

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

Untersuchungen zur Rolle von potentiellen Krebsstammzellen bei der Chemotherapie- Resistenz des Pankreaskarzinoms

Andrea Renner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Bauer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. A. Schnieke, Ph.D.
2. apl. Prof. Dr. J. Adamski

Die Dissertation wurde am 12.04.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.09.2012 angenommen.

Meinen Eltern und meinem Ehemann

Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Zusammenfassung	2
3	Einleitung	3
3.1	Das Pankreaskarzinom	3
3.1.1	Epidemiologie	3
3.1.2	Molekulare Mechanismen	4
3.1.3	Chemotherapie	5
3.1.4	Chemotherapie-Resistenz	9
3.2	Krebsstammzellen	10
3.2.1	Überblick	10
3.2.2	Das Krebsstammzellmodell	11
3.2.3	Ursprung einer Krebsstammzelle	13
3.2.4	Solide Krebsstammzellmarker	15
3.2.5	ABCG2 und der Side-Population Phänotyp	16
3.3	Zielsetzung der Arbeit	19
4	Material	20
4.1	Chemikalien	20
4.2	Standards und Kits	22
4.3	Antikörper	22
4.4	Molekularbiologische Reagenzien	23
4.5	Oligodesoxynukleotide	24
4.6	Lösungen und Puffer	24
4.6.1	Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Westernblot	24
4.6.2	Lösungen und Puffer für die Immunhistologie	25
4.6.3	Lösungen für die Zellkultur	26
4.7	Medien und Zusätze für die Zellkultur	27
4.8	Zelllinien	27
4.8.1	Auswahlkriterien für die Zelllinien AsPC-1 und L3.6pl	27
4.8.2	Humane Pankreasadenokarzinomzelllinien FG und L3.6pl	28
4.8.3	Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie AsPC-1	29
4.8.4	Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie MIA PaCa-2	29
4.8.5	Magenkarzinomzelllinie GC38	29

4.9	Patientenproben	30
4.10	BALB/c nu/nu Mäuse	30
4.11	Geräte	30
4.12	Verbrauchsmaterialien	33
4.13	Software	34
5	Methoden	36
5.1	Zellkultur	36
5.1.1	Kultivation der Zellen	36
5.1.2	Einfrieren der Zellen	36
5.1.3	Auftauen der Zellen	37
5.1.4	Erstellen Chemotherapie-resistenter Zellen	37
5.1.5	IC ₅₀ Bestimmung mittels Zell-Proliferationsassay	37
5.1.6	Behandlung mit 5-FU, Rapamycin und Cyclopamin	37
5.1.7	Behandlung mit Curcumin	38
5.2	Durchflusszytometrie	38
5.2.1	Hoechst-Färbung und Analyse	38
5.2.2	Antikörper-Färbungen und Analyse	38
5.3	Westernblot	39
5.3.1	Herstellung von Proteinlysaten	39
5.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
5.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese PAGE	39
5.3.4	Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran	40
5.3.5	Analyse der Proteinexpression	41
5.3.6	Strippen der PVDF Membran	41
5.4	Immunhistologie	42
5.4.1	Asservierung von Gewebeproben in Paraffinwachs	42
5.4.2	Schneiden von Paraffinblöcken	42
5.4.3	Hämalaun- und Eosin-Färbung	42
5.4.4	Ki-67 Zellproliferations-Färbung	43
5.5	Orthotopes Pankreastumormodell	43
5.6	Molekularbiologie	45
5.6.1	Mycoplasmennachweis	45
5.6.2	Affymetrix Genchip Analyse	46
5.7	Statistik	47
6	Ergebnisse	48

6.1	Identifizierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom	48
6.2	Charakterisierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom	49
6.2.1	Das Potential der Side-Population zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung	49
6.2.2	Das Potential der Side-Population zur Tumorinduktion im orthotopen Pankreastumormodell	50
6.2.3	Ansprechen von Side-Population Zellen auf Stammzell-Signalweg-Inhibitoren in Kombination mit 5-FU	59
6.2.4	Analyse von Side-Population- und Non-Side-Population Zellen auf mRNA-Ebene mittels Affymetrix Microarray	61
6.2.5	Analyse von Side-Population- und Non-Side-Population Zellen auf Proteinebene	65
6.3	Chemotherapie-Resistenz und die Rolle von Krebsstammzellen	66
6.3.1	Erstellung von Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Zellen – Auswirkungen auf den Side-Population/ABCG2-Gehalt	66
6.3.2	Auswirkungen der Chemotherapie-Resistenz auf den Gehalt weiterer potentieller Krebsstammzellmarker	70
6.4	Expression des Proteins AKR1B10 in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas von Patienten	73
6.5	Curcuminoide als Therapeutika	74
7	<i>Diskussion</i>	78
7.1	Identifizierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom	78
7.1.1	Hoechst 33342 als Krebsstammzellmarker	78
7.1.2	Prozentualer Anteil der Side-Population	79
7.2	Das Potential der Side-Population zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung	80
7.3	Charakterisierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom	81
7.3.1	Das Potential der Side-Population zur Tumorinduktion im orthotopen Pankreastumormodell	81
7.3.2	Analyse von SP- und NSP-Zellen der Zelllinie L3.6pl auf mRNA-Ebene mittels Affymetrix Microarray	83
7.4	Chemotherapie-Resistenz und die Rolle von Krebsstammzellen	88
7.5	Expression des Proteins AKR1B10 in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas von Patienten	91
7.6	Curcuminoide als Therapeutika	91
7.7	Ursprung einer Krebsstammzelle beim Pankreas	92
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	94

9	<i>Anhang</i> _____	114
9.1	Abkürzungsverzeichnis _____	114
9.2	Abbildungsverzeichnis _____	118
9.3	Tabellenverzeichnis _____	120
9.4	Danksagung _____	121

1 Abstract

The role of tumor initiating cells in chemotherapy resistance of pancreatic cancer has not been analysed in depth. In the present study, we identified and characterized putative cancer stem cells (CSCs) within the human pancreatic adenocarcinoma cell lines AsPC-1, L3.6pl and L3.6pl_{G res} and L3.6pl_{5-FU res}, chemotherapy resistant variants of L3.6pl.

Potential cancer stem cells were identified and isolated using high speed flow cell sorting following Hoechst 33342 dye staining. Isolated side-population- (SP) and non-side-population cells (NSP), as well as unsorted cells, were orthotopically xenografted into the pancreas of nude mice. *In vitro* analysis was performed using microarray hybridization, FACS-analysis and westernblot.

Flow cytometry identified a distinct proportion of SP-cells versus the main population of NSP-cells. *In vivo* SP-cells presented as highly tumorigenic and metastatic as compared to NSP-cells. Further analysis of the cell line L3.6pl by microarray hybridization showed differentially regulated genes between SP- and NSP-cells, associated with chemotherapy resistance, tumorigenesis, differentiation and metastasis. SP-cells possessed a CD133-negative and ABCG2-positive phenotype. With increasing concentration of gemcitabine the amount of SP-, CD24- and ABCG2-positive cells was significantly enriched, whereas with escalating doses of 5-FU the percentage of SP-cells was significantly reduced, ABCG2 content unaltered and CD24-positive cells increasing. Neither gemcitabine nor 5-FU influenced the percentage of CD133-positive cells. Expression of AKR1B10, upregulated in SP-cells, was highly enriched in gemcitabine resistant cells and patient tumor samples but diminished in 5-FU resistant cells. Curcuma, a mixture of natural curcuminoids, derived from curcuma longa, was able to reduce SP content, ABCG2- and AKR1B10 expression in L3.6pl_{G res} cells.

In conclusion, SP-cells represent a cellular subpopulation with stem cell properties, which is associated to gemcitabine- but not to 5-FU resistance in pancreatic cancer. AKR1B10 and ABCG2 are two relevant genes preferentially upregulated in SP-cells. AKR1B10 could display a potential predictor for gemcitabine resistance and support individualized chemotherapy approaches as treatment for pancreatic cancer in the clinic.

2 Zusammenfassung

Welche Rolle Krebsstammzellen bei der Chemotherapie-Resistenz des Pankreaskarzinoms spielen, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. In dieser Arbeit wurden potentielle Krebsstammzellen in den humanen, Pankreasadenokarzinomzelllinien AsPC-1, L3.6pl und den Chemotherapie-resistenten Varianten L3.6pl_{G res} und L3.6pl_{5-FU res} identifiziert und charakterisiert.

Als Krebsstammzellmarker diente der Farbstoff Hoechst 33342, welcher es ermöglichte, potentielle Krebsstammzellen mittels Durchflusszytometrie zu identifizieren und zu isolieren. *In vivo* wurden Side-Population (SP) Zellen, Non-Side-Population (NSP) Zellen und unsortierte Zellen anhand eines orthotopen Pankreastumormodells in athymischen Mäusen untersucht. *In vitro* Analysen erfolgten durch Microarray Hybridisierung, Durchflusszytometrie und Westernblot.

Die Durchflusszytometrie zeigte, dass die untersuchten Zellen einen bestimmten Anteil an SP-Zellen gegenüber NSP-Zellen aufweisen. *In vivo* präsentierten sich SP-Zellen im Vergleich zu NSP-Zellen als hoch tumorigen mit einem starken Metastasierungspotential. Weitere Untersuchungen der Zelllinie L3.6pl mittels eines Affymetrix Genchips zeigten in der SP-Fraktion eine Hochregulation von Genen, welche im Zusammenhang mit Chemotherapie-Resistenz, Tumorigenese, Differenzierung und Metastasierung stehen. Diese SP-Zellen zeigten einen CD133 negativen und ABCG2 positiven Phänotyp. Mit steigender Konzentration an Gemcitabin stieg der Gehalt an SP-Zellen, CD24- und ABCG2 positiven Zellen signifikant an, während mit Zunahme der Dosis an 5-FU der Prozentsatz an SP-Zellen signifikant sank, der ABCG2-Anteil unverändert und der CD24-Gehalt erhöht war. Weder Gemcitabin noch 5-FU zeigten eine Auswirkung auf den Anteil an CD133 positiven Zellen. Die Expression von AKR1B10, ein in der SP-Fraktion deutlich überexprimiertes Gen, war in Gemcitabin-resistenten Zellen sowie in Tumorgewebe des Pankreas von Patienten stark erhöht, in 5-FU-resistenten Zellen jedoch vermindert. Curcuma, ein aus der javanischen Gelbwurz isoliertes Gemisch aus Curcuminoiden, führte zu einer Reduktion des SP-Anteils, der ABCG2- und AKR1B10 Expression in L3.6pl_{G res} Zellen.

Folglich repräsentieren SP-Zellen eine Subpopulation von Zellen mit Stammzeleigenschaften, die mit Gemcitabin-Resistenz beim Pankreaskarzinom assoziiert werden kann. AKR1B10 und ABCG2 stellen zwei präferentiell hochregulierte Gene der Side-Population dar. Ersteres zeigte ein mögliches Potential als Prädiktor für eine Gemcitabin-Resistenz und könnte in der Klinik bei individueller Pankreas-Chemotherapie zum Einsatz kommen.

3 Einleitung

3.1 Das Pankreaskarzinom

3.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom stellt mit einer europäischen und nordamerikanischen Neuerkrankungsrate von 10 zu 100.000 (welche annähernd der seit 20 Jahren konstanten Sterbeziffer gleicht) eine der gefährlichsten Krebsarten dar. In den westlichen Ländern besetzt das Pankreaskarzinom den 5. Platz der durch Krebs verursachten Tode. Die durchschnittliche Überlebensrate ist äußerst gering und beträgt 3 bis 6 Monate, 10 % der Patienten überleben 12 Monate und weniger als 3 % 5 Jahre^[1, 2]. Dem liegen die Aggressivität dieser Krebsart und eine zu späte Diagnosestellung aufgrund mangelnder Feststellungsverfahren, der schlechten Zugänglichkeit und fehlender bzw. unspezifischer Symptome zu Grunde. Meist sind die Patienten im noch resektierbaren Zustand symptomfrei. Erste Anzeichen können allgemeines Unwohlsein, Übelkeit oder Appetitlosigkeit sein. Schmerzfreie Gelbsucht weisen etwa 50 % der operablen Patienten auf. Schmerz ist das häufigste Symptom und tritt bei 80 % der nicht mehr operablen und bereits metastasierten Patienten auf. Dieser macht sich verstärkt am Rücken und abdominal bemerkbar^[3]. Die operative R₀-Resektion stellt momentan die einzige potentielle kurative Behandlung dar^[4], da das Pankreaskarzinom sowohl gegen Bestrahlung als auch gegen Chemotherapien weitgehend resistent ist. Des Weiteren zeigt es in der Frühphase einen angiogenen Phänotyp und eine starke Metastasierung. Aufgrund der fortgeschrittenen Krankheit oder Komorbidität sind lediglich 15 % – 20 % der Tumore resektabel^[5]. Deshalb erfolgt die Therapie in den meisten Fällen palliativ. Dazu zählen Bypassoperationen und das Legen von Endoprothesen, um eine Linderung der Schmerzen und der obstruktiven Gelbsucht herbeizuführen, sowie die Verabreichung von Analgetika^[6], Bestrahlung oder diverse Chemotherapien. 90 % der pankreatischen Neoplasmen entstehen aus dem exokrinen Duktalsystem und sind histologisch ein Adenokarzinom, wovon 70 % im Kopfbereich, 20 % im Korpusbereich und 10 % in der Kauda des Pankreas lokalisiert sind^[4]. Gesicherte Risikofaktoren stellen Nikotinabusus und chronische Pankreatitis dar, ebenso das Alter oder eine positive Familiengeschichte. Auch starker Alkoholmissbrauch, Ernährung und ein hoher Bodymaßindex deuten auf ein erhöhtes Risiko hin, haben aber eine vergleichsweise geringere Bedeutung^[7-13].

Trotz der Fortschritte in der Tumorchirurgie, der Diagnostik, Strahlen- und Chemotherapie hat das Pankreaskarzinom weiterhin eine der schlechtesten Prognosen. Umso wichtiger ist

es deshalb die molekularen Mechanismen der aggressiven Tumorbilogie zu verstehen, um neue kurative Behandlungsmethoden neben der R₀-Resektion zu ermöglichen.

3.1.2 Molekulare Mechanismen

Aufgrund der wenigen und meist ineffektiven Behandlungsmöglichkeiten ist es unumgänglich, neue molekulare Mechanismen dieser Erkrankung aufzudecken, um darauf basierende, bessere Therapieverfahren entwickeln zu können. Die Weiterentwicklung von molekularbiologischen Techniken in den letzten Jahren eröffnete in dieser Hinsicht neue Möglichkeiten.

Die Entstehung eines Pankreaskarzinoms ist ein mehrstufiger Prozess und somit das Resultat einer Anhäufung von genetischen Veränderungen der DNA somatischer Zellen. So konnte für das Pankreaskarzinom ein Tumorprogressionsmodell entwickelt werden, welches genetische, epigenetische und morphologische Vorläufer-Läsionen mit einbezieht. Das Modell, erstmals 1998 von Brat et al. beschrieben^[14], wird entsprechend dem Fortschreiten der Erkrankung in die Stadien PanIN (*pancreatic intraepithelial lesions*) -1A, PanIN-1B, PanIN-2 und PanIN-3 eingeteilt (Abbildung 1). PanIN-3 stellt bereits eine, in genetischer Hinsicht, weit fortgeschrittene Tumorerkrankung dar, obwohl dieses Stadium klinisch noch lange nicht nachweisbar ist^[15]. Einige Fälle zeigten, dass atypische Läsionen des Pankreasduktes Jahre später zu einem Karzinom führen können^[14, 16]. Aktivierende Punktmutationen von K-RAS sind bei keiner Krebsart so ausgeprägt wie beim Pankreaskarzinom und können sogar in bis zu 100 % der Fälle auftreten. In Codon 12 stellen diese mit 75 % - 80 % die am häufigsten auftretenden Mutationen beim Pankreaskarzinom dar^[17-20]. Es findet überwiegend eine Transition von Guanin zu Adenin statt (GGT → GAT)^[19]. Mutationen im Codon 13 oder 61 finden seltener statt^[18]. Die Mutationen treten bereits sehr früh in den PanIN-1A und PanIN-1B Stadien auf und können über ein Jahr vor der klinischen Feststellung von Neoplasmen der Bauchspeicheldrüse im Stuhl und in der Flüssigkeit des Zwölffingerdarms oder der Bauchspeicheldrüse detektiert werden^[21-26]. Ebenso früh kommt es zur Überexpression von HER-2/neu, auch ErbB2 genannt, welches der Familie der EGFR angehört (*epidermal growth factor receptor family*)^[22]. In einer Studie von Day et al. wurde gezeigt, dass normale Pankreasgänge kaum HER-2/neu exprimieren, wohingegen die Expression in den Ducti mit atypischen Läsionen sehr stark zunimmt^[27]. Komoto et al. belegten, dass die Überexpression von HER-2/neu mit dem Überleben nach kurativer Resektion des Pankreaskarzinoms korreliert. Patienten mit normaler HER-2/neu Expression hatten eine mediane Überlebensrate von 20,7 Monaten wohingegen Patienten mit erhöhter Expression 6 Monate früher an der Erkrankung verstarben^[28]. In dem PanIN-2 Stadium folgt meist eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16, die Inaktivierung der

Tumorsuppressorgene TP53, DPC4 und BRCA2 findet erst später während des PanIN-3 Stadiums statt^[22]. Eine Inaktivierung von p16 (welches von dem MTS1 Gen auf Chromosom 9p21 kodiert wird) tritt in 40 % der Fälle durch eine homozygote Deletion auf, in weiteren 40 % durch eine intragenetische Mutation, welche an den Verlust des zweiten Allels gekoppelt ist und in 15 % der Fälle tritt eine Hypermethylierung des p16 Promotors auf^[29-32].

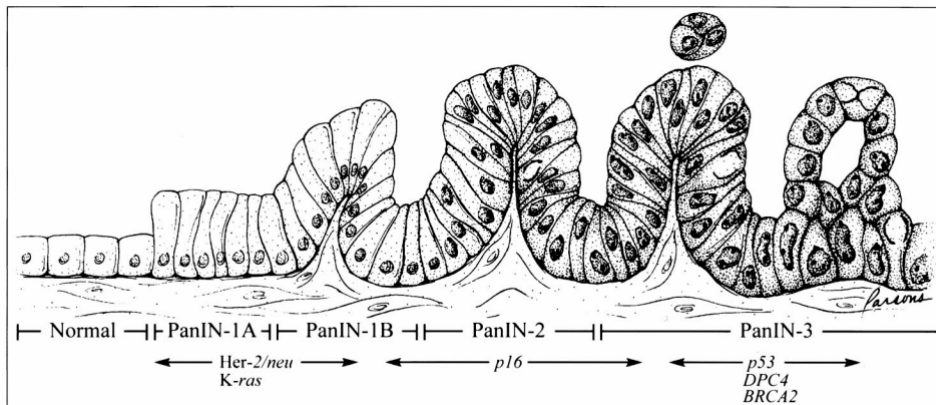


Abbildung 1: Das pankreatische interepitheliale Läsions-Modell (nach Hruban et al.^[22])

Die Läsionen des Pankreasduktes werden in unterschiedliche PanIN-Stufen eingeteilt, welche von verschiedenen genetischen Alterationen begleitet werden und sehr frühe Vorstufen des Pankreaskarzinoms darstellen.

Es gibt jedoch noch eine Vielzahl weiterer und wesentlich seltenerer Mutationen beim Pankreaskarzinom, wie z.B. AKT2 oder LKB1 / STK11^[33].

Eine über diese Hauptmutationen vermittelte Dysregulation des Zellzyklus ist jedoch nicht nur für das Pankreaskarzinom charakteristisch. Diese Mutationen treten einzeln oder in Kombination auch bei anderen Tumorarten wie z.B. Darm-, Lungen-, Brust- und Leberkrebs oder bei Pankreatitis auf^[34-41]. Deshalb müssen weitere, auf das Pankreaskarzinom zielgerichtete, wenn nicht sogar patientenindividuelle, molekulare Mechanismen aufgedeckt und therapeutisch genutzt werden.

