigarette smoking in relation to the risk of pancreatic cancer in two Swedish population-based cohorts. *Br J Cancer*. 2005;93(11):1310-5.
14. Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocchio R, Rota M, et al. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1474-86.
15. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, et al. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*. 2002;51(6):849-52.
16. 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(3):349-58.
17. Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2003;89(3):519-23.
18. Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bernstein L, van den Brandt PA, Calle EE, et al. A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk. *Int J Cancer*. 2011;129(7):1708-17.
19. Czyzyk A, Szczepanik Z. Diabetes mellitus and cancer. *Eur J Intern Med*. 2000;11(5):245-52.
20. Zendejdel K, Nyren O, Ostenson CG, Adami HO, Ekblom A, Ye W. Cancer incidence in patients with type 1 diabetes mellitus: a population-based cohort study in Sweden. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(23):1797-800.

21. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*. 2005;129(2):504-11.
22. Schenk M, Schwartz AG, O'Neal E, Kinnard M, Greenson JK, Fryzek JP, et al. Familial risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(8):640-4.
23. Klein AP. Genetic susceptibility to pancreatic cancer. *Mol Carcinog*. 2012;51(1):14-24.
24. Goldstein AM, Fraser MC, Struewing JP, Hussussian CJ, Ranade K, Zametkin DP, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations. *N Engl J Med*. 1995;333(15):970-4.
25. Breast Cancer Linkage C. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(15):1310-6.
26. van Asperen CJ, Brohet RM, Meijers-Heijboer EJ, Hoogerbrugge N, Verhoef S, Vasen HF, et al. Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *J Med Genet*. 2005;42(9):711-9.
27. Klein AP, Brune KA, Petersen GM, Goggins M, Tersmette AC, Offerhaus GJ, et al. Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds. *Cancer Res*. 2004;64(7):2634-8.
28. Takaori K. Current understanding of precursors to pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2007;14(3):217-23.
29. Koorstra JB, Hustinx SR, Offerhaus GJ, Maitra A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology*. 2008;8(2):110-25.
30. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(5):579-86.
31. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, et al. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 1997;57(9):1731-4.
32. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, et al. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res*. 1994;54(6):1556-60.
33. Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2010;362(17):1605-17.
34. Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE. p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1997;57(11):2140-3.
35. Brunner TB, Cengel KA, Hahn SM, Wu J, Fraker DL, McKenna WG, et al. Pancreatic cancer cell radiation survival and prenyltransferase inhibition: the role of K-Ras. *Cancer Res*. 2005;65(18):8433-41.
36. Morris JPt, Wang SC, Hebrok M. KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(10):683-95.
37. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000;6(8):2969-72.
38. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grutzmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int*. 2014;2014:474905.
39. Kalser MH, Barkin J, MacIntyre JM. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer*. 1985;56(2):397-402.
40. Modolell I, Guarner L, Malagelada JR. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann Oncol*. 1999;10 Suppl 4:82-4.
41. Tsuchiya R, Noda T, Harada N, Miyamoto T, Tomioka T, Yamamoto K, et al. Collective review of small carcinomas of the pancreas. *Ann Surg*. 1986;203(1):77-81.
42. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol*. 2005;7(5):189-97.
43. Helmut Oettle TB, Markus Borner, Gerhard Faber, Rainer Fietkau, Volker Heinemann, Ulf Peter Neumann, Ron Pritzkeleit, Marianne Sinn, Dirk Thomas Waldschmidt, Bernhard Wörmann. Pankreaskarzinom Januar 2018 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/pankreaskarzinom/@@guideline/html/index.html>] [02/17/2018].

44. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K. Diagnosis of pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2006;8(5):337-42.
45. Rickes S, Unkrodt K, Neye H, Ocran KW, Wermke W. Differentiation of pancreatic tumours by conventional ultrasound, unenhanced and echo-enhanced power Doppler sonography. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(11):1313-20.
46. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2004;363(9414):1049-57.
47. Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1039-49.
48. Berger AC, Garcia M, Jr., Hoffman JP, Regine WF, Abrams RA, Safran H, et al. Postresection CA 19-9 predicts overall survival in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant chemoradiation: a prospective validation by RTOG 9704. *J Clin Oncol*. 2008;26(36):5918-22.
49. Herreros-Villanueva M, Gironella M, Castells A, Bujanda L. Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clin Chim Acta*. 2013;418:22-9.
50. AJCC. Manual for staging of cancer. 4th ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company; 1992.
51. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, et al. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer*. 2007;110(4):738-44.
52. Han SS, Park SJ, Kim SH, Cho SY, Kim YK, Kim TH, et al. Clinical significance of portal-superior mesenteric vein resection in pancreatoduodenectomy for pancreatic head cancer. *Pancreas*. 2012;41(1):102-6.
53. Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Buchler MW. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*. 2004;91(5):586-94.
54. 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(11):1021-8.
55. Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg*. 1996;223(3):273-9.
56. Trede M, Saeger HD, Schwall G, Rumstadt B. Resection of pancreatic cancer--surgical achievements. *Langenbecks Arch Surg*. 1998;383(2):121-8.
57. Pliarchopoulou K, Pectasides D. Pancreatic cancer: current and future treatment strategies. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(5):431-6.
58. Strobel O, Berens V, Hinz U, Hartwig W, Hackert T, Bergmann F, et al. Resection after neoadjuvant therapy for locally advanced, "unresectable" pancreatic cancer. *Surgery*. 2012;152(3 Suppl 1):S33-42.
59. Konstantinidis IT, Warshaw AL, Allen JN, Blaszkowsky LS, Castillo CF, Deshpande V, et al. Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a "true" R0 resection? *Ann Surg*. 2013;257(4):731-6.
60. Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*. 2000;4(6):567-79.
61. Muller MW, Friess H, Kleeff J, Dahmen R, Wagner M, Hinz U, et al. Is there still a role for total pancreatectomy? *Ann Surg*. 2007;246(6):966-74; discussion 74-5.
62. Paulson AS, Tran Cao HS, Tempero MA, Lowy AM. Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013;144(6):1316-26.
63. Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, Almond J, Link K, Beger H, et al. Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001;358(9293):1576-85.
64. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*. 2013;310(14):1473-81.

65. 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. *JAMA*. 2007;297(3):267-77.
66. 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. *JAMA*. 2010;304(10):1073-81.
67. Burris HA, 3rd, 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(6):2403-13.
68. Gillen S, Schuster T, Meyer Zum Buschenfelde 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(4):e1000267.
69. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1817-25.
70. 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(18):1691-703.
71. König HE, Liebich H-G. Anatomie der Haussäugetiere. 5. Auflage ed: Schattauer; 2012.
72. McGavin MD, Zachary JF. Pathologie der Haustiere Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie. 1. Auflage ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2011.
73. Grandt L, Roethig A, Schroeder S, Koehler K, Langenstein J, Thom N, et al. Feline paraneoplastic alopecia associated with metastasising intestinal carcinoma. *jfms open reports*. 2015;1-5.
74. Seaman RL. Exocrine pancreatic neoplasia in the cat: A case series. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2004;40(238-245).
75. Priester WA. Data from Eleven United States and Canadian Colleges of Veterinary Medicine on Pancreatic carcinoma in Domestic Animals. *Cancer Research*. 1974;34(1372-1375).
76. Rowlatt U. Spontaneous epithelial tumours of the pancreas of mammals. *Br J Cancer*. 1967;21(1):82-107.
77. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003;63(6):1256-72.
78. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(9):639-50.
79. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):79-94.
80. Rask-Andersen M, Almen MS, Schioth HB. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(8):579-90.
81. Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(4):339-57.
82. Tang XL, Wang Y, Li DL, Luo J, Liu MY. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(3):363-71.
83. Kato S, Matsubara M, Matsuo T, Mohri Y, Kazama I, Hatano R, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;104(2):e63-75.
84. Barker N, Clevers H. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1681-96.
85. Carmon KS, Gong X, Lin Q, Thomas A, Liu Q. R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11452-7.
86. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, Huang YL, Kazanskaya O, Ingelfinger D, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep*. 2011;12(10):1055-61.

87. Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell*. 2004;7(4):525-34.
88. Kim KA, Zhao J, Andarmani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, et al. R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. *Cell Cycle*. 2006;5(1):23-6.
89. Yoon JK, Lee JS. Cellular signaling and biological functions of R-spondins. *Cell Signal*. 2012;24(2):369-77.
90. Hsu SY, Liang SG, Hsueh AJ. Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. *Mol Endocrinol*. 1998;12(12):1830-45.
91. Nakata S, Phillips E, Goidts V. Emerging role for leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors LGR5 and LGR4 in cancer stem cells. *Cancer Manag Res*. 2014;6:171-80.
92. Garcia MI. LGRs receptors as peculiar GPCRs involved in cancer. *J Stem Cell Res Med*. 2017;2((1):1-9).
93. Van Schoore G, Mendive F, Pochet R, Vassart G. Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse. *Histochem Cell Biol*. 2005;124(1):35-50.
94. Kinzel B, Pikiolk M, Orsini V, Sprunger J, Isken A, Zietzling S, et al. Functional roles of *Lgr4* and *Lgr5* in embryonic gut, kidney and skin development in mice. *Dev Biol*. 2014;390(2):181-90.
95. Mazerbourg S, Bouley DM, Sudo S, Klein CA, Zhang JV, Kawamura K, et al. Leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor 4 null mice exhibit intrauterine growth retardation associated with embryonic and perinatal lethality. *Mol Endocrinol*. 2004;18(9):2241-54.
96. Yamakami Y, Kohashi K, Oyama K, Mohri Y, Hidema S, Nishimori K. LGR4 is required for sequential molar development. *Biochem Biophys Rep*. 2016;8:174-83.
97. Mohri Y, Kato S, Umezawa A, Okuyama R, Nishimori K. Impaired hair placode formation with reduced expression of hair follicle-related genes in mice lacking *Lgr4*. *Dev Dyn*. 2008;237(8):2235-42.
98. Kato S, Mohri Y, Matsuo T, Ogawa E, Umezawa A, Okuyama R, et al. Eye-open at birth phenotype with reduced keratinocyte motility in LGR4 null mice. *FEBS Lett*. 2007;581(24):4685-90.
99. Weng J, Luo J, Cheng X, Jin C, Zhou X, Qu J, et al. Deletion of G protein-coupled receptor 48 leads to ocular anterior segment dysgenesis (ASD) through down-regulation of *Pitx2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(16):6081-6.
100. Mustata RC, Van Loy T, Lefort A, Libert F, Strollo S, Vassart G, et al. *Lgr4* is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells *ex vivo*. *EMBO Rep*. 2011;12(6):558-64.
101. Yamashita R, Takegawa Y, Sakumoto M, Nakahara M, Kawazu H, Hoshii T, et al. Defective development of the gall bladder and cystic duct in *Lgr4*-hypomorphic mice. *Dev Dyn*. 2009;238(4):993-1000.
102. Mendive F, Laurent P, Van Schoore G, Skarnes W, Pochet R, Vassart G. Defective postnatal development of the male reproductive tract in LGR4 knockout mice. *Dev Biol*. 2006;290(2):421-34.
103. Mohri Y, Oyama K, Akamatsu A, Kato S, Nishimori K. *Lgr4*-deficient mice showed premature differentiation of ureteric bud with reduced expression of Wnt effector *Lef1* and *Gata3*. *Dev Dyn*. 2011;240(6):1626-34.
104. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005;15(1):28-32.
105. King TD, Suto MJ, Li Y. The Wnt/beta-catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer. *J Cell Biochem*. 2012;113(1):13-8.
106. Nusse R, Lim X. Human genetic diseases and Wnt signaling components 2018 [Available from: http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/human_genetic_diseases] [09/07/2018].
107. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol*. 1998;8(10):573-81.
108. Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol*. 2005;25(20):9063-72.

109. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn*. 2010;239(1):34-44.
110. Yanagawa S, Matsuda Y, Lee JS, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, et al. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J*. 2002;21(7):1733-42.
111. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT. The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*. 1996;10(12):1443-54.
112. Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, et al. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem*. 1998;273(18):10823-6.
113. Polakis P. Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol*. 2002;12(14):R499-R501.
114. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*. 1997;16(13):3797-804.
115. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004;303(5663):1483-7.
116. Liu C, Kato Y, Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6273-8.
117. de Sousa EM, Vermeulen L, Richel D, Medema JP. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):647-53.
118. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(7):468-77.
119. Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science*. 2000;287(5458):1606-9.
120. Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, et al. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*. 1998;395(6702):608-12.
121. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*. 1996;382(6588):225-30.
122. Hsieh JC, Rattner A, Smallwood PM, Nathans J. Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3546-51.
123. Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell*. 2003;12(5):1251-60.
124. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*. 2001;7(4):801-9.
125. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997;11(24):3286-305.
126. Cruciat CM. Casein kinase 1 and Wnt/beta-catenin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;31:46-55.
127. Ilmer M, Boiles AR, Regel I, Yokoi K, Michalski CW, Wistuba, II, et al. RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res*. 2015;75(9):1883-96.
128. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol*. 2004;32(7):585-98.
129. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74.
130. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88(3):287-98.
131. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
132. Clevers H. Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nat Genet*. 2005;37(10):1027-8.

133. 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(3):313-23.
134. Sabban S. Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high- affinity FcεRI receptor: The University of Sheffield; 2011.
135. Inc. TFS. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual: Thermo Fisher Scientific Inc.; 2009 [Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>] [03/04/2018].
136. AppliedBiosystems. Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System 06/2010 [Available from: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_048139.pdf] [11/08/18].
137. Biosciences B. BD FACSAria™ III User's Guide 2012 [Available from: https://www.flowcytometry.bmc.med.uni-muenchen.de/best-practice-faq/acquisition/facsaria_user_guide.pdf] [12/03/2018].
138. Krebs AM, Mitschke J, Lasierra Losada M, Schmalhofer O, Boerries M, Busch H, et al. The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nat Cell Biol*. 2017;19(5):518-29.
139. Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(14):5126-30.
140. Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, et al. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res*. 2001;61(10):4222-8.
141. Satoh K, Hamada S, Shimosegawa T. Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterol*. 2015;50:140-6.
142. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(5):548-58.
143. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442-54.
144. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(6):740-6.
145. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):744-9.
146. Yue Z, Yuan Z, Zeng L, Wang Y, Lai L, Li J, et al. LGR4 modulates breast cancer initiation, metastasis, and cancer stem cells. *FASEB J*. 2018;32(5):2422-37.
147. Snippert HJ, Haegerbarth A, Kasper M, Jaks V, van Es JH, Barker N, et al. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science*. 2010;327(5971):1385-9.
148. Callihan P, Mumaw J, Machacek DW, Stice SL, Hooks SB. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation by G protein coupled receptors. *Pharmacol Ther*. 2011;129(3):290-306.
149. Luo W, Tan P, Rodriguez M, He L, Tan K, Zeng L, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4 (Lgr4) is necessary for prostate cancer metastasis via epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2017;292(37):15525-37.
150. Chai JY, Modak C, Mouazzen W, Narvaez R, Pham J. Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *Biosci Trends*. 2010;4(3):130-42.
151. Wang Y, Dong J, Li D, Lai L, Siwko S, Li Y, et al. Lgr4 regulates mammary gland development and stem cell activity through the pluripotency transcription factor Sox2. *Stem Cells*. 2013;31(9):1921-31.
152. Halpern B, Pejsachowicz B, Febvre HL, Barski G. Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells. *Nature*. 1966;209(5019):157-9.
153. Kong D, Li Y, Wang Z, Sarkar FH. Cancer Stem Cells and Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Phenotypic Cells: Are They Cousins or Twins? *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):716-29.
154. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.

155. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008;3(8):e2888.
156. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(5-6):396-403.
157. Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev*. 1996;10(19):2462-77.
158. Shipley GD, Pittelkow MR, Wille JJ, Jr., Scott RE, Moses HL. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res*. 1986;46(4 Pt 2):2068-71.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Dorsalansicht der anatomischen Lage des Pankreas, modifizierte Abbildung [3], mit freundlicher Genehmigung des ELSEVIER Verlag.....	13
Abbildung 2 Tumorprogressionsmodell, modifizierte Abbildung [36], mit freundlicher Genehmigung der wissenschaftlichen Springer Nature Verlagsgruppe	18
Abbildung 3 Therapiestrategien beim PDAC.....	21
Abbildung 4 Aufbau des Lgr4-Rezeptors, modifizierte Abbildung [92], mit freundlicher Genehmigung von Frau M. I. Garcia, Ph.D	27
Abbildung 5 Übersicht des kanonischen Wnt-Signalwegs, modifizierte Abbildung [126], mit freundlicher Genehmigung des ELSEVIER Verlag.....	30
Abbildung 6 Zellteilungsmechanismen der Stammzellen, modifizierte Abbildung [128], mit freundlicher Genehmigung von Herr J. Cai, Ph.D	31
Abbildung 7 Prinzip eines Durchflusszytometers; modifizierte Abbildung [134], mit freundlicher Genehmigung von Frau S. Sabban, Ph.D	53
Abbildung 8 Schematischer Aufbau einer Blotzelle	60
Abbildung 9 Dual Color Proteinstandard, mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad.....	61
Abbildung 10 stabiler Tropfenabrisspunkt und wenig Satellitenbildung, mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. rer. nat. Uwe Speck Applikationsspezialist Sorter übernommen (BD Biosciences)	72
Abbildung 11 Aufbau des BD FACS Aria III [137]	72
Abbildung 12 Sorting Prinzip Abbildung, mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. rer. nat. Uwe Speck Applikationsspezialist Sorter übernommen (BD Biosciences).....	73
Abbildung 13 Injektionsschema der s.c. Injektionen.....	76
Abbildung 14 Überlagerung der Histogramme der Isotypenkontrollen und extrazellulär gefärbter Zellen ...	82
Abbildung 15 lichtmikroskopische Bilder der vier KPC/KPCZ Zelllinien.....	83
Abbildung 16 Gating-Strategie für extrazelluläres Lgr4	85
Abbildung 17 Repräsentative Histogramme aus der FACS-Analyse der extrazellulären Lgr4-Expression	86
Abbildung 18 Vergleich der extrazellulären Lgr4-Expressionen in den KPC/KPCZ Zelllinien.....	86
Abbildung 19 Gating-Strategie intrazelluläres Lgr4.....	87
Abbildung 20 Repräsentative Histogramme aus der FACS-Analyse der intrazellulären Lgr4-Expression	88
Abbildung 21 Vergleich der intrazellulären Lgr4-Expressionen in den KPC/KPCZ Zelllinien	89
Abbildung 22 Durchflusszytometrische-Analyse alte Passage vs. neue Passage KPC 661	90
Abbildung 23 Analyse mit dem Durchflusszytometer bei Lösung der Zellen mit Trypsin und Zellschaber.....	91
Abbildung 24 Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahme multizellulärer Tumoraggregate der KPC 550 Zelllinie	92
Abbildung 25 extrazelluläre Lgr4-Expression in Sphäroiden der KPC/KPCZ.....	92
Abbildung 26 Western Blot zur Messung der Lgr4-Expression in KPC/KPCZ und deren Sphäroiden.....	93
Abbildung 27 Analyse des Western Blot der KPC/KPCZ	94
Abbildung 28 Vergleich der Lgr4-Expression in KPC/KPCZ und deren Sphäroide	95
Abbildung 29 Vergleich der <i>Lgr4</i> mRNA-Expression in KPC/KPCZ und deren Sphäroide	96
Abbildung 30 Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz Lgr4-gefärbter Zellen.....	97
Abbildung 31 Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenz CDH-1 gefärbte Zellen	99
Abbildung 32 Lebend-Tot Versuch	101
Abbildung 33 Gating-Strategie beim Zellsorting	102
Abbildung 34 Repräsentatives Bild der Lgr4 ⁺ - und Lgr4 ⁻ -Zellen beim Sorting.....	103
Abbildung 35 Overlay der Histogramme KPC 661 beim Sorting	103