3.1.3 Chemotherapie

Für das Pankreaskarzinom gibt es keine etablierte Standardtherapie^[42]. Die Behandlung wird vorwiegend mit 5-FU (5-Fluorouracil) oder mit Gemcitabin durchgeführt. Wobei diese, wie alle weiteren Therapieverfahren (einschließlich einer operativen R₀-Resektion), palliativ und zumeist nicht kurativ sind.

3.1.3.1 5-Fluorouracil

Als Chemotherapie wird beim Pankreaskarzinom unter anderem 5-FU verwendet. Meist wird 5-FU aufgrund der dennoch niedrigen Ansprechrate von etwa 7 %^[43] in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika eingesetzt, um die Effektivität zumindest partiell erhöhen zu können^[44, 45]. 5-FU wurde erstmals 1957 als Antimetabolit von Uracil als Krebsmedikament synthetisiert^[46], nachdem beobachtet wurde, dass Uracil in Tumorzellen öfter in die DNA eingebaut wird, als in normale Zellen^[47]. 5-FU unterscheidet sich von Uracil durch eine Fluorierung des 5`C Atoms des Pyrimidinringes. 5-FU an sich ist inaktiv und zeigt erst durch Umwandlung in aktive Metabolite seine zytotoxische Wirkung. 5-FU wird unter anderem zu 5-Fluorouridin-Triphosphat (5-FUTP), 5-Fluorodesoxyuridin-Monophosphat (5-FdUMP) oder 5-Fluorodesoxyuridin-Triphosphat (5-FdUTP) umgewandelt^[48] (Abbildung 2). 5-FdUMP entfaltet seine toxische Wirkung, indem es die Thymidylat-Synthase (TS) hemmt. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des Thymidinmonophosphats (dTMP), welches unter normalen Umständen zu Thymidintriphosphat (TTP) umgewandelt wird und als Baustein für die DNA-Synthese benötigt wird^[49]. Stattdessen wird 5-FdUMP zu 5-FdUTP phosphoryliert, welches anstelle von dTTP in die DNA eingebaut wird^[48]. Ebenso wird vermehrt 5-dUTP in die DNA eingebaut. Ein Reparatursystem, die Uracil-N-Glykosylase, versucht die fehlerhaften Moleküle aus der DNA herauszuschneiden und durch dTTPs zu ersetzen. Da diese jedoch nicht zur Verfügung stehen, kommt es zu einem erneuten Einbau von 5-FdUTP und 5-dUTP, was auf Dauer zu einer DNA-Schädigung durch Brüche bis hin zur Defragmentierung aufgrund erneuter Reparaturversuche der Uracil-N-Glykosylase führt^[48]. 5-FU kann jedoch auch über 5-FUTP zu einer RNA-bezogenen Zytotoxizität führen, indem es in alle RNA-Spezien eingebaut wird und unter anderem den Reifungsprozess zu 18 S und 28 S der ribosomalen RNA hemmt^[50].

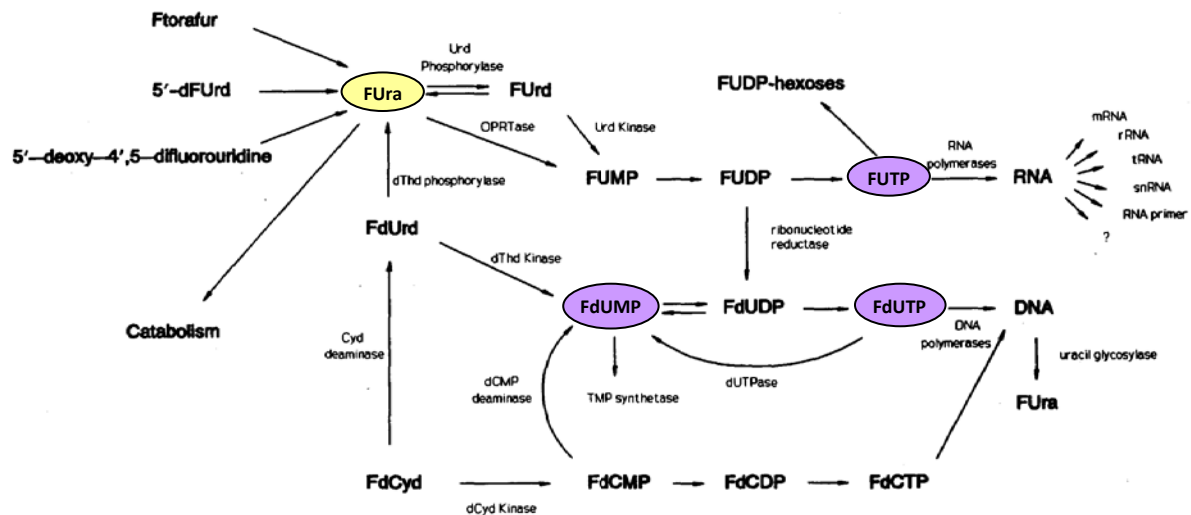


Abbildung 2: Metabolismus von 5-Fluorouracil (nach Parker und Cheng^[48], modifiziert)
 5-FU (FUra) entfaltet seine toxische Wirkung hauptsächlich über FdUMP (Hemmung der TS), FdUTP (DNA gerichtete Zytotoxizität) und 5-FUTP (RNA gerichtete Zytotoxizität).

3.1.3.2 Gemcitabin

Als Standardchemotherapie beim Pankreaskarzinom etablierte sich in den letzten 10 Jahren Gemcitabin (2',2'-Difluorodesoxycytidin / dFdC)^[51], welches einen Vorteil hinsichtlich der Ansprechrate, des Gesamtüberlebens und der Lebensqualität gegenüber 5-FU zeigte^[52, 53]. Das chemische Analogon von Cytidin wurde bereits 1988 synthetisiert^[54]. Gemcitabin wird hauptsächlich über den *human equilibrative nucleoside transporter-1* (hENT-1), aber auch über den *human concentrative nucleoside transporter-1* (hCNT-1) und hENT-2 in die Zelle aufgenommen^[55, 56]. Wie auch 5-FU muss dieses zunächst intrazellulär in die eigentliche Wirkform umgewandelt werden. Dazu wird es durch die Desoxycytidinkinase (hier das limitierende Enzym) als Erstes zu Gemcitabinmonophosphat (dFdCMP) und anschließend weiter zu Gemcitabindiphosphat (dFdCDP) und Gemcitabintriphosphat (dFdCTP) phosphoryliert^[57, 58]. Gemcitabin zeigt zwei Wirkmechanismen zur Inhibition der DNA-Synthese auf, den indirekten und den direkten Mechanismus (Abbildung 3). Bei dem indirekten Mechanismus hemmt das dFdCDP die Ribonukleotidreduktase (RR), welche die Desoxynukleotidtriphosphatsynthese katalysiert. Dadurch sinkt die Konzentration an Desoxynukleosidtriphosphaten, insbesondere an Desoxycytidintriphosphat (dCTP), welches für die DNA-Synthese benötigt wird. So kommt es zu einer indirekten Inhibition der DNA-Synthese^[59]. Der niedrige dCTP Spiegel verstärkt zusätzlich die Phosphorylierung des Gemcitabins^[60]. Der direkte Mechanismus ist darauf zurückzuführen, dass das dFdCTP beim Einbau in die DNA mit dem natürlichen dCTP konkurriert^[61], was maßgebend für die Toxizität ist^[62]. Hierbei kommt es zu einer Selbstpotenzierung durch den reduzierten Anteil an

intrazellulärem dCTP. Das DNA-Reparatursystem, die DNA-Polymerase Epsilon, welche Exonukleaseaktivität besitzt, kann das modifizierte Nukleotid nicht entfernen. Wird nun nach einem Gemcitabintriphosphat mehr als ein Nukleotid in die DNA eingebaut, folgt ein maskierter Kettenabbruch – die DNA-Polymerase kann die Transkription nicht fortführen, was zu einem Abbruch der DNA-Synthese bis hin zur Apoptose führt^[61, 63].

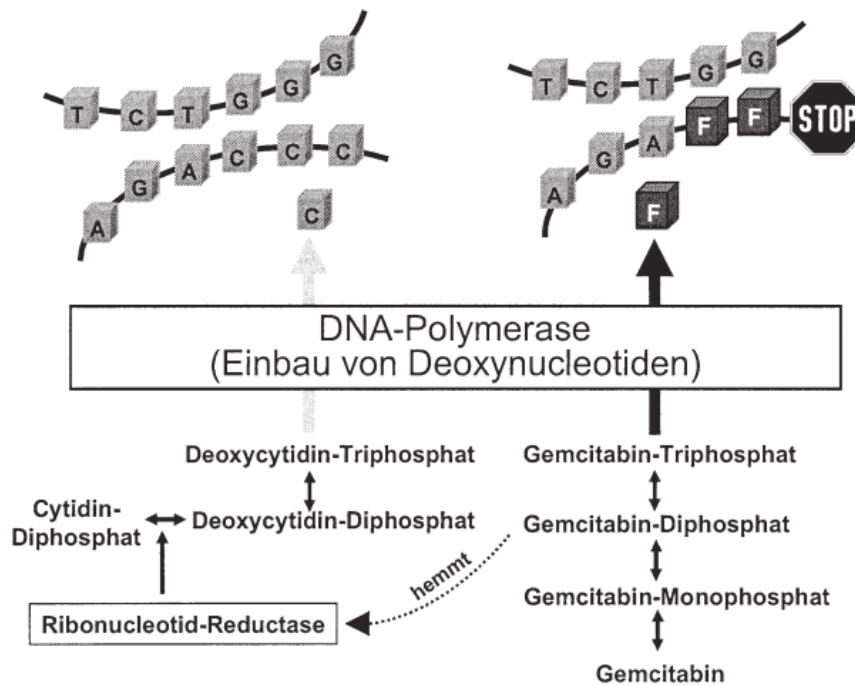


Abbildung 3: Intrazellulärer Wirkungsmechanismus von Gemcitabin (nach Lehmann et al.^[63])

Gemcitabintriphosphat, die aktive Wirkform von Gemcitabin, hemmt die Desoxyzytidinsynthese und verstärkt somit den eigenen Einbau in die DNA, welcher zu einem Abbruch der Transkription durch einen Stop der DNA-Polymerase führt.

3.1.4 Chemotherapie-Resistenz

Obgleich eine Chemotherapie zur Linderung der Symptome beim Pankreaskarzinom beiträgt, ist diese lediglich palliativ und keinesfalls kurativ. Nach einiger Zeit führt die Chemotherapie meistens zur Ausbildung von Resistenzen gegen das verwendete Therapeutikum und damit zu einem Nachwachsen des Tumors. Bei Chemotherapie-Resistenzen muss zwischen bereits vorhandener (intrinsischer) und Therapeutikum vermittelter (akquirierter) Resistenz unterschieden werden, meistens treffen die Mechanismen jedoch auf beide Arten zu. Zur Ausbildung einer Resistenz gegen 5-FU können einige Aberrationen im Metabolismus beitragen, wie mangelnder Anabolismus^[64, 65] und Transport von 5-FU^[66] (Abbildung 4). Hauptursache scheinen jedoch Faktoren zu sein, welche die TS betreffen^[67], wie z.B. die Überexpression der TS^[68].

Deficiency of 5FU anabolism
 Deficiency of 5FU transport
 Depletion of essential cosubstrates
 Enhanced catabolism of 5FU, FUUMP, or FdUMP
 Enhanced intracellular uridine concentrations
 Altered dTTP levels
 Alterations in thymidylate synthase
 Altered enzyme kinetics
 Enhanced dUMP accumulation
 Decreased FdUMP retention
 Rapid recovery of new enzyme synthesis
 Gene amplification
 Decreased stability of ternary complex
 Depletion of folates
 Decreased polyglutamylolation of folates

Abbreviation: dTTP, deoxythymidine triphosphate.

Abbildung 4: Zur Resistenz beitragende Aberrationen im 5-FU Metabolismus (nach Pinedo und Peters)^[67]

Zur 5-FU-Resistenz tragen verschiedene Aberrationen, wie Mangel an 5-FU Anabolismus oder ein verminderter Transport bei, Hauptaugenmerk liegt jedoch auf der TS.

Chemotherapie-Resistenzen der Zelle gegen Gemcitabin können hENT, Desoxycytidinkinase (dCK)- oder Ribonukleotidreduktase-vermittelt sein, wobei das Verhältnis von hENT-1 und dCK zur RR beim Pankreaskarzinom mit der akquirierten Resistenz entscheidend für die Korrelation zu sein scheint^[69]. Eine Reduktion des hENT Transporters führt zur verminderten Aufnahme von Gemcitabin in die Zelle und somit zu einer Steigerung der Resistenz und damit einer Verschlechterung des Gesamtüberlebens der Patienten^[70-72]. Kommt es zu einer Hemmung der dCK, wird das Gemcitabin nicht in seine aktive Form umgewandelt und bleibt wirkungslos, wie die Korrelation zwischen dCK Aktivität und Gemcitabin-Sensitivität zeigt^[73]. Wird die Ribonukleotidreduktase überexprimiert, kann die Desoxynukleotid-triphosphatsynthese aufrechterhalten werden, was zur Folge hat, dass weiterhin dCTP anstelle des dFdCTP in die DNA eingebaut wird. Somit kann die toxische Wirkung des Gemcitabins erneut umgangen werden^[74].

Generell spielt bei der Chemotherapie-Resistenz eine Vielzahl weiterer, zum Teil noch unbekannter, Mechanismen eine Rolle, wie der Einfluss potentieller Krebsstammzellen oder *multidrug-efflux* Symporter.

3.2 Krebsstammzellen

In den letzten Jahren wurden hohe Erwartungen an die Stammzellforschung gerichtet, da die Forschung in diesem Bereich stark zunahm. Laut Schöler ist der bis vor einigen Jahren noch unbekannte Begriff der „Stammzellen“ zu einer Zauberformel geworden, die „in Zukunft nahezu alle unsere medizinischen Probleme lösen soll“^[75]. Eindeutig lässt sich die Stammzelle bis heute nicht definieren, sie charakterisiert sich vielmehr über ihre Fähigkeit sich selbst zu erneuern, sich unbegrenzt zu vermehren und ihre Fähigkeit zu differenzieren. Diese Eigenschaften weisen auch die sogenannten Krebsstammzellen auf, welche in der Tumorbiologie eine entscheidende Rolle hinsichtlich Entstehung, Aggressivität, Chemotherapie-Resistenz und Metastasierung zu spielen scheinen^[76].

3.2.1 Überblick

Eine Zusammenfassung über die Biologie der Krebsstammzelle liefert eine Arbeit von Lobo et al.^[76]. Die ursprüngliche Idee von der Existenz einer Tumorstammzelle kam bereits 1858 auf und stammt von Rudolf Virchow, dem Gründer der modernen Zellulärpathologie. Er stellte die These auf, dass Krebs eine Krankheit ist, dessen Ursprung in einer unreifen Zelle liegt und legte somit den Grundstock der zellulären Hierarchie^[76]. 1961 lieferten Till und McCulloch erste Daten, welche Hinweise auf die Existenz hämatopoetischer Stammzellen gaben^[77]. Zwei Jahre später konnten Bruce und Van der Gaag diese auf maligne Blutstammzellen übertragen^[78]. Pierce und Wallace erbrachten 1971 den experimentellen Beweis für die Existenz einer zellulären Hierarchie in Tumoren^[79]. Die Tatsache, dass lediglich ein kleiner Prozentsatz epithelialer Tumorzellen in der Lage war, *in vitro* Kolonien zu bilden stellte ein weiteres Indiz für die Existenz der Krebsstammzelle dar^[80]. 1994 wurden erstmals hämatopoetische Krebsstammzellen für AML (akute myeloische Leukämie) isoliert. Diese wiesen den Oberflächenprotein-Phänotyp CD34⁺ CD38⁻ auf und waren in der Lage, nach Transplantation in SCID (*severe combined immunodeficiency*) Mäusen AML zu induzieren^[81].

Diese Zellen stellen unumstritten hämatopoetische Krebsstammzellen dar und sind die am besten untersuchten Krebsstammzellen. Ausgehend von den hämatopoetischen Krebsstammzellen wurde vermutet, dass auch solide Tumore Krebsstammzellen besitzen, und versucht, hämatopoetische Marker zur Identifizierung dieser Krebsstammzellen zu verwenden. Dies gestaltet sich jedoch sehr schwierig, da solide Krebsstammzellmarker sehr gewebspezifisch und höchst umstritten sind.

3.2.2 Das Krebsstammzellmodell

Bisher gibt es zwei Modelle bezüglich der Tumorentstehung, das altertümliche, stochastische Modell und das moderne, hierarchische Modell (Krebsstammzellmodell), wobei Letzteres zunehmend das stochastische verdrängt. Dem stochastischen Modell nach hat jede Zelle innerhalb eines Tumors die Fähigkeit stark zu proliferieren und einen neuen Tumor zu bilden (Abbildung 5 A). Im hierarchischen Modell wird davon ausgegangen, dass lediglich sehr wenige der heterogenen Tumorzellen in der Lage sind, extensiv zu proliferieren und einen neuen Tumor zu bilden – die sogenannten Krebsstammzellen - und es somit innerhalb des Tumors eine Hierarchie gibt (Abbildung 5 B)^[82]. Die restlichen Zellen stellen differenzierte Progenitorzellen dar, welche diese Eigenschaft nicht mehr besitzen.

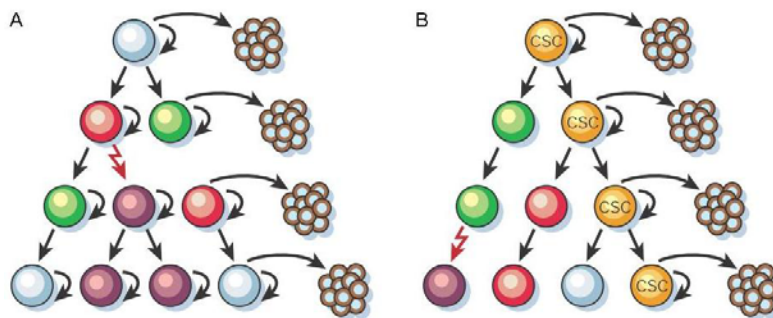
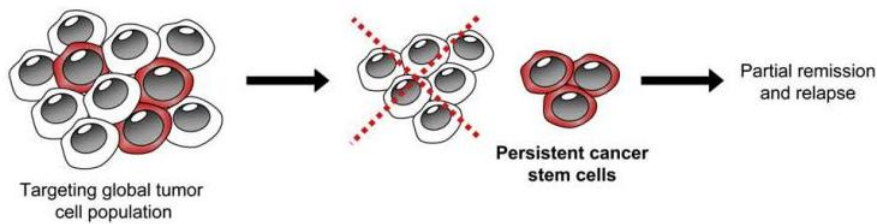


Abbildung 5: Heterogenitätsmodell bei soliden Tumoren (nach Reya et al.^[82])

Dem stochastischen Modell nach besitzen alle Zellen eines Tumors die Fähigkeit neue Tumore zu bilden (A), wohingegen das hierarchische Modell darauf zurückgreift, dass lediglich die Tumorstammzellen (CSC, *cancer stem cells*) dazu in der Lage sind (B).

Es ist daher sehr wichtig, die therapeutischen Ansätze unter dem Aspekt des hierarchischen Modells zu betrachten. Bisher wurden Therapien angewendet, welche auf die grosse Tumormasse ausgerichtet waren. Bei dieser Therapie überleben die in sehr geringer Anzahl vorhandenen, resistenten Krebsstammzellen und es kommt zu einem Nachwachsen des Tumors, obwohl dieser augenscheinlich entfernt wurde. Deshalb müssen Therapien entwickelt werden, welche nicht nur die grosse Tumormasse, sondern ebenso die seltenen Krebsstammzellen eliminieren, um ein rezidivfreies Leben gewährleisten zu können (Abbildung 6).

Treatment strategies available today:



Prospective stem cell targeted strategies:

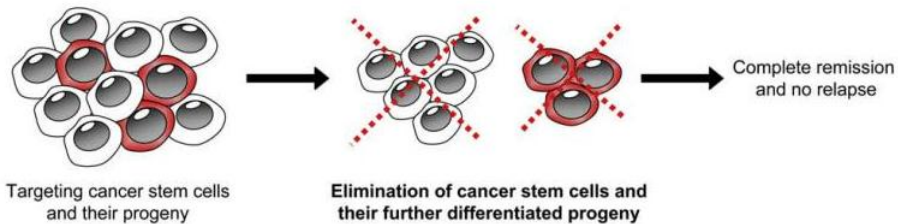


Abbildung 6: Therapiekonzept basierend auf dem hierarchischen Modell (nach Ischenko et al.^[83])

Ein herkömmliches Therapieverfahren greift lediglich die grosse Tumormasse an, so dass die Krebsstammzellen überleben, was zu einem Tumorrezidiv führen kann. Krebsstammzelltherapien dagegen sind speziell auf Krebsstammzellen gerichtet und könnten so zu einer kompletten Remission führen.

3.2.3 Ursprung einer Krebsstammzelle

Der eigentliche Ursprung von Krebsstammzellen ist noch nicht geklärt. Es werden jedoch überwiegend zwei Möglichkeiten diskutiert, die Entstehung aus einer Stammzelle oder einer Progenitorzelle (Abbildung 7).

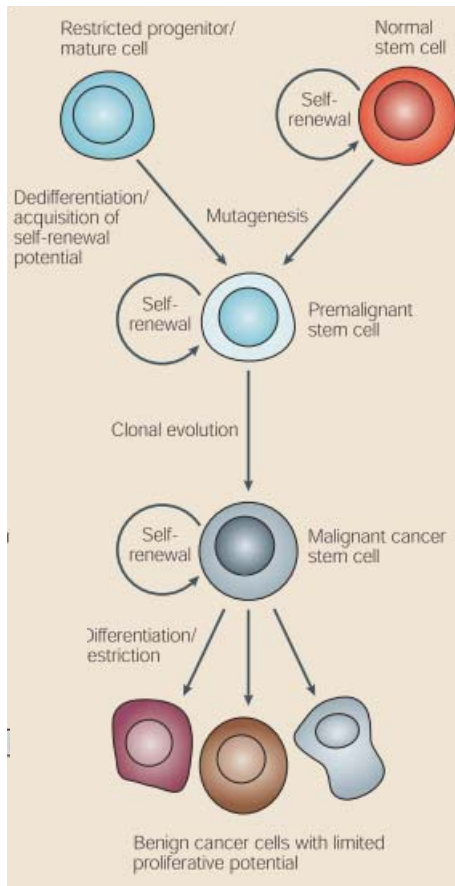


Abbildung 7: Ursprungsmodell einer Krebsstammzelle (nach Pardal et al.^[84])

Durch Anhäufung verschiedener genetischer Veränderungen können sowohl normale Stammzellen, als auch Progenitorzellen zu einer Krebsstammzelle modifizieren.

Für den Ursprung einer normalen Stammzelle spricht, dass eine normale Stammzelle für die Aufrechterhaltung ihres Kompartiments zuständig ist und sie somit eine der langlebigsten Zellen darstellt. So ist es wahrscheinlich, dass diese über ihre lange Lebensspanne hinweg durch äußere Einflüsse mehr Mutationen akquiriert, als kurzlebige Progenitorzellen – eine Grundvoraussetzung für die Tumorigenese. Einen weiteren Anhaltspunkt, dass die Krebsstammzelle ihren Ursprung in einer normalen Stammzelle haben kann, geben auch identische Oberflächenproteine. Die AML induzierende Krebsstammzelle z.B. weist die gleichen Oberflächenproteine ($CD34^+$, $CD38^-$) auf wie die zugehörige primitive, nicht maligne Stammzelle^[85]. Des Weiteren gibt es einige Signalwege, welche sowohl mit normalen Stammzellen, als auch mit Krebsstammzellen in Verbindung gebracht werden können – vermutlich aufgrund der Gemeinsamkeit des Selbsterneuerungspotentials (Abbildung 8).

Pathway	Normal stem cells	Cancer
Bmi-1	Bmi-1 is required for self-renewal of hematopoietic and neural stem cells	Bmi-1 is upregulated in AML and overexpressed in medulloblastoma
	Bmi-1 downregulates the Ink4a/Arf locus	Overexpressed Bmi-1 and cell proliferation induce self-renewal of leukemic stem cells
Shh	Involved in the maintenance of hematopoietic stem cells and expansion of progenitors	Activation of SHH is implicated in skin and brain carcinogenesis, including basal cell carcinoma of skin and medulloblastoma
	Crucial in embryonic development of skin, hair follicle, and sebaceous gland	Mutation of SHH causes Gorlin's syndrome
	Involved in postnatal and adult brain development	
Wnt/ β -catenin	Involved in the maintenance and self-renewal of hematopoietic stem cells and progenitor cells	Overexpression of WNT is seen in many human cancers
	Regulates the maintenance of normal intestinal epithelial cells	Accumulation of β -catenin is associated with breast cancer, melanoma, sarcoma, myeloid leukemia, multiple myeloma, and brain tumors
	Implicated in regenerative responses during tissue repair	Mutations in β -catenin are found in endometrial carcinomas, prostate carcinoma, and hepatocellular carcinomas
		Mutations of both β -catenin and APC genes are common in colorectal cancer
Notch	Mediates the self-renewal of hematopoietic and neural stem cells	Mutations or aberrant activation of Notch1 are known to cause T-ALL in human and mouse
	Activates Notch target genes involved in T cell differentiation and self-renewal	
Hox family	Involved in the self-renewal of hematopoietic stem cells and the proliferation and differentiation of precursor cells	Overexpression of HOXA9 is found in AML patients with poor prognosis
		Overexpression of HOX11 is described in T-ALL with chromosome translocations
		Hoxb3, Hoxb8, and Hoxa10 are associated with leukemogenesis in a mouse model
Pten	Implicated in the maintenance of hematopoietic stem cells and neural stem cells	Loss of PTEN leads to the formation of a variety of tumors, including myeloproliferative disease, and the emergence of transplantable leukemia
		Mutation and/or LOH cause glioblastoma multiforme, prostate carcinoma, and endometrial carcinoma
Efflux transporters	Marker proteins are found in self-renewing stem cells, such as ABCG family proteins, responsible for the side-population phenotype	Upregulated ABCG2, ABCB1, and CEACAM6 are found in cancer cells from the gastrointestinal system
		Upregulated ABCG is implicated in broad-spectrum chemoresistance of cancer cells, such as AML cells
Telomerase	Expressed at a high level in normal self-renewing populations in the blood	Expressed at a high level in tumor cell populations with upregulated mRNA expression
		hTERT is involved in tumorigenic transformation
		Upregulated telomerase activity is found in glioblastoma

Abbildung 8: Gemeinsame Signalwege von Stammzellen und Krebsstammzellen (nach Lobo et al. [76])

Dargestellt sind Signalwege und deren Rolle bei Stammzellen und Krebsstammzellen.

Dazu zählen zum Beispiel Bmi-1, Shh, Wnt/ β -catenin, Notch, Pten, die Hox-Familie, Telomerasen, Efflux Transporter sowie der mTOR Signalweg^[76, 86, 87].

Dennoch gibt es plausible Hinweise, welche für die Progenitor-Theorie als Ursprung der Krebsstammzellen sprechen. Laut dieser erlangen - aufgrund genetischer Modifikationen - zur Differenzierung befähigte Progenitorzellen ihr Selbsterneuerungspotential wieder.

Ansonsten weisen die Krebsstammzellen mehr Ähnlichkeiten mit ihren Progenitorzellen als mit den normalen Stammzellen auf. Beispielsweise kann MLL-AF9 die Umwandlung von leukämischen Progenitorzellen in leukämische Stammzellen bewirken^[88]. Bei MLL assoziierter Leukämie scheinen sogar beide Varianten möglich zu sein^[89].

3.2.4 Solide Krebsstammzellmarker

Nach der Entdeckung von Krebsstammzellen bei Leukämie wurde auch nach Krebsstammzellen in soliden Tumoren gesucht. Dabei wurde man zunächst bei Brustkrebs und Gehirntumoren fündig, später folgten das Prostata- und Eierstockkarzinom, aber auch Darm-, Leber- und Lungenkrebs sowie das Pankreaskarzinom. Es erwiesen sich hauptsächlich Oberflächenmarker wie CD44, CD24, CD133 und ESA, aber auch ALDH-1 oder der Side-Population Phänotyp, überwiegend hervorgerufen durch *drug-efflux* Symporter wie ABCG2, als potentielle Stammzellmarker (Tabelle 3.1).

Diese undifferenzierten Zellen sind nur zu einem sehr geringen Prozentsatz im Tumor enthalten, scheinen jedoch den Grundstein für das Tumorwachstum, die Chemotherapie-Resistenz und Metastasierung zu bilden. Einige wenige Zellen reichen bereits aus um einen neuen Tumor zu induzieren, während die restlichen, differenzierten Tumorzellen keine Tumorigenität zeigen und aufgrund ihrer grossen Masse einen besseren Angriffspunkt für Chemotherapien und Bestrahlung darstellen.

Tabelle 3.1: Solide Krebsstammzellmarker verschiedener Tumore (nach Hermann et al.^[90], modifiziert)

Auflistung bisher identifizierter Krebsstammzellmarker solider Tumore.

<u>Tumorart</u>	<u>Marker</u>	<u>Referenz</u>
Brust	CD44 ⁺ CD24 ^{-/low}	[91]
	CD133 ⁺	[92]
	ALDH-1 ⁺	[93]
Glioma	CD133 ⁺	[94, 95]
	SSEA-1 ⁺	[96]
	SP	[97]
Colon	ESA ^{high} CD44 ⁺ CD166 ⁺	[98]
	CD133 ⁺	[99, 100]
Leber	CD90 ⁺	[101]
	CD133 ⁺	[102]
	SP	[103]
Lunge	CD133 ⁺	[104, 105]
	Sca-1 ⁺ , CD45 ⁻ , PECAM ⁻ , CD34 ⁺	[106]
	SP	[107]
Prostata	CD44 ⁺ α2β1 ^{high} CD133 ⁺	[108]
	CD133+CXCR4 ⁺	[109]
Pankreas	ESA ⁺ CD44 ⁺ CD24 ⁺	[110]
	CD133 ⁺	[111]
	CD133 ⁺ CXCR4 ⁺	[111]
	ALDH-1 ⁺	[112]
	SP	[113]

3.2.5 ABCG2 und der Side-Population Phänotyp

ABCG2, oder auch *breast cancer resistance protein* (BCRP) genannt, gehört zur ABCG-Unterfamilie der ABC (*ATP-binding cassette*) Superfamilie, eine der größten Transporterproteinfamilien (sie umfasst 50 verschiedene ABC Transporter). Diese verwendet ATP als Energielieferant, um ein breites Spektrum an Molekülen, unter anderem Zucker, Peptide, anorganische Ionen, Aminosäuren, Oligopeptide, Polysaccharide und Proteine über Zellmembrane zu transportieren. Jeder ABC-Transporter ist spezifisch für bestimmte Substrate und weist entweder eine Import- oder Exportfunktion auf^[114]. Im Hinblick auf die meisten *multidrug* Resistenzen scheinen überwiegend folgende drei ATP-Transporter eine Rolle zu spielen: der P-Glykoprotein Transporter (ABCB1, MDR1), der *multidrug resistance*

associated protein1 Transporter (MRP1, ABCC1) und der ABCG2 Transporter^[115]. Der ABCG2 Transporter wurde erst sehr spät in einer Doxorubicin-resistenten Brustkrebszelllinie, der MCF7, entdeckt und exportiert unter anderem Krebsmedikamente wie Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron, Indolocarbazol, Topoisomerase I Inhibitoren, Methotrexat, und Flavopiridol aus der Zelle heraus^[116] (Abbildung 9). Aufgrund des hohen *drug-efflux* kommt es zur Ausbildung von Chemotherapie-Resistenzen^[116-118]. Es werden aber auch Farbstoffe wie Rhodamine 123 und Hoechst 33342 transportiert^[116], welche es ermöglichen diesen Efflux mit Hilfe der Durchflusszytometrie sichtbar zu machen.

<i>Drugs</i>	<i>Dyes/natural substrates</i>	<i>Inhibitors</i>
Mitoxantrone	Rhodamine 123 ^a	Fumitremorgin C (FTC)
Topotecan	Lysotracker	FTC analogues (Ko143)
Irinotecan, SN-38	Prazocin-BODIPY	GF120918
9-Aminocamptothecin	Hoechst 33342	BIB-E
Doxorubicin ^a	Pheophorbide a	Flavopiridol
Daunorubicin ^a	Protoporphyrin IX	CI1033
Epirubicin ^a	Hydrocortisone?	Iressa
Idarubicinol ^a	Estradiol 17- β ?	Novobiocin
Flavopiridol	Estrone?	Reserpine
CI1033		VX-710 (biricodar)
BBR3390		VX-853
Methotrexate ^a		Diethylstilbesterol (DES)
Prazocin		Estrone
Indolocarbazole		Antiestrogens
topoisomerase I inhibitors: NB-506, J-107088		Tamoxifen, and derivatives TAG-11, TAG-139
Zidovudine (AZT), lamivudine		Toremifene

^aEffect varies, depending on the amino acid at codon 482

Abbildung 9: Krebsmedikamente, welche mittels des ABCG2 Transporters aus der Zelle ausgeschleust werden (nach Doyle et al.^[116])

Der ABCG2 Transporter vermittelt den Export einiger Krebsmedikamente, wie Mitoxantron, aus der Zelle.

Die Expression von ABCG2 dient zur Adaption an kritische Situationen, wie ein durch toxische Substanzen bedingter Zelltod, und ist in verschiedenen Stammzellen zu finden, wie z.B. in embryonalen Stammzellen oder in primitiven hämatologischen Stammzellen - nach deren Differenzierung geht diese jedoch sehr stark zurück^[119]. ABCG2 wird fast immer mit dem Side-Population-Phänotyp in Verbindung gebracht und scheint deren bestimmender Faktor zu sein^[119, 120]. Goodell et al. entwickelten erstmals eine Technik zur SP Isolation bei Blutzellen und zeigten, dass die mittels Hoechst 33342 isolierten, hämatopoetischen Side-Population Zellen Stammzellcharakteristika besitzen^[121]. Dieses Verfahren lässt sich auch auf Gewebe übertragen und erregt vor allem in Hinblick auf Tumorstammzellen

Aufmerksamkeit. So scheint es bei soliden Tumoren, wie beispielsweise dem Leberkarzinom^[103], Melanom^[122], Gliom^[97], Lungenkarzinom^[107], kleinzelligen Bronchialkarzinom^[123] oder dem Pankreaskarzinom^[113, 124, 125] eine Krebsstammzellanreicherung innerhalb der SP-Fraktion zu geben. Da Oberflächenmarker für Krebsstammzellen oft sehr umstritten oder gar unbekannt sind, stellt die Hoechst-Methode hier eine Alternative dar^[126]. Sie beruht darauf, dass einige wenige Zellen in der Lage sind, den Hoechstfarbstoff auszuschleusen, wohingegen die Hauptpopulation diese Eigenschaft nicht aufweist. Betrachtet man die Zellen simultan bei UV rot- (Emissionswellenlänge 675 nm) und UV blau-Licht (450 nm) im FACS-Gerät, so erscheinen die SP Zellen als Schweif, welcher von der Hauptpopulation abzweigt und in den linken unteren Quadranten des FACS-Profiles mündet.

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Pankreaskarzinom stellt unumstritten eine der aggressivsten und verheerendsten Krebsarten dar.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die potentielle Rolle von Krebsstammzellen bei der Chemotherapie-Resistenz des Pankreaskarzinoms zu gewinnen, um somit neue Wege zur Bekämpfung dieser Krankheit aufzuzeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten potentielle Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom mit Hilfe der Hoechst 33342 Färbung identifiziert und anschließend *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Eine Affymetrix Genchip-Analyse von potentiellen Krebsstammzellen versus „normale“ Krebszellen sollte auf RNA-Ebene tiefere Einblicke in differentiell regulierte Gene geben, welche bei Krebsstammzellcharakteristika wie Chemotherapie-Resistenz, Metastasierung und Tumorigenität, aber auch beispielsweise Differenzierung und Apoptose eine entscheidende Rolle spielen. Um eventuelle Parallelen zwischen Krebsstammzellen und Chemotherapie-Resistenzen aufzudecken, sollte für weitere Versuche eine Gemcitabin- und eine 5-FU-resistente Pankreaskarzinomzelllinie etabliert werden. Abschließend sollte ein auf diesen Erkenntnissen basierendes Therapieverfahren entwickelt und *in vitro* getestet werden.

Limitierender Faktor dieser Arbeit war die geringe Verfügbarkeit der potentiellen Krebsstammzellen aufgrund des für sie charakteristischen, niedrigen Prozentsatzes im Vergleich zu „normalen“ Krebszellen. Erschwerend kam hinzu, dass das wenige Krebsstammzellmaterial in einem aufwendigen Verfahren immer frisch mit Hilfe eines Zellsortierers isoliert werden musste, da Krebsstammzellen schon nach kurzer Zeit ausdifferenzieren.