Abbildung 36 Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen multizellulärer Tumoraggregate sortierter KPC 661-Zellen	104
Abbildung 37 Vergleich der Anzahl der Sphäroide pro 1000 eingesäte Zellen	105
Abbildung 38 Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Lgr4 ⁺ und Lgr4 ⁻ -sortierten Zellen im SFA zur Unterscheidung der Morphologie.....	105
Abbildung 39 Aufnahmen subkutaner Tumore.....	106
Abbildung 40 Repräsentative Aufnahme thorakaler Tumorentnahme.....	107
Abbildung 41 Wachstumskurve der subkutanen Tumore.....	108
Abbildung 42 HE-Färbungen der subkutanen Tumore.....	108
Abbildung 43 Aufnahme orthotoper Tumore	111
Abbildung 44 Lgr4-Expression in kultivierten Tumoren	112
Abbildung 45 Lichtmikroskopische Aufnahme stimulierter KPC 661	113
Abbildung 46 Lichtmikroskopische Aufnahme stimulierter KPC 438	113
Abbildung 47 Extrazelluläre Lgr4-Expression in stimulierten KPC 661 und KPC 438.....	114
Abbildung 48 Western Blot der stimulierten KPC 661 und KPC 438	115
Abbildung 49 densitometrische Analyse der oberen Banden 138kDa.....	116
Abbildung 50 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 104kDa.....	116
Abbildung 51 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 138kDa in KPC 661 und KPC 438.....	117
Abbildung 52 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 104kDa in KPC 661 und KPC 438.....	118
Abbildung 53 densitometrische Analyse der Banden auf Höhe von 138kDa und 104kDa.....	118
Abbildung 54 mRNA-Expression von Lgr4 in KPC 661 und KPC 438.....	119
Abbildung 55 statistische Analyse der KPC 661 und KPC 438	120

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Tumorstaging mit TNM-Klassifikation [50], * [51], [33].....	21
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 3: Laborgeräte	35
Tabelle 4: Murine Zellkultur	38
Tabelle 5: Lösungen für das Durchflusszytometer	38
Tabelle 6: Lösungen und Chemikalien für den Western Blot	39
Tabelle 7: Lösungen für die Immunfluoreszenz	40
Tabelle 8: Lösungen für die PCR	40
Tabelle 9: Lösungen für die Hämatoxylin Eosin Färbung	40
Tabelle 10: Assays und Kits	41
Tabelle 11: Rekombinante Proteine und Inhibitoren	41
Tabelle 12: Antikörper für die Durchflusszytometrie	42
Tabelle 13: Antikörper für den Western Blot	43
Tabelle 14: Antikörper für die Immunfluoreszenz	43
Tabelle 15: Primer für die PCR	43
Tabelle 16: OP-Material	44
Tabelle 17: Pharmaka	45
Tabelle 18: Software	46
Tabelle 19: Herstellung des Nährmediums	48
Tabelle 20: Herstellung des Sphäroidmediums	51
Tabelle 21: Rezeptur des FACS-Puffer	55
Tabelle 22: Herstellung der Reagenzien für den Western Blot	57
Tabelle 23: Rechnung für die Probenmenge	58
Tabelle 24: Herstellung der Gele	59
Tabelle 25: Verdünnungen der Antikörper	61
Tabelle 26: Rezeptur zur Fixierung der Zellen der Immunfluoreszenz	63
Tabelle 27: Rezeptur zur Permeabilisierung der Membran bei der Immunfluoreszenz	63
Tabelle 28: iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad	67
Tabelle 29: SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit von ThermoFisher Scientific	68
Tabelle 30: Programmierung Thermocycler für iScript cDNA Synthesis Kit	68
Tabelle 31: Programmierung Thermocycler für SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	69
Tabelle 32: Pipettierschema der PCR-Reaktionsplatte	69
Tabelle 33: Zyklusbedingungen der Echtzeit-PCR	71
Tabelle 34: Herstellung des SFA-Mediums	74
Tabelle 35: Herstellung der Eosin-Lösung	80
Tabelle 36 Lokalisierung und Quantifizierung der Lgr4-Expression	98
Tabelle 37 Lokalisierung und Quantifizierung der CDH-1 Expression	100
Tabelle 38 Übersicht Tumorwachstum und Metastasierung orthotoper Tumore	110

12 Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit nie das Werk einer einzelnen Person ist, möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben und sie damit überhaupt erst möglich gemacht haben.