4 Material

In diesem Kapitel sind alle Materialien aufgelistet, welche während dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

4.1 Chemikalien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
1-Butanol	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
5-Fluoruracil	TEVA Deutschland GmbH, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Acrylamid / Bis Lösung 30 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Atropinsulfat	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BisBenzimid H 33342 Trihydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovine serum albumine	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt, Deutschland
Citronensäuremonohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Curcumin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Cyclopamin	LC Laboratories, Woburn, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Eichlösungen pH Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Eukitt	Kindler GmbH & Co., Freiburg, Deutschland
Gemcitabin	Lilly Deutschland GmbH, Gießen, Deutschland

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaisers Glycerine Gelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketavet	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Mayers Hämalan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchloridlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neoclear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Rapamycin	Wyeth Pharma GmbH, Münster, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trifast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Tri-sodium-citrat-dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trizma base	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trizma hydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Verapamilhydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylazin (Rompun) 2 %	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
Ziegenserum	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

4.2 Standards und Kits

Produkt

ABC Komplex
 Albumin Standard
 Avidin/Biotin Block
 BCA Protein Assay Reagent
 Complete Lysis-M

 DNA-Leiter und Ladepuffer

 ECL Plus Western Blotting Detection System

 FcR blocking reagent

 GeneChip Human Gene 1.0 ST Array
 GeneChip WT Sense Target Labeling Kit
 Liquid DAB+ substrate

 Protein-Leiter
 TACS MTT Zell-Proliferationsassay

Hersteller

Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
 Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
 Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
 Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
 Roche applied science, Mannheim,
 Deutschland
 MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rto,
 Deutschland
 Amersham Biosciences Europe GmbH,
 Freiburg, Deutschland
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
 Deutschland
 Affymetrix Inc, Santa Clara, USA
 Affymetrix Inc, Santa Clara, USA
 DakoCytomation GmbH, Hamburg, Glostrup,
 Dänemark
 Genscript corporation, Picataway, USA
 R&D Systems, Minneapolis, USA

4.3 Antikörper

Produkt

AKR1B10 aus der Maus, monoklonal
 Anti Maus, HRP konjugiert, aus der Ziege,
 polyklonal
 Anti Hase, biotinyliert, aus der Ziege
 Anti Hase, HRP konjugiert, aus der Ziege,
 polyklonal
 BCRP/ABCG2, aus der Maus, monoklonal
 Bcrp1/ABCG2, APC, aus der Maus,
 monoklonal
 CD133, aus dem Hasen, polyklonal
 CD133/2 (clone 293C3), APC, aus der
 Maus, monoklonal

Hersteller

Abcam, Cambridge, UK
 DakoCytomation GmbH, Hamburg, Glostrup,
 Dänemark
 Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
 DakoCytomation GmbH, Hamburg, Glostrup,
 Dänemark
 Abcam, Cambridge, UK
 R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

 Abcam, Cambridge, UK
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
 Deutschland

Produkt

CD24, PE, aus der Maus
 CD326 (EPCAM), FITC, monoklonal

 CD44, FITC, aus der Maus

 CXCR4, PE, aus der Maus, monoklonal
 DCK, aus der Maus, monoklonal
 h-ENT1, aus dem Hasen, polyklonal
 h-ENT2 aus dem Hasen, polyklonal
 IgG1, FITC, aus der Maus

 IgG2a, k, PE, aus der Maus
 IgG2b, APC, aus der Maus

 Ki-67, aus dem Hasen, monoklonal
 β -actin, aus der Maus, monoklonal

 TS, aus der Maus, monoklonal

Hersteller

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
 Deutschland
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
 Deutschland
 R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
 Abcam, Cambridge, UK
 Abcam, Cambridge, UK
 Abcam, Cambridge, UK
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
 Deutschland
 BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach,
 Deutschland
 Abcam, Cambridge, UK
 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim,
 Deutschland
 Abcam, Cambridge, UK

4.4 Molekularbiologische Reagenzien**Produkt**

10x Reaktionspuffer mit $MgCl_2$

 50x TAE
 $MgCl_2$ 25 mM

 Nukleotid Mix 10 mM

 Taq DNA-Polymerase 5 U/ μ l

 Wasser für die Molekularbiologie

Hersteller

Roche applied science, Mannheim,
 Deutschland
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
 Roche applied science, Mannheim,
 Deutschland
 Roche applied science, Mannheim,
 Deutschland
 Roche applied science, Mannheim,
 Deutschland
 Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim,
 Deutschland

4.5 Oligodesoxynukleotide

	<u>Sequenz</u>	<u>Hersteller</u>
Mycoplasmen PCR <i>forward</i>	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland
Mycoplasmen PCR <i>reverse</i>	5'-TGCACCATCTGTCACTCCGTTAACCTC-3'	Metabion GmbH, Martinsried, Deutschland

4.6 Lösungen und Puffer

4.6.1 Lösungen und Puffer für SDS-PAGE und Westernblot

Tris-HCl-Puffer

Tris 1 M
pH 6,8

Tris 1,5 M
pH 8,8

SDS Lauf-Puffer

Trizma Base 3 g
Glycin 14 g
SDS 1 g
Wasser ad 1000 ml
pH 8,3

Transfer-Puffer

1x SDS Lauf-Puffer 400 ml
Methanol 100 ml

10x TBS-Puffer

Trizma Base 24,2 g
NaCl 80 g
Wasser ad 1000 ml
pH 7,6

Für TBST wurde der Puffer 1/10 verdünnt und 0,1 % Tween 20 zugeben.

Blockierungs-Puffer

5 % Milchpulver in TBST gelöst

5x Lade-Puffer

0,5 M Tris HCl pH 6,8	2 ml
Glycerol	3,2 ml
20 % SDS	1,6 ml
2-Mercaptoethanol	0,8 ml
1 % Bromphenolblau	1,6 ml
Wasser	6,8 ml

Der Lade-Puffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

10 % APS

Das APS wurde in Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Strip-Puffer

Tris-HCl	10,32 g
SDS	20 g
2-Mercaptoethanol	7 ml
Wasser	ad 1000 ml
pH 6,7	

4.6.2 Lösungen und Puffer für die Immunhistologie10x PBS-Puffer

Natriumchlorid	80 g
Kaliumchlorid	2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat	14,2 g
Wasser	ad 1000 ml
pH 7,4	

Citrat-Puffer 10 mM

Lsg. A: 10,5 g Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_6O_7 \cdot H_2O$) in 0,5 l Wasser gelöst

Lsg. B: 29,41 g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat in 1 l Wasser gelöst

18 ml Lsg. A + 82 ml Lsg. B + 1 l Wasser

pH 6,0; die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Tris-HCl-Puffer

Tris HCl	0,9 g
Trizma Base	6,85 g
NaCl	8,75 g
Wasser	ad 1000 ml
pH 7,5	

Eosin-Lösung

1 g Eosin wurde in 1 l Wasser gelöst, filtriert und anschließend wurden 10 Tropfen Eisessig hinzugefügt. Vor Gebrauch wurden 2 Tropfen Eisessig/200 ml hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte dunkel bei RT.

4.6.3 Lösungen für die Zellkultur

Verapamil-Lösung

Verapamilhydrochlorid wurde als 5 mM Stock in Wasser angesetzt und bei RT gelagert.

Hoechst-Lösung

BisBenzimide H 33342 Trihydrochlorid wurde als 1 mg/ml Stock in Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Gemcitabin-Lösung

Gemcitabin wurde als 30 mg/ml Stock in PBS gelöst und anschließend weiter in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert und einmal die Woche frisch angesetzt.

Cyclopamin-Lösung

Cyclopamin wurde jedes Mal frisch als 10 mM Stock in 96 % Ethanol hergestellt.

Curcumin-Lösung

Curcumin wurde als 100 mM Stock in DMSO angesetzt und die Aliquots bei -80 °C gelagert.

FACS-Puffer

BSA	5 g
Natriumazid 10%ig	2 ml
PBS	ad 1000 ml
pH 7,2	

4.7 Medien und Zusätze für die Zellkultur

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM 1 g/l D-Glucose	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glutamax	Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Hepes	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
MEM NEAA	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
MEM Vitamine	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PBS	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin Streptomycin	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Pferdeserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

4.8 Zelllinien

Die Zelllinien wurden regelmäßig durch PCR auf Mycoplasmen-Freiheit untersucht.

4.8.1 Auswahlkriterien für die Zelllinien AsPC-1 und L3.6pl

Für die Untersuchung des Pankreaskarzinoms gab es eine große Auswahl an Zelllinien. Um die Arbeit möglichst realitätsnah zu gestalten und für potentielle medizinische Anwendungen eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu gewährleisten, kamen lediglich humane Zelllinien in Betracht. Eine Auswahl stellten BxPC-3^[127], Capan-2^[128], MIAPaCa-2^[129], Panc-1^[130], Panc-2.03^[131], Panc-2.13^[131], Panc-3.27^[131], Panc-4.21^[131], Panc-5.04^[131], Panc-6.03^[131], Panc-8.13^[131], Panc-10.05^[131], PL45^[131], HPAC^[132], MPanc-96^[133], NOR-PI^[134], SW1990^[135], SU 86.86^[136], CFPAC-1^[137], HPAF II^[138], Hs766T^[139], COLO 357^[140], FG^[140], L3.3^[141], L3.6sl, L3.6pl^[142], Capan-1^[143], AsPC-1^[144], Ger^[145], IMIM-PC2^[146], MDAPanc3^[147], PSN1^[148], SK-PC1^[146] und T3M4^[149] dar. Zelllinien welche ihren Ursprung in primären humanen Pankreaskarzinomen haben wurden ausgeschlossen. Diese haben keinen metastasierenden Prozess durchgemacht, der vermehrt zu einer Akkumulation genetischer Läsionen führt, welche für das metastatische Potential und die Aggressivität des Tumors mitverantwortlich sind. Solch eine Progression findet in den meisten Krankheitsverläufen statt. So reduzierten sich die Zelllinien auf NOR-PI, SW1990, SU 86.86, CFPAC-1, HPAF II, Hs766T, COLO 357, FG, L3.3, L3.6sl, L3.6pl, Capan-1, AsPC-1, MDAPanc3 und T3M4. Da die somatische Mutation von K-RAS sehr früh im Krankheitsverlauf erfolgt^[22], jedoch bei den Zelllinien COLO 357, L3.3, Hs766T, NOR-P1,

SW1990 und T3M4 nicht nachgewiesen werden konnte^[150, 151], wurden diese ausgeschlossen. Zudem wiesen MDAPanc3 eine K-RAS^{GCT} ^[151], CFPAC-1 und Capan-1 eine K-RAS^{GTT} ^[152] Punktmutation auf, welche klinisch eher selten sind und letztere mit einem vergleichsweise besseren Überleben assoziiert wurde^[19, 153, 154].

Ebenso ist eine erhöhte Amplifikation des ErbB2 Gens in der Entwicklung des humanen Pankreaskarzinoms eine frühe und häufige genetische Alteration^[22]. Da diese bei den Zelllinien L3.6sl, HPAF II und SU86.86 nicht auftrat^[150] verblieben die Zelllinien L3.6pl^[150] und AsPC-1^[155]. Da EGFR und BRAF Mutationen im sporadischen Pankreaskarzinom seltener auftreten^[154] wurden diese ebenfalls überprüft. Weder AsPC-1 noch L3.6pl wiesen eine solche auf^[150, 156-158].

Interessanterweise wies die Mutterzelllinie von L3.6pl, COLO 357, keine K-RAS Mutation auf. So wurde angenommen, dass diese erst durch die wiederholten *in vivo* Passagen bei der Etablierung der Zelllinie selektioniert wurde^[150]. Ein weiteres Entscheidungskriterium war, dass ihre Selektionierung durch Pankreas-Leber Passage tumorbilologisch sehr realistisch erschien (im Gegenteil zu einer Selektionierung mittels artifizieller Milz-Leber Passage wie bei L3.6sl). Aufgrund dessen, der regelhaften starken Metastasierung *in vivo* und des sehr aggressiven Wachstums bot sich die Zelllinie L3.6pl als ideales Modell eines äußerst aggressiven Pankreaskarzinoms mit akquirierter K-RAS Mutation für unsere Versuche an.

4.8.2 Humane Pankreasadenokarzinomzelllinien FG und L3.6pl

Die Zelllinien FG und L3.6pl wurden von Frau Prof. Dr. Bruns aus der Experimentellen Chirurgie des Klinikums Grosshadern in München bezogen. Die Zelllinien COLO 357, FG, L3.3, L3.6sl und L3.6pl sind genetisch eng verwandte Zelllinien mit einem zunehmend invasiven und metastatischen Potential^[150]. COLO 357 wurde von Morgan et al. etabliert und stammt von einer Lymphknotenmetastase einer 77-jährigen Patientin mit Adenokarzinoma ab, deren neoplastische Bereiche teilweise von differenzierten, Mucin-enthaltenden Pankreasgängen durchsetzt waren^[140]. Eine schnell wachsende Variante von COLO 357, FG (*fast growing*), wurde von Vezeridis et al. in die Milz von Nacktmäusen injiziert^[141]. Die *in vivo* isolierten Zellen, als L3.3 benannt, führten im Vergleich zu COLO 357 vermehrt zu Leberläsionen. L3.3 Zellen wurden von Bruns et al. zur Selektion von hoch metastatischen humanen Pankreaskrebszellen in die Bauchspeicheldrüse (pl = *pancreas-liver*) beziehungsweise in die Milz (sl = *spleen-liver*) von Nacktmäusen injiziert (Abbildung 10). Die spontan daraus resultierenden Lebermetastasen wurden in Kultur genommen und als L3.4pl/L3.4sl deklariert. Diese Zellen wurden erneut in das Pankreas bzw. in die Milz von Nacktmäusen injiziert und die daraus resultierenden Lebermetastasen in Kultur genommen.

Nach weiteren drei Selektionszyklen wurden die daraus generierten Zelllinien L3.6pl/L3.6sl benannt^[142]. Die epithelialen, gut differenzierten L3.6pl Zellen wachsen *in vitro* als Monolayer.

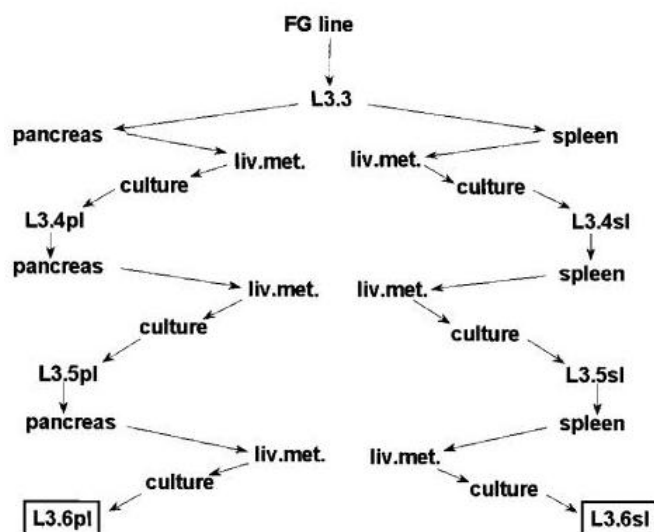


Abbildung 10: *In vivo* Selektion von hoch metastatischen, humanen Pankreaskarzinomzelllinien (nach Bruns et al. ^[142])

Aus der schnell wachsenden FG-Variante der Mutterzelllinie COLO 357 wurde durch mehrfache Passagen im Nacktmausmodell mittels Pankreasinjektionen die hochgradig metastatische Zelllinie L3.6pl selektiert.

4.8.3 Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie AsPC-1

Einige Experimente wurden mit der Zelllinie AsPC-1 durchgeführt. Diese Zelllinie ist käuflich erwerbbar und wurde von ATCC bezogen. Die gering differenzierte^[159], stark metastasierende^[160] Zelllinie AsPC-1 wurde aus einer Peritonealmetastase (Aszites) einer 62-jährigen Patientin mit einem Pankreaskopfkarcinom generiert^[144]. Sie wächst *in vitro* als Monolayer in epitheloiden Kolonien. Die Tumore produzierten CEA, *human pancreas specific antigen*, *human cancer-associated antigen* und in geringem Maße Mucin^[144].

4.8.4 Humane Pankreasadenokarzinomzelllinie MIA PaCa-2

Diese Zelllinie ist käuflich erwerbbar und stammt aus einem duktalem Pankreaskarzinom eines Patienten^[129]. Sie wurde ebenfalls von ATCC bezogen.

4.8.5 Magenkarzinomzelllinie GC38

Die Magenkarzinomzelllinie GC38 wurde als Positivkontrolle für die CD133 Antikörperfärbung verwendet, da der CD133-Gehalt dieser Zelllinie über 90 % beträgt. Sie wurde aus frischem Patientengewebe gewonnen und uns freundlicherweise von Frau Dr. van den Engel aus der Experimentellen Chirurgie des Klinikums Grosshadern in München zur Verfügung gestellt.

4.9 Patientenproben

Die aus Patientengewebe gewonnenen Proteinlösungen wurden von der HTCR-Gewebebank (*human tissue and cell research*), einer gemeinnützigen Stiftung bürgerlichen Rechts aus Regensburg, bezogen. Die Proteine wurden mittels Trizol isoliert und in 1 % SDS gelöst.

4.10 BALB/c nu/nu Mäuse

Für das orthotope Pankreastumormodell wurden männliche immundefiziente BALB/c nu/nu Mäuse von Charles River verwendet (Charles River, WIGA, Sulzfeld, Deutschland). Die Mäuse wurden in Käfigen in einer Sterilbank unter speziellen pathogenfreien Bedingungen im Institut für chirurgische Forschung (Walter Brendel Institut, München, Deutschland) gehalten. Zur Akklimation wurden die Tiere für mindestens eine Woche unter Quarantäne gehalten. Futter (Standard 1320 und 1430, Altromin, Lange, Deutschland) und angesäuertes Wasser (pH 2,5 – 3,0) waren *ad libitum* verfügbar. Es wurde eine regelmäßige Überwachung der Gesundheit durchgeführt. Die Mäuse wurden ab einem Alter von 8-12 Wochen in Versuch genommen.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Nr. 55.2-1-54-2531-19-08).

4.11 Geräte

Produkt

Affymetrix GeneChip Scanner 3000

Agilent Bioanalyser

Autoklav Unisteri

Autoklav Varioklav

AxioCam MRc5 Kamera

BD-LSRII

Casting frame

Hersteller

Affymetrix Inc, Santa Clara, USA

Agilent Technologies Deutschland GmbH,
Böblingen, Deutschland

MMM Münchener Medizin Mechanik GmbH,
München, Deutschland

H+P Labortechnik GmbH, Hackermoos,
Deutschland

Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Bio-Rad Laboratories GmbH, München,
Deutschland

Produkt**Hersteller**

Casting stand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Hera Cell	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Einbettautomat Tissue-Tek TEC	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Entwicklerkassette	Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Färbeküvette	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage FX40	A&D Company, Tokyo, Japan
FluidicStation F450	Affymetrix Inc, Santa Clara, USA
Gefrierkassette Nalgene	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C Herafreeze	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Geldokumentationssystem	Weiss Imaging and solutions GmbH, Bergkirchen, Deutschland
Gelelektrophoresesystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Histomat 2065/2LZ/Di	Bavimed Laborgeräte GmbH, Birkenau, Deutschland
Horex Digital Taschenmessschieber	Hoffmann GmbH, München, Deutschland
Injektor	Hamilton, Reno, USA
Kamm für Agarose-Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kamm für SDS-Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach, Deutschland
Laufkammer für Agarose-Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Laufkammer für SDS-Gel	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
LSRII	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Produkt**Hersteller**

Mikrotom RM2255	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Siemens AG, Berlin, Deutschland
Millipore-Anlage MilliQ A10	Millipore Corporation, Billerica, USA
MoFlo	Beckmann coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Nanodrop Spektrophotometer	NanoDrop products, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
PCR Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments Ltd, Bedfordshire, UK
Pipettus	IBS INTEGRA BIOSCIENCES, Fernwald, Deutschland
PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage 440-21N	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Röntgenfilmentwickler Agfa Curix 60	Agfa Graphics GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Deutschland
Short plates für Proteingele 1 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spacer plates für Proteingele 1 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Spülmaschine Professional G 7883	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Stickstoffbehälter	Cryo Solutions, Hertogenbosch, Niederlande
TB1 Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Transferzelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
VersaMax tunable microplate reader	Molecular devices, Sunnyvale, USA
Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wärmeschrank 37 °C	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Wärmeschrank 60 °C	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Produkt

Wasserbad

Wipptisch WT16

Zentrifuge 5417R

Zentrifuge Rotina 420 R

HerstellerJulabo Labortechnik GmbH, Seelbach,
Deutschland

Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Andreas Hettich GmbH & Co. KG,
Tuttlingen, Deutschland**4.12 Verbrauchsmaterialien****Produkt**

96-Well Platte

Chromatographie-Papier

Deckgläschen

Einbett-Kassette Rotilabo

Einwegskalpell

Faltenfilter

Gazetupfer

Gewebeeinbettmittel Histo-Comp

Hybond-P Membran

Hyperfilm ECL

Kryo Röhrchen

Mikrotom-Klinge

Nahtmaterial

Objektträger SuperFrost Plus

HerstellerNunc, Thermo Electron LED GmbH,
Langenselbold, Deutschland

Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig,
DeutschlandCarl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe,
Deutschland

Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel,
DeutschlandNOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG,
Wetter, DeutschlandVogel GmbH & Co. KG, Giessen,
DeutschlandAmersham Biosciences Europe GmbH,
Freiburg, DeutschlandAmersham Biosciences Europe GmbH,
Freiburg, DeutschlandNunc, Thermo Electron LED GmbH,
Langenselbold, DeutschlandFeather safety razor co., LTD., Osaka,
JapanB. Braun Melsungen AG, Melsungen,
DeutschlandMenzel GmbH & Co KG, Braunschweig,
Deutschland

Produkt

Pap Pen

Reaktionsgefäß 1,5 ml und 2 ml

Röhrchen 15 ml

Röhrchen 50 ml

Rundbodenröhrchen 5 ml

Rundbodenröhrchen mit 35 µm Filterdeckel

Serologische Pipetten Costar

Spritzen

Sterilfilter 0,45 µM

Syringe

Wattestäbchen

Zellkulturflaschen EasyFlasks

Zellschaber

HerstellerDakoCytomation GmbH, Hamburg, Glostrup,
Dänemark

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Techno Plastic Products AG, Trasadingen,
Schweiz

BD Biosciences, Mississauga, Canada

BD Biosciences, Mississauga, Canada

BD Biosciences, Mississauga, Canada

Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland

BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

BD Biosciences, Mississauga, Canada

BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG,
Wetter, DeutschlandNunc, Thermo Electron LED GmbH,
Langenselbold, DeutschlandTechno Plastic Products AG, Trasadingen,
Schweiz**4.13 Software****Produkt**

Adobe Acrobat 6.0

Axio Vision 4.6

Bioconductor

CellQuest Pro

EndNote X2

Flow Jo 8.8.6

Gel-pro analyzer 4.0

ImageJ

MicroRNA.org Release August 2010

Hersteller

Adobe Systems Inc., San Jose, USA

Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

Bioconductor-Community for the analysis
and comprehension of genomic data

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Thomson Reuters Deutschland GmbH,
Frankfurt, Deutschland

Treestar Inc., Ashland, USA

Weiss Imaging and solutions GmbH,
Bergkirchen, DeutschlandImageJ1.43u, Wayne Rasband, National
Institutes of Health, USAMemorial Sloan-Kettering Cancer center,
New York, USA

Produkt

Microsoft Office 2003

Origin 6.0

Softmaxpro 5.2

Summit 4.3

Windows XP Professional

Hersteller

Microsoft Corporation, Redmond, USA

Microcal Software Inc. Northampton, USA

Molecular devices, Sunnvale, USA

Beckmann coulter GmbH, Krefeld,

Deutschland

Microsoft Corporation, Redmond, USA

5 Methoden

In diesem Kapitel sind alle Methoden aufgelistet, welche während dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

5.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank und sterilen Konditionen durchgeführt. Vor Benutzung wurde die Werkbank 15 min mit UV-Licht bestrahlt und eine Vorlaufzeit von 30 min abgewartet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und in einem feuchten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kultivationsmedium wurde, falls nicht anders erwähnt, DMEM (1g/l D-Glucose) mit 10 % FBS, 2 % Vitaminen, 2 % NEAA, 2 % Glutamax und 1 % PS verwendet. MIA PaCa-2 wurden in DMEM (1g/l D-Glucose) mit 2,5 % Pferdeserum, 2 % Glutamax, 1 % PS und 12 % Hepes kultiviert.

5.1.1 Kultivation der Zellen

Zu Beginn wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurde Trypsin zugegeben und die Flasche anschließend für 3 min bei 37 °C inkubiert. Durch leichtes Klopfen mit der Handfläche gegen die Flasche lösten sich die Zellen ab. Reichte dies nicht aus, empfahl sich vor dem Ablösen der Zellen ein zweiter Waschschrift mit PBS oder die Verwendung eines Zellschabers. Daraufhin wurde Zellkulturmedium zugegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und ein Aliquot (entsprechend dem Splitverhältnis) in eine neue Flasche mit bereits vorgelegtem Medium gegeben und durch Schwenken nach oben und unten bzw. nach rechts und links gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden bei einer Dichte von ca. 70 %-80 % zweimal in der Woche gesplittet, Mediumwechsel erfolgte dreimal in der Woche.

5.1.2 Einfrieren der Zellen

Die Kryo Röhrrchen wurden mit Zelllinie, Passagenummer, Datum und Initialien beschriftet. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und in Medium resuspendiert. Das Zählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Je 1-2 x 10⁶ Zellen wurden bei 300 g 5 min lang abzentrifugiert und in FBS mit 10 % DMSO aufgenommen. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Kryo Röhrrchen pipettiert und sofort in die mit Isopropanol

gefüllte Gefrierkassette gegeben. Um ein langsames Einfrieren der Zellen ($-1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$) zu gewährleisten, wurde die Gefrierkassette für 24-96 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.1.3 Auftauen der Zellen

Das Kryo Röhrchen wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad inkubiert, bis die Zellen unter leichtem Schwenken gerade aufgetaut waren. Daraufhin wurden sie sofort in eine Zellkulturflasche mit Medium gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Am nächsten Tag erfolgte zur Beseitigung des DMSO ein Mediumwechsel.

5.1.4 Erstellen Chemotherapie-resistenter Zellen

Für diese Arbeit wurden sowohl Gemcitabin-, als auch 5-FU-resistente Zellen der Linie L3.6pl generiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen kontinuierlich mit dem Chemotherapeutikum in steigender Konzentration behandelt. Bei Gemcitabin wurde mit $0,5\text{ ng/ml}$ begonnen und die Konzentration bis hin zu $7,5\text{ ng/ml}$ gesteigert, bei 5-FU wurde mit $0,18\text{ }\mu\text{g/ml}$ begonnen und die Konzentration bis hin zu $0,54\text{ }\mu\text{g/ml}$ gesteigert. Durch diesen dauerhaften Selektionsdruck konnte die Resistenz auf das jeweilige Chemotherapeutikum erhöht werden.

5.1.5 IC_{50} Bestimmung mittels Zell-Proliferationsassay

Die IC_{50} der Zellen wurde mit Hilfe des TACS MTT Zell-Proliferationsassays von R&D Systems bestimmt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben, die Auswertung mittels eines VersaMax Mikroplattenlesers und der Analysesoftware Softmaxpro 5.2. Es wurden 8.000 Zellen pro 96-Well ausgelegt. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit dem entsprechenden Therapeutikum in einer ausgewählten Konzentrationsreihe und nach weiteren 24 h die Auswertung.

5.1.6 Behandlung mit 5-FU, Rapamycin und Cyclopamin

Für Untersuchungen zum Ansprechen der SP-Zellen auf Stammzell-Signalweg-Inhibitoren in Kombination mit 5-FU wurden $\sim 60\%$ konfluente Zellen für 24 h mit $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 5-FU, 100 ng/ml Rapamycin oder $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ Cyclopamin inkubiert.

5.1.7 Behandlung mit Curcumin

Zur Behandlung mit Curcumin wurden ~60 % konfluente Zellen für 24 h mit 50 μ M Curcumin versetzt und anschließend für die weiteren Versuche verwendet. Als Kontrolle wurde entsprechend 0,05 % DMSO verwendet.

5.2 Durchflusszytometrie

5.2.1 Hoechst-Färbung und Analyse

Die Hoechst Färbung der Zellen wurde optimiert und mit einigen kleinen Änderungen, basierend auf dem Protokoll von Goodell et al.^[121] durchgeführt. 1 Millionen Zellen/ml wurden in 37 °C warmen DMEM mit 2 % FBS aufgenommen und für 60 Minuten bei 37 °C mit 2,6 μ g/ml Hoechst gefärbt. Als Kontrolle diente 225 μ M Verapamil, ein ABCG2-Inhibitor. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C und 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, in eiskaltem PBS mit 2 % FBS resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bzw. Antikörperfärbung bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Vereinzelung der Zellen, um ein Verstopfen der Geräte zu vermeiden, erfolgte durch Filtration. Zur Analyse wurden 10 μ g/ml Propidiumiodid zugegeben um tote Zellen anzufärben. Die Analyse erfolgte mittels eines BD-LSRII, das Herausortieren der Zellen mittels eines MoFlo von Beckman Coulter. Der Hoechstfarbstoff wurde bei 355 nm (UV) angeregt und die Fluoreszenz bei zwei Wellenlängen gemessen. Dazu wurden ein 450/50 nm Bandpassfilter (blau) und ein 670/30 nm Langpass-Kantenfilter (rot) verwendet. Die Side-Population stellte sich als schöner, von der Non-Side-Population abzweigender Schweif dar, welcher in den linken unteren Quadranten mündete.

5.2.2 Antikörper-Färbungen und Analyse

Die Zellen wurden gezählt, in FACS-Puffer gewaschen und nach Herstellerangaben mit Fluoreszenz-konjugierten Primärantikörpern gefärbt. Als Isotypkontrolle dienten Immunglobuline der Maus. Tote Zellen wurden mittels Propidiumiodidfärbung (10 μ g/ml) eliminiert. Die Proben wurden am FACS-Calibur Durchflusszytometer gemessen und die Daten mit CellQuest ausgewertet, bzw. am BD-LSRII Durchflusszytometer gemessen (in Kombination mit der Hoechstoffärbung) und die Daten mit FlowJo ausgewertet. Es wurden Minimum 20.000 Zellen vermessen.

5.3 Westernblot

5.3.1 Herstellung von Proteinlysaten

Nach Waschen der Zellen in eiskaltem PBS wurden diese in Complete Lysis-M Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis lysiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C und 20000 g für 10 min wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert.

5.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA. Dazu wurden 5 µl Proteinlysat bzw. Albumin Standard in 45 µl Wasser in einer 96-Well Platte verdünnt und anschließend 50 µl BCA Arbeitslösung (1 µl Lösung B + 49 µl Lösung A) zugegeben. Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C erfolgte das Auslesen der Platte in einem Mikroplattenleser. Die Auswertung wurde mit Softmaxpro durchgeführt.

5.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese PAGE

Zur Vorbereitung für die Elektrophorese wurden die Proteine mit Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend zur Separation auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur optischen Kontrolle der Proteinauftrennung im Gel wurde eine Protein-Leiter verwendet. Die Gele wurden nach folgender Anleitung hergestellt:

10%iges Trenngel

<u>Komponente</u>	<u>Volumen [ml]</u>
Wasser	1,9
Acrylamid / Bis Lösung 30 %	1,7
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3
10 % SDS	0,05
10 % APS	0,05
TEMED	0,002

12%iges Trenngel

<u>Komponente</u>	<u>Volumen [ml]</u>
Wasser	1,6
Acrylamid / Bis Lösung 30 %	2
1,5M Tris (pH 8,8)	1,3
10 % SDS	0,05
10 % APS	0,05
TEMED	0,002

Sammelgel

<u>Komponente</u>	<u>Volumen [ml]</u>
Wasser	0,68
Acrylamid / Bis Lösung 30 %	0,17
1M Tris (pH 6,8)	0,13
10 % SDS	0,01
10 % APS	0,01
TEMED	0,001

Zunächst wurden die *short plates* und *spacer plates* in den *casting frame* eingespannt und zur Befüllung im *casting stand* befestigt. Als Erstes wurde das Trenngel eingefüllt und bis zur Aushärtung mit Butanol abgedeckt. Nach Entfernung des Butanols wurde das Sammelgel eingefüllt und anschließend der Kamm eingesteckt.

Nach dem Transfer des Gels in die Laufkammer und Beladen des Gels erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 250V und 0,03A pro Gel.

5.3.4 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Nach Auftrennung der Proteine auf dem SDS-Gel wurden diese *semidry* auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu diesem Zweck wurden 3 in Transfer-Puffer getauchte Chromatographie-Papiere auf die Transferzelle gegeben und eine in Methanol getränkte PVDF Membran darüber gelegt. Das Proteingel wurde in Transfer-Puffer getaucht und auf die Membran gelegt, bevor es mit 3 weiteren mit Transfer-Puffer gesättigten Chromatographie-Papieren abgedeckt wurde. Der Blot erfolgte für 1 h bei 25 V und 150 mA pro Gel. Die vorgefärbte Protein-Leiter diente als Transferkontrolle.

5.3.5 Analyse der Proteinexpression

Zur Analyse der Proteinexpression auf der PVDF-Membran wurde diese 1-2 h bei RT in Blockierungs-Puffer geblockt, in TBST gewaschen und ÜN mit dem 1. Antikörper laut Angaben des Herstellers bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. Antikörper erfolgte in Blockierungs-Puffer nach Herstellerangaben für 2 h bei RT. Nach Waschen in TBST wurde das Luminogen (ECL Plus Western Blotting Detection System) nach Angaben des Herstellers auf die Membran pipettiert und die Membran anschließend, in eine Glasichtfolie gebettet, in eine Entwicklerkassette gegeben. Der Hyperfilm ECL wurde für eine entsprechende Zeitspanne lichtgeschützt aufgelegt und anschließend in einem Röntgenfilmentwickler entwickelt.

5.3.6 Strippen der PVDF-Membran

Um die gleiche PVDF-Membran erneut für die Analyse mit einem anderen Antikörper verwenden zu können (z.B. für einen direkten Vergleich zum *housekeeping* Gen) wurde der erste Antikörper von der Membran gestriipt. Dazu wurde die Membran in TBST gewaschen, 30 min in 50 °C warmen Strip-Puffer unter Schwenken inkubiert und erneut in TBST gewaschen, bevor die Membran in Blockierungs-Puffer geblockt wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in Analyse der Proteinexpression beschrieben.

5.4 Immunhistologie

5.4.1 Asservierung von Gewebeproben in Paraffinwachs

Nach Opferung der Tiere wurde das Tumorgewebe in Einbett-Kassetten gegeben, für 24 h in 4 % neutral gepufferter Formaldehydlösung inkubiert und anschließend 1 h unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin wurden die Proben im Histomaten in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 %), Xylol und Paraffinwachs dehydriert und zur weiteren Verarbeitung in Paraffinwachs gebettet.

5.4.2 Schneiden von Paraffinblöcken

Die Paraffinblöcke wurden auf einem Gefrierblock vorgekühlt und anschließend im Mikrotom bis zur gewünschten Stelle angeschnitten. Die Schnittdicke wurde auf 2-3 μm eingestellt und die Schnitte nach Abnehmen in ein kaltes Wasserbad zum Strecken der Schnitte gegeben. Anschließend wurden die Schnitte in ein 37 °C Wasserbad überführt, auf einem Objektträger aufgenommen und ÜN in einem 37 °C Wärmeschrank getrocknet.

5.4.3 Hämalaun- und Eosin-Färbung

Die Hämalaun- und Eosin-Färbung diente zur Färbung des Zellkerns mit Hämalaun und des Cytoplasmas mit Eosin. Zur Deparaffinierung und Rehydrierung wurden die Gewebeschnitte 10 min bei 60 °C im Brutschrank und anschließend in Neoclear, 100 %, 96 % und 70 % EtOH inkubiert. Nach Waschen in Milliporewasser wurden die Schnitte zur progressiven Färbung in Mayers Hämalaun getaucht und anschließend kurz in Milliporewasser. Die regressive Färbung erfolgte in Eosin. Daraufhin wurde in 80 % EtOH differenziert um die Schnitte anschließend in 90 %, 96 % EtOH, 100 % EtOH und Neoclear zu dehydrieren. Die noch feuchten Schnitte wurden mit Eukitt bedeckt und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt.

Die Auswertung der nekrotischen Tumorareale erfolgte mit ImageJ. Dazu wurde die Gesamtpixelzahl des Tumors ins Verhältnis zur Pixelzahl der nekrotischen Areale gesetzt.

5.4.4 Ki-67 Zellproliferations-Färbung

Zur Deparaffinierung und Rehydrierung wurden die Objektträger zunächst bei 60 °C und anschließend in Neoclear, 100 %, 96 %, 70 % EtOH und Milliporewasser inkubiert. Die Demaskierung erfolgte durch Kochen der Schnitte in Citrat-Puffer. Nach Abkühlen wurden die Objektträger in Tris-HCl-Puffer getaucht. Durch Inkubation in 0,25 % Triton-X-100 in Tris-HCl und anschließend Tris-HCl erfolgte die Permeabilisierung. Daraufhin wurden die Proben in PBS gewaschen. Nach einem Serumblock (8 % Serum in PBS mit 3 % BSA) und Waschen in PBS wurde der Avidin/Biotin Block nach Herstellerangaben durchgeführt, bevor der Erstantikörper nach Angaben des Herstellers appliziert wurde. Daraufhin erfolgte ein endogener Peroxidaseblock in 3 % Wasserstoffperoxid gefolgt von Waschen unter fließendem Leitungswasser und anschließend in PBS. Der zweite biotinylierte Antikörper wurde gemäß Herstellerangaben, verdünnt in PBS mit 3 % BSA, appliziert, bevor erneut in PBS gewaschen wurde. Anschließend wurde der ABC-Komplex laut Angaben des Herstellers verwendet, um dann mit DAB+ zu entwickeln. Eine Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalaun. Die noch feuchten Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

5.5 Orthotopes Pankreastumormodell

Für die *in vivo* Injektion wurden die Zellen in PBS aufgenommen. Männliche athymische BALB/c nu/nu Mäuse wurden mit 100 mg/kg Körpergewicht Ketavet und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin narkotisiert. Die Prämedikation erfolgte mittels Atropinsulfat.

An der linken abdominalen Flanke wurde ein kleiner Schnitt vorgenommen, um die Milz aus dem Abdomen zu luxieren (Abbildung 11A). 1×10^5 Tumorzellen wurden in 40 μ l PBS mit Hilfe einer 30-Gauge Nadel, einer 1 ml Einwegspritze und einem kalibrierten Injektor subkapsulär in die Region der Bauchspeicheldrüse unterhalb der Milz injiziert (Abbildung 11B). Eine erfolgreiche subkapsuläre intrapankreatische Injektion der Tumorzellen zeichnete sich durch eine Flüssigkeitsblase ohne intraperitoneales Leck aus (Abbildung 11C). Um einem solchen Auslaufen vorzubeugen, wurde ein Wattestäbchen für 1 min auf die Injektionsstelle gehalten. Die abdominale Wunde wurde durch eine chirurgische Naht verschlossen. Der chirurgische Eingriff wurde von den Tieren gut vertragen und es kam zu keinem Anästhesie-bedingten Tod der Tiere. Das Tumorwachstum wurde durch regelmäßige Palpation überwacht. Zu Versuchsende wurden die Tiere nach erneuter Narkose geopfert und auf ihre orthotopen Tumore, Lymphknoten- und Lebermetastasen hin untersucht. Das Tumolvolumen (V) wurde durch die Formel $V = a \times b \times c \times 0,52$ berechnet, wobei a, b und c die Länge, Breite und Höhe des Tumors repräsentieren.

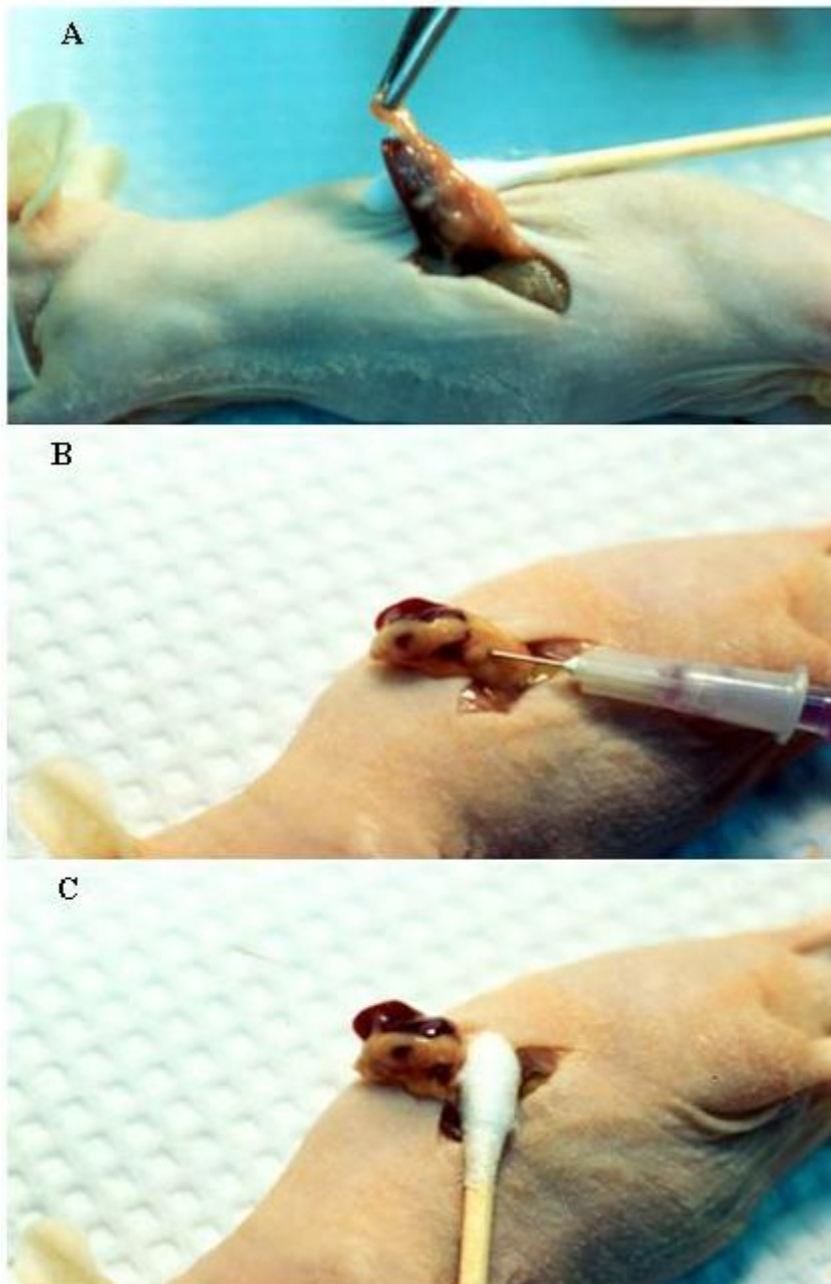


Abbildung 11: Orthotope Tumorzellinjektion (entnommen aus der Dissertation von I. Ischenko^[161])

Nach Exteriorisation der Milz (A) wurden die Zellen subkapsulär in die Region der Bauchspeicheldrüse injiziert (B). Eine erfolgreiche Injektion war anhand einer Flüssigkeitsblase ohne Leck erkennbar (C).