- Mein besonderer Dank geht an **Herrn Prof. Dr. Alexandr Bazhin** und **Dr. Matthias Ilmer** auf deren Anregung hin dieses Dissertationsthema entstanden ist. Ich bedanke mich vor allem für ihren unentwegten Einsatz, die fachkundige Betreuung und die Hilfe bei der Darstellung meiner wissenschaftlichen Ergebnisse. Ich bedanke mich auch für Ihre immer vorhandene Ansprechbarkeit und Beratung, sowie das kritische Korrekturlesen der Dissertation. Ich bedanke mich ebenfalls für ihre sympathische Art und dafür, dass Sie beide jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten, wenn meine Versuche mal wieder nicht geklappt haben, wie ich es mir erwünscht habe.
- Mein Dank gilt ebenso **Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel** für die selbstlose Übernahme der Arbeit, sowie die professionelle und freundliche Unterstützung durch hilfreiche Ratschläge und Anregungen.
- Vielen Dank auch an **Herrn Marc Stemmler Ph.D.** aus dem Departement der experimentellen Medizin I der Universität Erlangen, welcher mir freundlicherweise die KPC/KPCZ Pankreaskarzinomzelllinien zur Verfügung gestellt hat.
- **Herr Dr. Michael Hristov** danke ich für die Bereitstellung und die Hilfe bei der Durchführung meiner Sorting-Versuche, sowie für seine Hilfsbereitschaft und Ansprechbarkeit bei Komplikationen.
- **Sevdije Isar-Amachal, Beatrice Rauter, Michaela Svihla** und **Tommi Bauer** Danke für eure uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei meinen Tätigkeiten im Labor. Insbesondere möchte ich mich bei Sevdije Isar-Amachal bedanken für ihre Motivation, Ansprechbarkeit, Hilfsbereitschaft und das Anbringen von Verbesserungsvorschlägen bei der Durchführung von molekularbiologischen Methoden. Michaela Svihla danke ich für die Einarbeitung und Hilfe beim FACS sowie für ihre Einarbeitung und Ratschläge bei der Zellkultur.
- Vielen Dank an das gesamte tolle **Laborteam**, die herzliche Aufnahme und unsere witzigen Runden am Mittagstisch. Vor allem danke ich Beatrice Rauter und Eva Routil für die moralische Unterstützung und dass ihr stets ein offenes Ohr für mich hattet. Ihr seid toll und ich freue mich, dass eine so schöne Freundschaft entstanden ist.
- Nicht zuletzt danke ich meiner **Familie**, dass ihr mich immer wieder motiviert und mich bei dieser Arbeit unterstützt und gestärkt habt. Ihr habt nie an mir gezweifelt und Euch über jeden meiner Erfolge mindestens genauso gefreut wie ich.

Besonders danke ich auch meiner Mama, **Kristina Glöckl**, die immer für mich da ist und durch die mein Tiermedizinstudium erst möglich wurde. Danke, dass ich mich zu hundert Prozent auf dich verlassen kann, du mich auf all meinen Wegen unterstützt, mir immer Mut zusprichst, mich immer wieder aufbaust und somit maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hast. Ich danke auch meinem Bruder, **Moritz Frühwald**, der immer für mich da ist, stets an mich glaubt und mich immer wieder aufbaut und hilfreiche Ratschläge gibt.

- **Thomas Adam**, dir als mein Freund gilt ebenfalls besonderer Dank. Danke, dass du mich immer unterstützt, mir stets Rückhalt gibst, mich an schlechten Tagen wieder aufmunterst und immer an mich glaubst und mir den Mut gibst, weiterzumachen. Ich bin sehr glücklich und vor allem dankbar, mit dir an meiner Seite, diesen Lebensabschnitt gemeinsam durchlebt zu haben und ich freue mich auf weitere tolle Zeiten als Tierärzte. Danke, dass ich immer auf deine Hilfe zählen kann und du all meine Launen, Verzweiflung, Höhen und Tiefen während dieser Arbeit immer mit Fassung und großer Geduld ertragen hast, vor allem aber auch ein großes Dankeschön für deine Hilfe bei meinen Versuchen.
- Danke auch an meine liebe **Familie Adam**, welche mich während den stressigen Tagen der Dissertation und dem Studium immer wieder aufgebaut und unterstützt haben und mir stets ein liebevolles, zweites zu Hause gaben und auch immer noch geben.
- Danke auch an meinen Onkel **Martin Bückle**, der mir bei computertechnischen Fragen immer geholfen hat. Auch meinen Mädels, **Katrin Varga** vielen Dank für deine Unterstützung beim Bearbeiten des Layouts dieser Arbeit und **Kerstin Schempp**, dass du immer ein offenes Ohr und hilfreiche Ratschläge für mich parat hast und vor allem danke ich dir als meine persönliche Motivationstrainerin.