5.6 Molekularbiologie

5.6.1 Mycoplasmennachweis

Der Nachweis von Mycoplasmen in der Zellkultur erfolgte mittels PCR. Dazu wurden die Zellen drei Tage lang ohne Medienwechsel inkubiert, bis die Zellen nahezu konfluent waren. 1 ml des Medienüberstandes wurde abgenommen, 4 min bei 4 °C und 950 g zentrifugiert, 100 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend 5 min bei 96 °C inkubiert. Bis zur PCR wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Folgender PCR-Ansatz wurde verwendet:

Wasser (DNAse frei)	19,95 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
Nukleotid Mix	0,5 µl
<i>Forward primer</i> (100 µM)	0,1 µl
<i>Reverse primer</i> (100 µM)	0,1 µl
Taq Polymerase	0,1 µl
Probe	1 µl

Als Proben dienen die gesammelten Zellkulturüberstände, als Negativkontrolle Wasser und als Positivkontrolle ein bereits positiv getesteter Zellkulturüberstand.

Folgendes Programm wurde verwendet:

Denaturierung		94 °C 2 min
35 Zyklen einstellen, je Zyklus		
Denaturierung	} 1 Zyklus	94 °C 30 s
<i>Primer annealing</i>		55 °C 30 s
Amplifikation		72 °C 30 s
Abkühlen		4 °C

Zur Auftrennung im Agarosegel wurde Ladepuffer hinzugefügt und je 10µl auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Nach 60 min Laufdauer bei 100 V, 200 mA und 50 W erfolgte die Auswertung unter UV-Licht. Die Proben wurden als Mycoplasmen-positiv angesehen, wenn im Gel auf gleicher Höhe der Positivkontrolle eine Bande zu sehen war (Größe 290 bp).

5.6.2 Affymetrix Genchip Analyse

Die Analyse mittels Affymetrix Genchip wurde in vier voneinander unabhängig gewonnenen Quadruplikaten durchgeführt.

5.6.2.1 RNA Isolation

Unmittelbar nach dem Sortieren der Zellen mit Hilfe des MoFlo in eiskaltes PBS mit 2 % FBS wurden die Zellen bei 4 °C für 5 min und 300 g zentrifugiert, in Trifast resuspendiert und bis zur Isolation bei -80 °C gelagert. Die Gesamt-RNA wurde nach Standardprotokoll aus der Trifast-Suspension isoliert. Da die geringen, von der SP-Fraktion abstammenden RNA-Mengen mit Resten von Trifast verunreinigt waren, wurden diese durch ein Extraktionsverfahren mit N-Butanol aufgereinigt.^[162] Danach wiesen die RNA-Proben eine ausreichende Reinheit und Integrität für die Microarray Hybridisierung auf, welche durch Spektrophotometrie (Nanodrop) und Elektrophorese (Agarose Gelelektrophorese und Agilent Bioanalyzer) ermittelt wurden.

5.6.2.2 Microarray Hybridisierung

100 ng der Gesamt-RNA wurden für die Herstellung *gelabelter* cDNA Fragmente verwendet, welche auf einen Affymetrix HuGene 1.0 ST Microarray hybridisiert wurden. Im Detail wurde die Gesamt-RNA zunächst revers in cDNA transkribiert und anschließend in cRNA, welche erneut revers transkribiert, fragmentiert und zum Schluss *gelabelt* wurde. Für alle genannten Schritte wurde das GeneChip WT sense target labeling Kit laut Herstellerangaben verwendet. Die *gelabelten* Proben wurden auf einen HuGene ST 1.0 Array in einer Endkonzentration von 25 ng/µl für 16 h bei 45 °C hybridisiert. Gefärbt und gewaschen wurde der Array mit einer FluidicStation F450.

5.6.2.3 Datenanalyse

Der vollständig durchgeführte Microarray wurde gescannt und die CEL-Dateien in den Bioconductor R Workspace eingelesen^[163]. Dabei wurde das R Paket xps zur Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Qualitätskontrolle verwendet. Das xps Paket stellt eine Adaption der RMA Normalisierung^[164] zum Gen ST 1.0 Array zur Verfügung. Nach der Normalisierung wurden die differentiell exprimierten Gene durch zu Hilfenahme des R-Paketes LIMMA^[165] identifiziert. Dazu wurde ein moderierter T-Test mit Benjamini-Hochberg

Adjustierung verwendet und lediglich p-Werte unter 0,01 beachtet. Die differentielle Expression wurde des Weiteren auf einen \log_2 fold change größer 1 beschränkt.

5.7 Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des *paired student`s t-test* oder des ANOVA Test von Microcal Origin. Ab $p < 0.05$ wurde ein Ergebnis als signifikant betrachtet.

6 Ergebnisse

6.1 Identifizierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom

Zur Identifizierung potentieller tumorinduzierender Zellen, sogenannter Tumor- oder Krebsstammzellen, wurde die Hoechst 33342 Färbung verwendet. Bei diesem Verfahren wird eine Subpopulation von Zellen identifiziert, im Nachfolgenden Side-Population Zellen (SP-Zellen) genannt, welche in der Lage ist, den Farbstoff Hoechst 33342 aus der Zelle auszuschleusen.

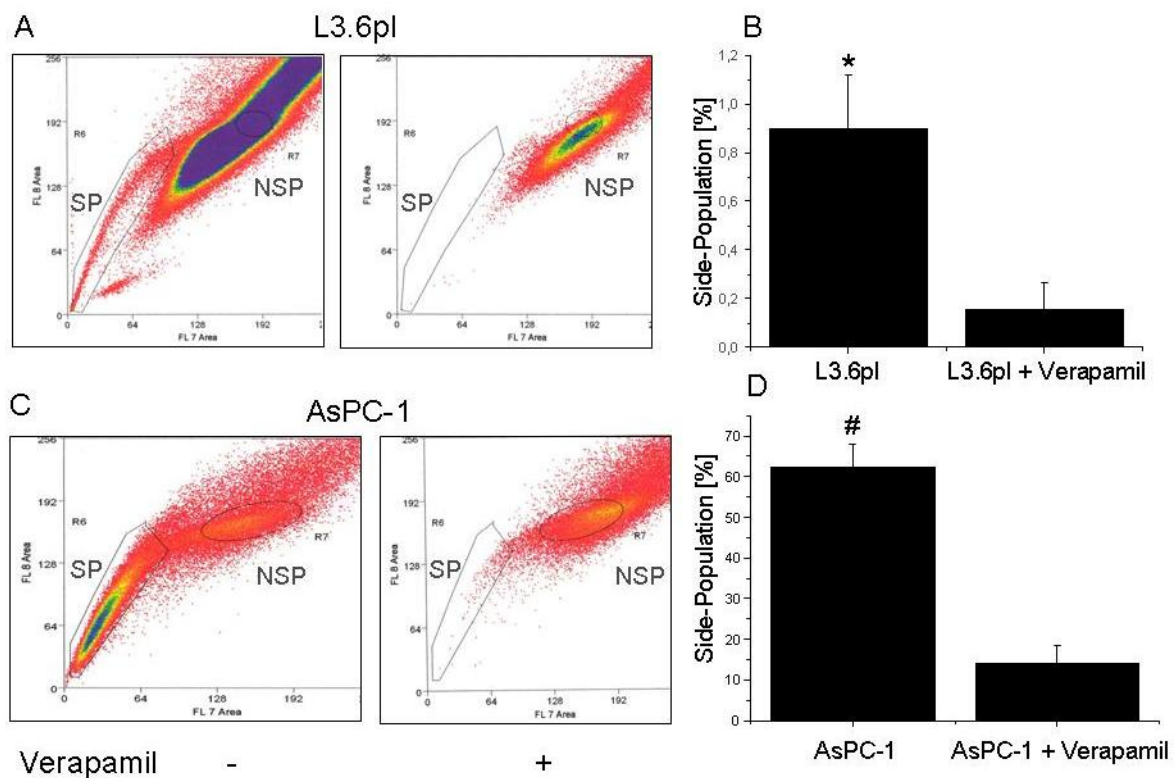


Abbildung 12: Side-Population-Gehalt in den Zelllinien L3.6pl und AsPC-1

Die beiden Pankreasadenokarzinomzelllinien L3.6pl (A, B) und AsPC-1 (C, D) wiesen beide einen bestimmten Prozentsatz an Side-Population Zellen auf. Dieser konnte durch Zugabe von Verapamil, einem ABCG2-Blocker, signifikant reduziert werden. In der Abbildung A und C ist die durchflusszytometrische Analyse anhand eines *density plots* dargestellt, welcher die Side-Population als einen, von der Hauptpopulation abzweigenden Schweif zeigt, in den Abbildungen B und D ist das zugehörige Balkendiagramm zu sehen. L3.6pl vs. L3.6pl + Verapamil $p^* < 5E^{-10}$; AsPC-1 vs. AsPC-1 + Verapamil $p^{\#} < 5E^{-9}$.

Diesem Mechanismus liegt in den meisten Fällen der *multidrug-efflux* Symporter ABCG2 zu Grunde. Zellen, welche diesen Mechanismus nicht aufweisen, akkumulieren den Hoechst-Farbstoff und werden Non-Side-Population Zellen genannt. Als Kontrolle diente Verapamil, ein ABCG2 *drug-efflux* Blocker.

Die hoch metastatische Pankreasadenokarzinomzelllinie L3.6pl wies einen SP-Anteil von $0,9 \% \pm 0,22 \%$ auf, der mittels Verapamil auf $0,16 \% \pm 0,11 \%$ reduziert werden konnte (Abbildung 12 A, B). Die Pankreasadenokarzinomzelllinie AsPC-1 wies einen ungewöhnlich hohen Anteil von $62,37 \% \pm 5,63 \%$ an Side-Population Zellen auf, welcher durch Verapamil auf $14,11 \% \pm 4,37 \%$ verringert werden konnte (Abbildung 12 C, D). Zur Bestimmung der intrinsischen Resistenz beider Zelllinien gegen 5-FU und Gemcitabin wurde deren IC_{50} ermittelt. L3.6pl zeigte gegen 5-FU eine IC_{50} von $0,1 \mu\text{g/ml}$ und gegen Gemcitabin eine IC_{50} von $6,11 \text{ ng/ml}$, AsPC-1 wies gegen 5-FU eine IC_{50} von $3 \mu\text{g/ml}$ auf und gegen Gemcitabin eine IC_{50} von $162 \mu\text{g/ml}$.

Zwei weitere humane Pankreaskarzinomzelllinien, MIA Paca-2 und FG, wiesen keine Side-Population Zellen auf.

6.2 Charakterisierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom

In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Side-Population Zellen Stammzellcharakteristika aufweisen. Dazu zählen das Potential zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung, sowie die Fähigkeit Tumore zu induzieren.

6.2.1 Das Potential der Side-Population zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung

Zwei Haupteigenschaften potentieller Krebsstammzellen sind die Fähigkeit sich selbst zu erneuern und zu differenzieren. Die Selbsterneuerung dient der Aufrechterhaltung der undifferenzierten Krebsstammzelle, die Differenzierung bildet die Grundlage für ein heterogenes Tumorwachstum. Um diese Fähigkeiten zu untersuchen, wurden SP- und NSP-Zellen der Zelllinien L3.6pl und AsPC-1 mittels eines durchflusszytometrischen Sortiergerätes, dem MoFlo, heraussortiert, für zwei Wochen erneut in Kultur genommen und nach zweimaligem Passagieren reanalysiert.

In der L3.6pl SP-Fraktion blieben $6,53 \% \pm 3,92 \%$ SP-Zellen erhalten, die restlichen $93,47 \% \pm 3,92 \%$ differenzierten zu NSP-Zellen aus (Abbildung 13 A), in der AsPC-1 SP-Fraktion blieben $58,45 \% \pm 0,96 \%$ SP-Zellen erhalten und $41,55 \% \pm 0,96 \%$ differenzierten zu NSP-

Zellen aus (Abbildung 13 B). Dies belegt die Differenzierungsfähigkeit von SP-Zellen zu NSP-Zellen. In der L3.6pl NSP-Fraktion entwickelten sich $0,98 \% \pm 0,33 \%$ SP-Zellen (Abbildung 13 A) und in der AsPC-1 NSP-Fraktion $49,11 \% \pm 0,8 \%$ SP-Zellen (Abbildung 13 B). Dieses Verhalten deutet auf ein Selbsterneuerungs- und ein starkes Proliferationspotential einiger weniger verbliebener SP-Zellen hin, gegebenenfalls auch auf ein Redifferenzierungspotential der NSP-Zellen zu SP-Zellen.

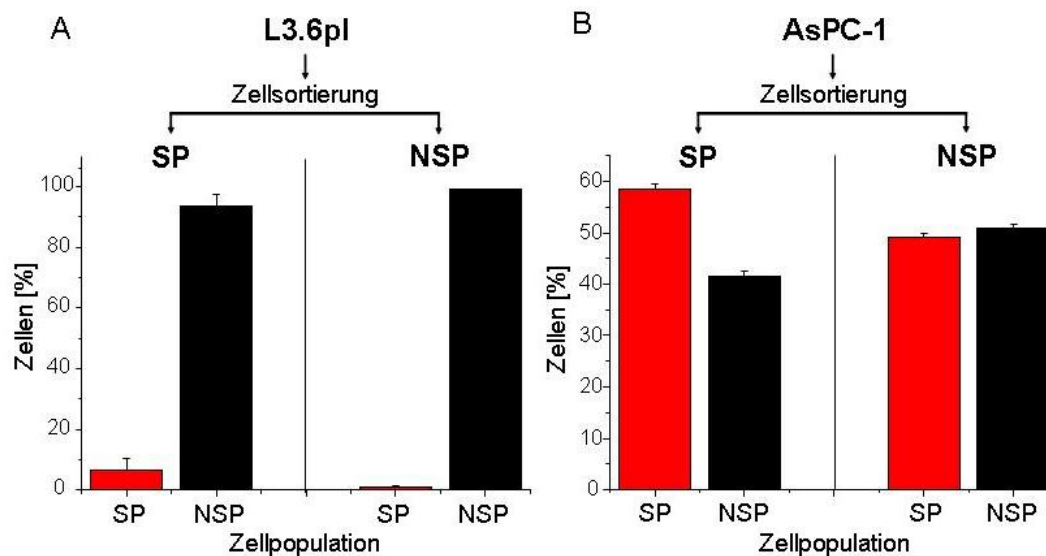


Abbildung 13: Reanalyse von SP- und NSP-Fractionen der Zelllinien L3.6pl und AsPC-1

Mittels Reanalyse konnte gezeigt werden, dass SP-Zellen der Zelllinien L3.6pl (A) und AsPC-1 (B) in der Lage sind, zu NSP-Zellen zu differenzieren. Ebenso war es möglich aus der NSP-Fraktion SP Zellen zu generieren.

6.2.2 Das Potential der Side-Population zur Tumorinduktion im orthotopen Pankreastumormodell

Die wichtigste Eigenschaft einer Krebsstammzelle stellt die Tumorinduktion dar. Dieses Potential wurde anhand eines orthotopen Pankreastumormodells evaluiert. Zu diesem Zweck wurden 1×10^5 SP-, NSP- und unsortierte Zellen in die subkapsuläre Region des Pankreas von athymischen BALB/c nu/nu Mäusen injiziert.

L3.6pl

Da die SP-Zellen der Zelllinie L3.6pl lediglich in sehr geringen Zellzahlen gewonnen werden konnten, wurden zwei separate Tierversuche durchgeführt.

Im ersten Tierversuch wurden von der Zelllinie L3.6pl sowohl SP-, NSP- als auch unsortierte Zellen in jeweils drei Tiere injiziert. Nach insgesamt vierundvierzig Tagen endete der Versuch.

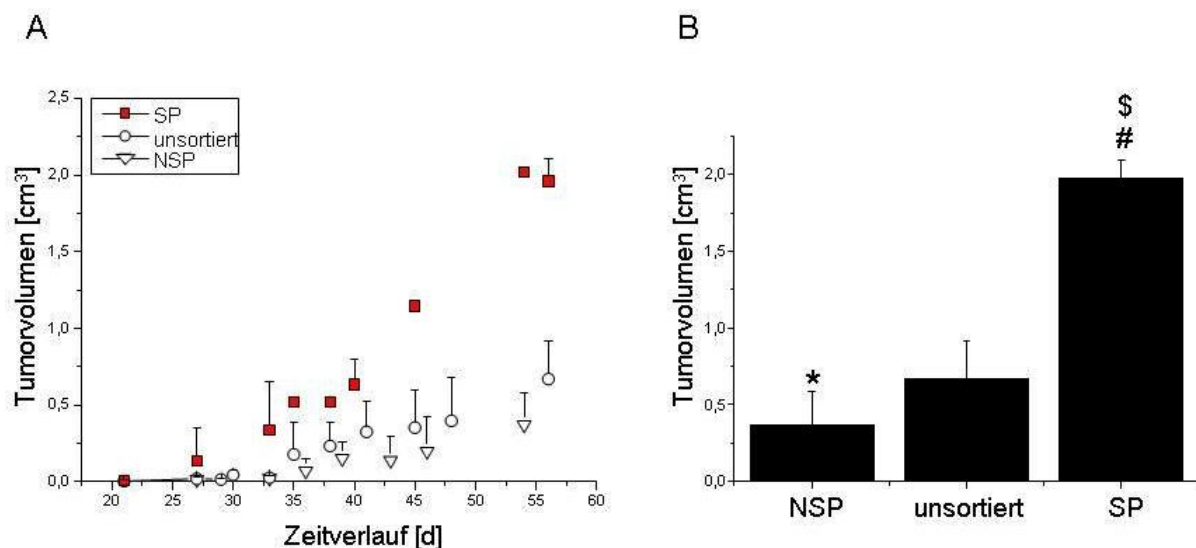


Abbildung 14: Tumorstadium von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von SP-, NSP- und unsortierten Zellen der Zelllinie L3.6pl

In Abbildung A ist das Tumorstadium im Zeitverlauf dargestellt, in Abbildung B das Tumorstadium zum Versuchsende. SP-induzierte Tumore nahmen ab Tag vierzig deutlich an Tumorstadium zu (A). Das Tumorstadium unterschied sich zum Versuchsende signifikant zwischen den Tumoren, welche von SP-, NSP- oder unsortierten Zellen abstammten (B). NSP vs. unsortiert $p^* < 0,05$; NSP vs. SP $p^\# < 5E^{-7}$; SP vs. unsortiert $p^\$ < 5E^{-7}$.

Betrachtet man das Tumorstadium im Zeitverlauf, so wuchsen die Tumore stetig, voran die durch SP-Zellen induzierten Tumore, gefolgt von den Tumoren der unsortierten Zellen und der NSP-Zellen. Zwischen Tag einunddreißig und vierunddreißig jedoch kam es im Vergleich zur Gruppe der NSP- und unsortierten Zellen zu einem sehr starken Anstieg im Tumorstadium der SP-Gruppe, welcher möglicherweise durch einen angiogenen Switch ausgelöst wurde. Im zweiten Tierversuch der Zelllinie L3.6pl wurden die Injektionen durch die Zellsortierungen bedingt an verschiedenen Tagen durchgeführt. Insgesamt wurden zehn Tieren unsortierte L3.6pl Zellen, acht Tieren NSP-Zellen und sieben Tieren SP-Zellen injiziert. Die Versuchsdauer wurde diesmal auf vierundfünfzig bzw. sechsundfünfzig Tage ausgedehnt, um eine längere Entwicklung beobachten zu können, da die Tumore etwas langsamer wuchsen als im vorherigen Versuch. Leider verstarben dadurch kurz vor Versuchsende drei Tiere der SP-Gruppe. Ebenso musste ein Tier der NSP-Gruppe

peritonitis-bedingt aus dem Versuch ausscheiden. Um den Tag vierzig herum konnte auch hier ein angiogener Switch in der SP-Gruppe beobachtet werden (Abbildung 14 A).

Das Tumolvolumen der SP-Gruppe ($1,98\text{cm}^3 \pm 0,12\text{cm}^3$), der Gruppe der unsortierten L3.6pl Zellen ($0,67\text{cm}^3 \pm 0,24\text{cm}^3$) und der NSP-Gruppe ($0,37\text{cm}^3 \pm 0,21\text{cm}^3$) unterschied sich am Versuchsende signifikant (Abbildung 14 B). So bildeten Tiere der SP-Gruppe 5,4 fach größere Tumore als Tiere der NSP-Gruppe und 3fach größere Tumore als Tiere der Gruppe der unsortierten Zellen.

Die Tumore sind in Abbildung 15 dargestellt. Das ermittelte Tumorgewicht (Abbildung 16 A) korrelierte mit den Tumorumfängen, welche mit der in Material und Methoden angegebenen Formel bestimmt wurden. So wiesen die von SP-Zellen abstammenden Tumore mit $1,64\text{ g} \pm 0,2\text{ g}$ ein signifikant höheres Gewicht auf als die Tumore, welche von unsortierten Zellen ($0,98\text{ g} \pm 0,28\text{g}$) oder NSP-Zellen ($0,51\text{ g} \pm 0,29\text{g}$) abstammten.

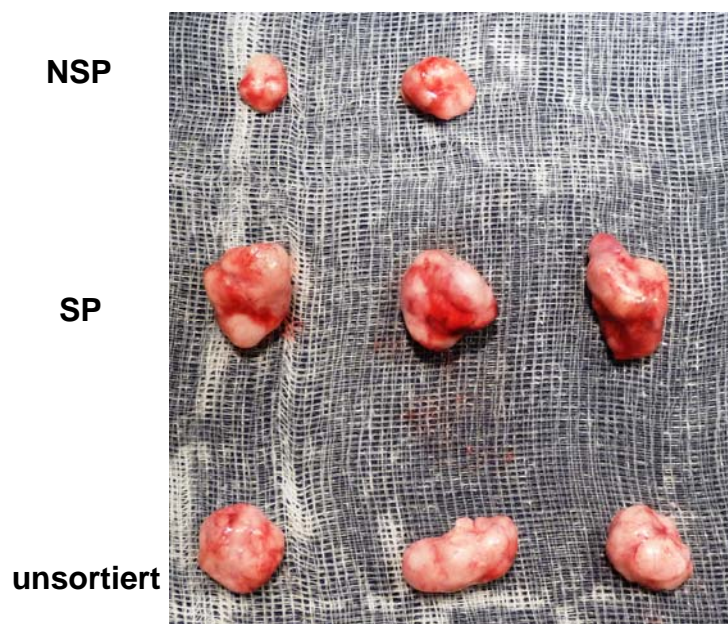


Abbildung 15: Darstellung der von der Zelllinie L3.6pl abstammenden Tumore nach Opferung der Tiere

SP-Zellen der Zelllinie L3.6pl waren sehr viel tumorigener als NSP-Zellen. Die unsortierten Zellen nahmen eine mittlere Stellung ein.

Im Gewicht der Tiere konnten keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden (Abbildung 16 B). Im Mittel wogen die Mäuse der SP-Gruppe $22,66\text{ g} \pm 2,31\text{ g}$, die Mäuse der Gruppe der unsortierten Zellen $23,78\text{ g} \pm 1,62\text{ g}$ und die Mäuse der NSP-Gruppe $22,04\text{ g} \pm 2,53\text{ g}$.

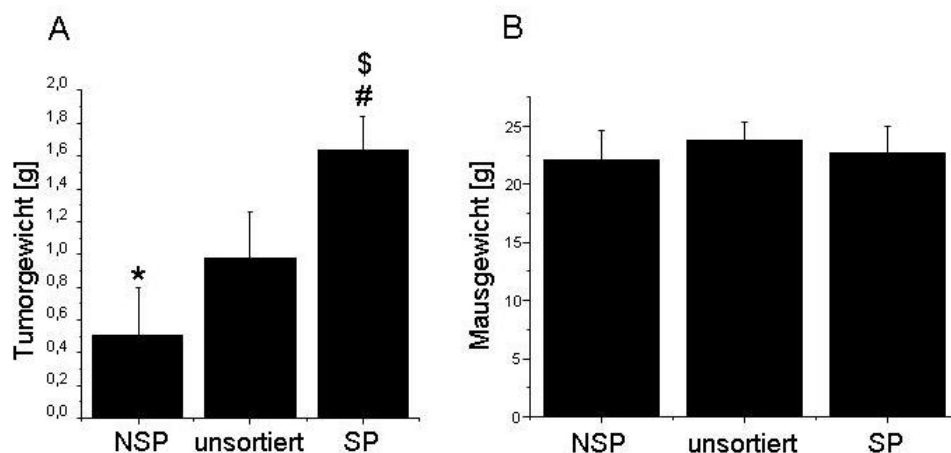


Abbildung 16: Mausgewicht und Tumorgewicht von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von NSP-, SP- und unsortierten Zellen der Zelllinie L3.6pl

Durch SP-Zellen generierte Tumore der Zelllinie L3.6pl wiesen ein signifikant höheres Gewicht auf als durch NSP-Zellen gebildete Tumore. Tumore, welche durch unsortierte Zellen induziert wurden, lagen mit ihrem Gewicht in der Mitte (A). NSP vs. unsortiert $p^* < 1E^{-3}$; NSP vs. SP $p^\# < 5E^{-7}$; SP vs. unsortiert $p^\$ < 5E^{-5}$. Im Mausgewicht waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (B).

Des Weiteren wurden die Leber- und die Lymphknotenmetastasen untersucht (Tabelle 6.1). Alle sieben Tiere der SP-Gruppe wiesen sowohl Leber- als auch Lymphknotenmetastasen auf, jedoch lediglich eines von zehn Tieren der NSP-Gruppe entwickelte Lebermetastasen und zwei von zehn Tieren Lymphknotenmetastasen. In der Gruppe der unsortierten Zellen lagen bei sechs von dreizehn Tieren Lebermetastasen und bei elf von dreizehn Tieren Lymphknotenmetastasen vor, ein Verteilungsmuster, wie bereits von Bruns et al.^[142] beschrieben wurde.

Tabelle 6.1: Inzidenzrate von Leber- und Lymphknotenmetastasen der Tiere nach orthotoper Injektion von L3.6pl Zellen

Darstellung der Verteilung von Leber- und Lymphknotenmetastasen. Im Vergleich zu den NSP-Zellen wiesen die SP-Zellen einen sehr aggressiven Phänotyp auf. $p^a < 5E^{-4}$; $p^b < 1E^{-4}$.

L3.6pl	Lebermetastasen ^a	Lymphknotenmetastasen ^b
unsortiert	6/13	11/13
SP	7/7	7/7
NSP	1/10	2/10

Im Anschluss wurden zur mikroskopischen Analyse immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten der Tumore und der Leber durchgeführt.

Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte deutliche Unterschiede in der Gewebestruktur der Tumore (Abbildung 17). Es ist bekannt, dass Tumore, welche von der Zelllinie L3.6pl abstammen aufgrund ihrer aggressiven Zellproliferation ausgedehnte, zentrale Nekrosen aufweisen. Dennoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der nekrotischen Areale zwischen der SP-Gruppe (64,28 % \pm 13 %) und der NSP-Gruppe (19,66 % \pm 15,63 %; $p < 1E^{-4}$) (Abbildung 17 A). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte deutlich das aggressive und infiltrative Wachstum der Lebermetastasen (Abbildung 17 B).

Die bisherigen Ergebnisse bestätigen somit unsere Theorie, dass die kleine Subpopulation von SP-Zellen in der Zelllinie L3.6pl Stammzellcharakter besitzt, da sie sich selbst erhalten, sich erneuern und differenzieren konnte, ein sehr starkes Potential zur Tumorinduktion aufwies und einen äußerst metastatischen Phänotyp zeigte.

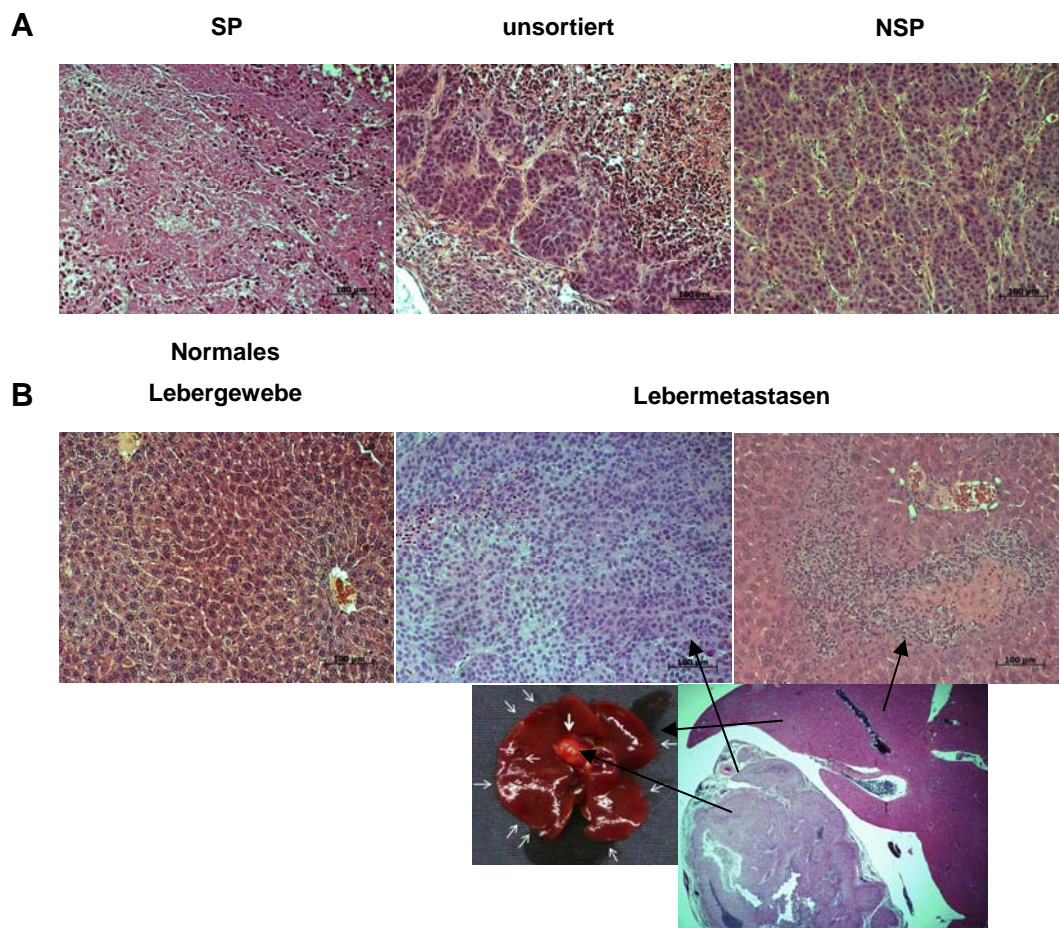


Abbildung 17: Immunhistologische Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten der Tumore und Leber des Tierversuchs mit Zellen der Linie L3.6pl

Tumore der SP-Gruppe wiesen sehr viel mehr nekrotische Areale auf als Tumore der NSP-Gruppe (A). Die Lebermetastasen zeigten ein infiltratives Wachstum (B).

Eine Färbung mit dem Zellproliferationsmarker Ki-67 (Abbildung 18) zeigte ein verstärktes Proliferationspotential in Tumoren der NSP-Gruppe, verglichen mit der SP-Gruppe. Im inneren, nekrotischen Teil der SP-Gruppe fand keine Proliferation statt, diese war auf die Rand-Regionen der Tumore beschränkt. Tumore der Gruppe der unsortierten Zellen wiesen einige proliferierende Stellen innerhalb des Tumors auf.

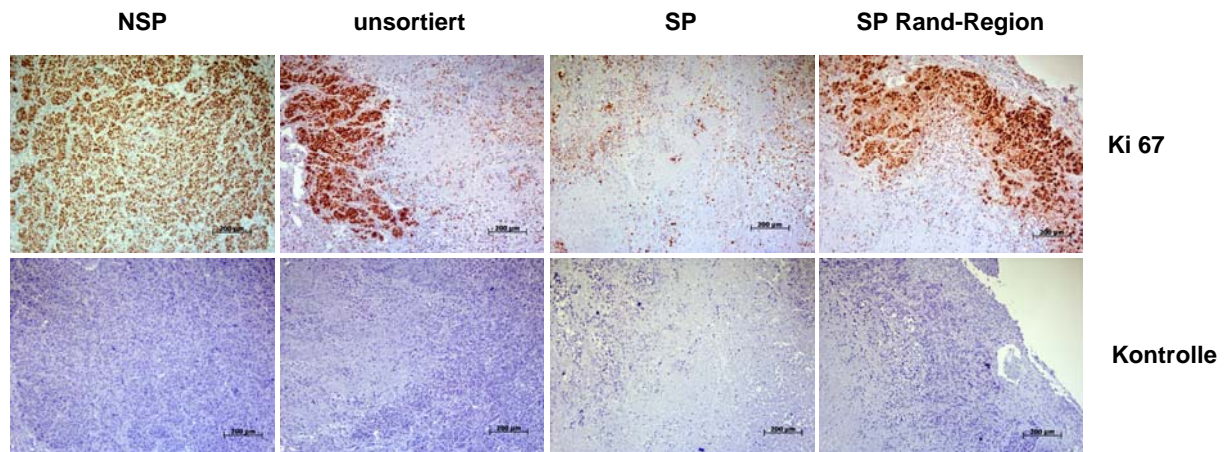


Abbildung 18: Immunhistologische Ki-67 Färbung von Paraffinschnitten der Tumore des Tierversuchs mit Zellen der Linie L3.6pl

Die Färbung mit Ki-67, einem Zellproliferationsmarker, zeigte eine starke Proliferation in der NSP-Gruppe, welche aufgrund der zunehmenden Nekrose in der Gruppe der unsortierten Zellen und SP-Gruppe weniger wurde.

AsPC-1

In einem weiteren Tierversuch mit der Zelllinie AsPC-1 sollte untersucht werden, ob SP-Zellen dieser Zelllinie ähnliche Eigenschaften *in vivo* aufweisen wie SP-Zellen der Zelllinie L3.6pl. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls SP-, NSP- und unsortierte Zellen in Nacktmäuse injiziert (SP-Gruppe n=2, NSP-Gruppe n=2, unsortierte Gruppe n=1). Da diese Zellen einen weniger aggressiven Verlauf zeigten, wurde dieser Tierversuch erst nach 63 Tagen beendet. Keines der fünf Tiere verstarb während des Experiments.

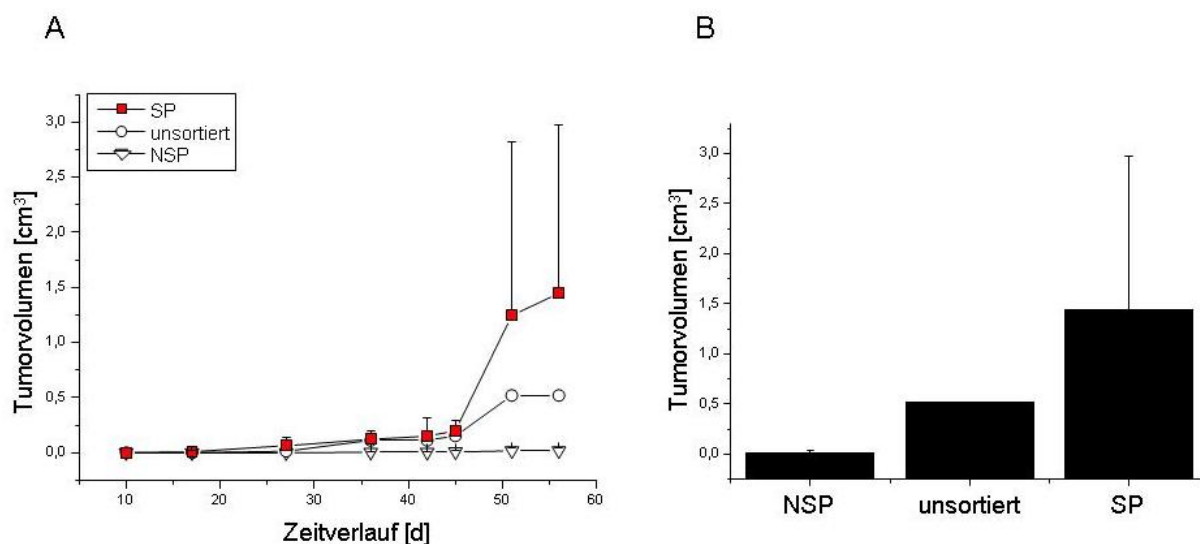


Abbildung 19: Tumorvolumen von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von SP-, NSP- und unsortierten Zellen der Zelllinie AsPC-1

In Abbildung A ist das Tumorvolumen gegen den Zeitverlauf dargestellt. Hier war ebenfalls ein möglicher angiogener Switch der SP-Gruppe zwischen Tag 45 und 51 sichtbar. Das Tumorvolumen zu Versuchsende war in der SP-Gruppe am höchsten und in der NSP-Gruppe am geringsten, der Unterschied jedoch nicht signifikant (B).

Betrachtet man das Tumorvolumen im Zeitverlauf und am Ende des Versuchs (Abbildung 19), wuchsen auch hier die Tumore der SP-Gruppe ($1,45\text{cm}^3 \pm 1,53\text{cm}^3$) stärker als die der Gruppe der unsortierten Zellen ($0,52\text{cm}^3$) oder der NSP-Gruppe ($0,02\text{cm}^3 \pm 0,02\text{cm}^3$). Ebenso war ein möglicher angiogener Switch zwischen Tag 45 und 51 ersichtlich.

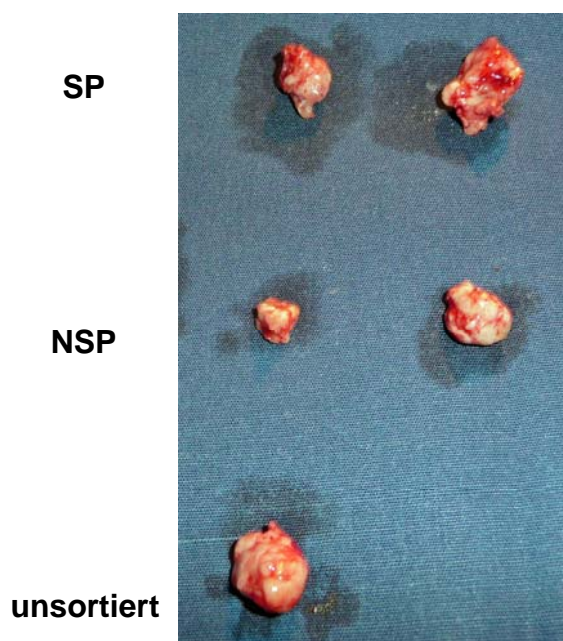


Abbildung 20: Darstellung der von der Zelllinie AsPC-1 abstammenden Tumore nach Opferung der Tiere

Tendenzuell wiesen SP-Tumore auch hier ein größeres Volumen auf, als NSP-Tumore.

Wird das mittels Palpation ermittelte Tumolvolumen mit dem der Tumore nach Opferung der Tiere verglichen (Abbildung 20) ist ersichtlich, dass die Palpation nicht ganz so präzise war. Deshalb sollte hier der Schwerpunkt auf das Tumorgewicht gelegt werden (Abbildung 21 A). Die Tumore der SP-Gruppe waren mit einem medianen Gewicht von $0,65 \text{ g} \pm 0,35 \text{ g}$ deutlich schwerer als Tumore der Gruppe der unsortierten Zellen mit $0,4 \text{ g}$ und Tumore der NSP-Gruppe mit $0,25 \text{ g} \pm 0,21 \text{ g}$. Das Gewicht der Mäuse der SP-Gruppe war mit $21,9 \text{ g} \pm 2,69 \text{ g}$ geringfügig leichter als das der Gruppe der unsortierten Zellen ($25,1 \text{ g}$) und der NSP-Gruppe ($24,65 \text{ g} \pm 0,07 \text{ g}$) (Abbildung 21 B).

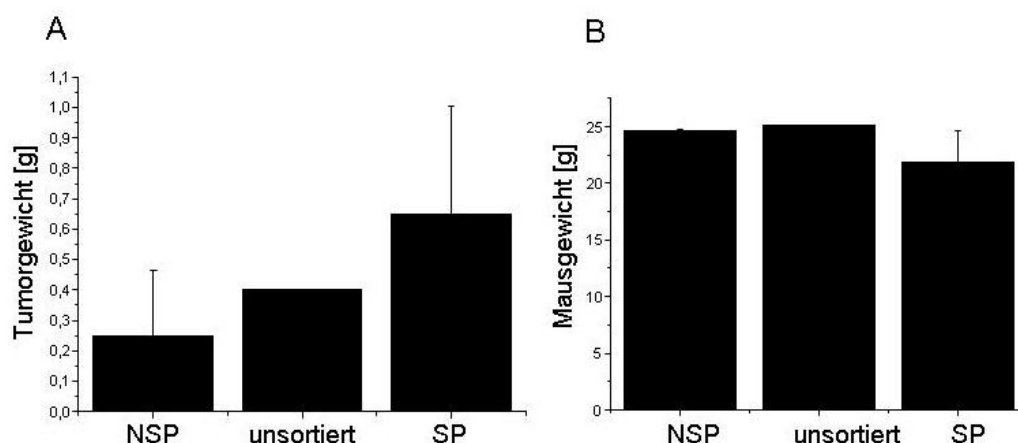


Abbildung 21: Mausgewicht und Tumorgewicht von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von SP-, NSP- und unsortierten Zellen der Zelllinie AsPC-1

Die Tumore der SP-Gruppe wiesen mehr Gewicht auf als Tumore der NSP-Gruppe, die der Gruppe der unsortierten Zellen lagen im mittleren Bereich (A). Im Gewicht der Tiere gab es keinen signifikanten Unterschied (B).

Wenngleich die Ergebnisse keine Signifikanz aufwiesen, ist dennoch eine Korrelation zu den signifikanten Ergebnissen der Tierversuche mit der Zelllinie L3.6pl ersichtlich.

Nach Opferung der Tiere wurden diese ebenfalls auf Leber- und Lymphknotenmetastasen hin untersucht (Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: Inzidenzrate von Leber- und Lymphknotenmetastasen der Tiere nach orthotoper Injektion von AsPC-1 Zellen

Darstellung der Verteilung von Leber- und Lymphknotenmetastasen. Das Tier, welches als einziges Lebermetastasen aufwies stammte aus der SP-Gruppe. Tiere der NSP-Gruppe bildeten am wenigsten Lymphknotenmetastasen aus.

AsPc-1	Lebermetastasen	Lymphknotenmetastasen
unsortiert	0/1	1/1
SP	1/2	2/2
NSP	0/2	1/2

Das einzige Tier, welches Lebermetastasen aufwies, war der SP-Gruppe zuzuordnen. Alle Tiere der Gruppe der unsortierten Zellen und der SP-Gruppe wiesen Lymphknotenmetastasen auf, jedoch entwickelte lediglich eines der zwei Tiere aus der NSP-Gruppe Lymphknotenmetastasen.

Im Anschluss wurden zur mikroskopischen Analyse ebenfalls immunhistologische Färbungen von Paraffinschnitten der Tumore durchgeführt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigte auch hier deutliche Unterschiede in der Gewebestruktur (Abbildung 22). Die Tumore der SP-Gruppe zeigten mit $36,94 \% \pm 4,08 \%$ deutlich mehr nekrotische Areale als Tumore der NSP-Gruppe mit $9,72 \% \pm 4,81 \%$ ($p < 0,05$).

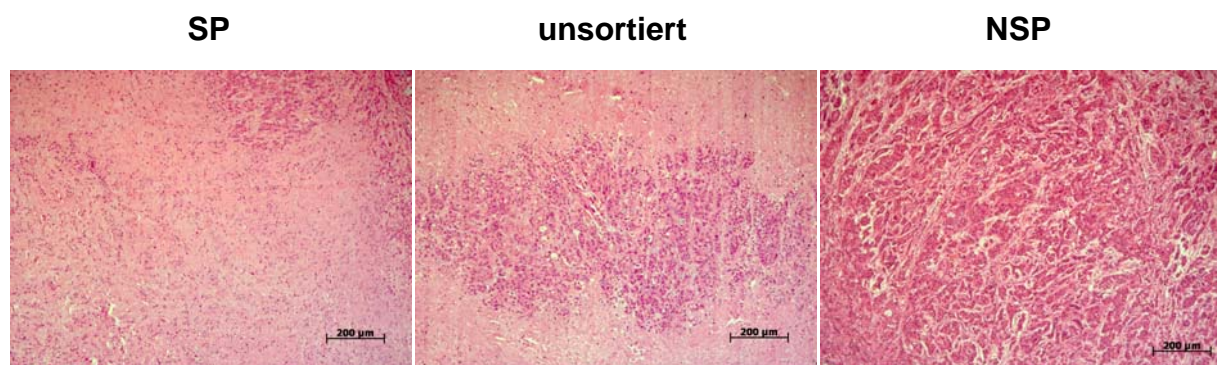


Abbildung 22: Immunhistologische Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten der Tumore des Tierversuchs mit Zellen der Linie AsPC-1

Die Tumore der SP-Gruppe wiesen deutlich mehr nekrotische Areale auf als Tumore der NSP-Gruppe.

Tendentiell zeigten auch die SP-Zellen der Zelllinie AsPC-1 ein aggressiveres Verhalten *in vivo*.

Schlussfolgernd präsentierten sich SP-Zellen in beiden Zelllinien als potentielle Krebsstammzellen. Der Fokus wurde für die weiteren Experimente jedoch auf die Zelllinie L3.6pl gelegt, da diese einen Prozentsatz an SP Zellen aufwies, welcher eher dem Gehalt potentieller Krebsstammzellen entspricht und diese Zelllinie sich aufgrund ihrer Entstehung und der signifikanten *in vivo* Ergebnisse anbot.

6.2.3 Ansprechen von Side-Population Zellen auf Stammzell-Signalweg-Inhibitoren in Kombination mit 5-FU

Bei Krebsstammzellen scheinen einige Stammzell-Signalwege wie Hedgehog oder mTOR involviert zu sein. Leukämische Krebsstammzellen konnten bereits durch Gabe von Rapamycin verringert werden^[166] und eine Kombinationstherapie mit Cyclopamin zeigte Erfolge bei der Minimierung des Anteils von Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom^[167].

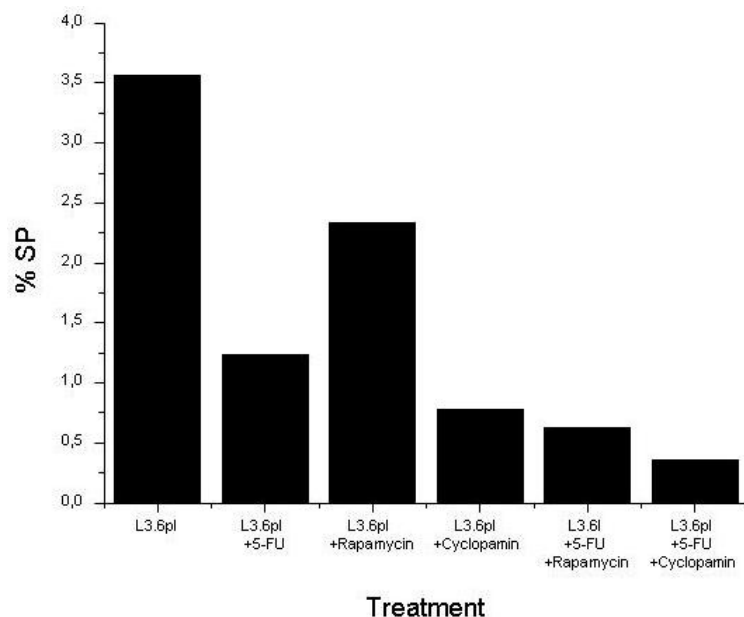


Abbildung 23: Behandlung der Zelllinie L3.6pl mittels Stammzell-Signalweg-Inhibitoren zur Reduktion der Side-Population

Nach Zugabe von 5-FU, Rapamycin und Cyclopamin alleine oder in Kombination erfolgte eine Reduktion der SP-Zellen. Diese war bei einer Kombination von 5-FU mit Cyclopamin am deutlichsten ausgeprägt.

Aus diesem Grund wurde getestet, ob sich der Anteil an Side-Population Zellen nach Behandlung mit Rapamycin, einem mTOR Inhibitor und Cyclopamin, einem Hedgehog Inhibitor, alleine und in Kombination mit 5-FU reduzieren lässt (Abbildung 23).

Mit Hilfe dieser Stammzell-Signalweg-Inhibitoren sollten die resistenten Krebsstammzellen auf 5-FU sensibilisiert werden. In diesem Versuch war der Anteil an SP-Zellen in der Zelllinie L3.6pl mit 3,56 % höher als gewöhnlich. Dieser ließ sich mit 5-FU auf 1,24 %, mit Rapamycin auf 2,33 % und mit Cyclopamin auf 0,78 % reduzieren. Eine Kombination von 5-FU und Rapamycin führte zu einer Reduktion des SP-Anteils auf 0,63 % und eine Kombination von 5-FU und Cyclopamin auf 0,36 %. Das Ergebnis erschien zunächst vielversprechend, konnte jedoch nicht reproduziert werden.

Dies verdeutlicht, dass eine zufällig gewählte Therapie mit einem Inhibitor des mTOR- oder Hedgehog-Signalwegs hier zu keinem reproduzierbaren Erfolg führte und es somit unerlässlich war, detaillierte Unterschiede zwischen SP- und NSP-Zellen intensiver zu charakterisieren, um eine gezielte Therapie gegen Side-Population Zellen entwickeln zu können.

6.2.4 Analyse von Side-Population- und Non-Side-Population Zellen auf mRNA-Ebene mittels Affymetrix Microarray

Zu diesem Zweck wurden SP- und NSP-Zellen der Zelllinie L3.6pl auf RNA-Ebene mittels eines Genchips von Affymetrix untersucht. Dieser deckt mit 28.869 Genen das komplette menschliche Transkript ab. Jedes Gen ist in sechsundzwanzig Proben vorhanden. So sollten zwischen der SP- und NSP-Fraktion differentiell regulierte Gene identifiziert werden, welche vermutlich für das aggressive Verhalten der SP-Zellen gegenüber den NSP-Zellen verantwortlich sind.

Die Bioconductor Analyse zeigte, dass insgesamt 1357 Gene differentiell exprimiert wurden und diese einen hohen Anteil an nicht kodierenden RNAs aufwiesen. Diese 1357 Gene beinhalteten einundneunzig Gene, welche mit einem *2-fold change* größer als eins signifikant differentiell exprimiert wurden. Davon waren in der SP-Fraktion siebzehn herunterreguliert (Tabelle 6.3) und siebzig überexprimiert (Tabelle 6.4). Ein Großteil dieser Gene spielt eine Rolle bei der Tumorinduktion, Differenzierung, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz und wurde in der Literatur bereits in Zusammenhang mit Krebs erwähnt.

Tabelle 6.3: In der SP-Fraktion herunterregulierte Gene

In dieser Tabelle sind alle Gene aufgelistet, welche in der SP-Fraktion herunterreguliert wurden. Die Referenzen zeigen an, dass diese bereits mit Krebs assoziiert wurden.

<u>2 fold change</u>	<u>Gen-Symbol</u>	<u>Referenz</u>	<u>2 fold change</u>	<u>Gen-Symbol</u>	<u>Referenz</u>
-1,513	PTPRZ1		-1,102	SESN3	[168]
-1,491	GBP6		-1,094	ITGB6	
-1,435	MOP-1		-1,082	KRT6A	
-1,364	MPPED2		-1,078	CFI	[169]
-1,297	GPR110		-1,058	SOSTDC1	[170, 171]
-1,244	MMP10		-1,036	LCP1	
-1,214	SERPINB3	[172]	-1,006	STARD5	
-1,185	IL1R1		-1,005	snRNA Pseudogen	
-1,157	TMPRSS4	[173]			

Tabelle 6.4: In der SP-Fraktion überexprimierte Gene

In dieser Tabelle sind alle Gene aufgelistet, welche in der SP-Fraktion überexprimiert wurden. Die Referenzen zeigen an, dass diese bereits mit Krebs assoziiert wurden.

<u>2 fold change</u>	<u>Gen-Symbol</u>	<u>Referenz</u>	<u>2 fold change</u>	<u>Gen-Symbol</u>	<u>Referenz</u>
3,787	<u>AKR1B10</u>	[174-180]	1,321	LRRFIP1	
2,48	ABCG2	[97, 103, 107, 113, 116-119, 122, 124, 181, 182]	1,321	SNORD122	
1,958	snoRNA Pseudogen		1,319	snRNA Pseudogen	
1,938	Y RNA		1,314	snoRNA Pseudogen	
1,909	snoRNA Pseudogen		1,307	KIAA0319	
1,895	7SK snRNA		1,298	HIST2H2AB	
1,771	EID3	[183]	1,295	HIST1H1E	
1,747	U6 spliceosomal RNA		1,284	TXNRD1	[184-186]
1,742	MIRN221	[187-189]	1,276	TM4SF19	
1,729	F2RL2		1,245	nc RNA	
1,726	Y RNA		1,232	scRNA Pseudogen	
1,589	GDF15	[190-196]	1,231	U6 spliceosomal snRNA	
1,439	NR0B1	[197-202]	1,229	Y RNA	
1,436	AGPAT9		1,224	U6 spliceosomal snRNA	
1,427	MIRN21	[189, 203, 204]	1,217	NID2	[205]
1,423	5 S rRNA		1,216	NTS	[206-210]
1,399	U6 spliceosomal RNA		1,201	U4 spliceosomal snRNA	
1,377	MAP1B	[211]	1,186	SRP RNA	
1,349	CYP4F3		1,184	snRNA Pseudogen	

<u>2 fold change</u>	<u>Gen-Symbol</u>	<u>Referenz</u>	<u>2 fold change</u>	<u>Gen-Symbol</u>	<u>Referenz</u>
1,338	HIST1H1B		1,152	WNT5A	[212-216]
1,329	Y RNA		1,151	Y RNA	
1,144	snoRNA Pseudogen		1,084	rRNA Pseudogen	
1,14	SNORA1		1,083	SNORA25	
1,137	MAN1A1		1,082	SNORD53	
1,123	S100P	[217-223]	1,08	snoZ40	
1,12	SNORA1		1,077	CPEB2	
1,116	U6 spliceosomale RNA		1,074	LIPH	
1,11	SNORA16B		1,06	FLJ10213	
1,104	AKR1C3	[224-227]	1,043	snoZ40	
1,104	GDA	[228]	1,038	SNORD5	
1,099	U4 splicesosomale RNA		1,027	RSPO3	[229-231]
1,098	5 S ribosomale RNA		1,025	TMEM156	
1,095	HIST1H3B		1,013	HIST1H2BF	
1,088	U6 spliceosomale RNA		1,013	scRNA Pseudogen	
1,087	LIMCH1	1,087	1,002	SRP RNA	

Eine graphische Übersicht der Ergebnisse des Affymetrix Microarrays ist in Abbildung 24 dargestellt. Besondere Beachtung wurde dem am stärksten überexprimierten Gen, der Aldoketoreduktase 1B10 (AKR1B10), geschenkt. Dieses wies mit einem *2 fold change* von 3,787 eine weitaus höhere Überexpression auf, als das *breast cancer resistance protein* ABCG2 (*2 fold change* von 2,48), welches wie erwartet überexprimiert wurde und somit auch hier einer der hauptbestimmenden Faktoren für die Side-Population ist. Aufgrund der enzymatischen Wirkung von AKR1B10 als Reduktase von Carbonyl-Gruppen können Medikamente wie Daunorubicin, Doxorubicin oder Oracin inaktiviert werden, was wiederum zu Chemotherapie-Resistenzen führt^[232]. Ebenso scheint eine Funktion als Retinolsäure vermittelter Differenzierungs-Inhibitor möglich^[177-180]. Daraus ergibt sich ein starkes Krebsstammzellpotential für AKR1B10.

Dieses Protein wurde in der Zelllinie AsPC-1 wesentlich stärker als in L3.6pl exprimiert (Abbildung 25).

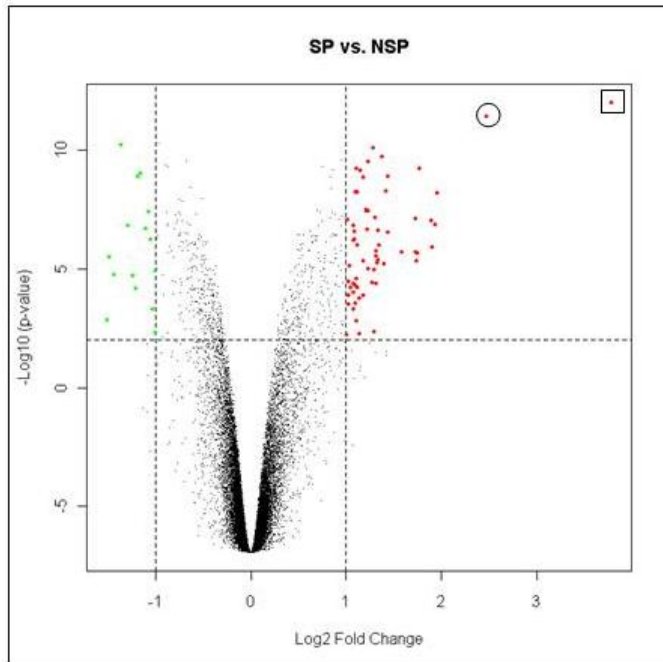


Abbildung 24: Volcanoblot der Affymetrix Microarray Analyse

Der Volcanoblot zeigt die Verteilung von p -value und $fold\ change$ für alle Gene, welche bei dem Vergleich Side-Population vs. Non-Side-Population auf dem Microarray detektiert wurden. Die applizierten Grenzbereiche zur Abgrenzung signifikanter, differentieller Expression sind in gestrichelter Linie dargestellt. In der SP-Fraktion differenziell überexprimierte Gene sind als rote Punkte dargestellt, herunterregulierte als grüne Punkte. Das durch einen Kreis markierte Gen ist ABCG2, welches eine Efflux Symporter-Funktion aufweist und somit als vermeintlicher Selektionsmarker für die Side-Population diente. Das durch ein Quadrat gekennzeichnete Gen ist AKR1B10, welches eine Rolle bei Chemotherapie-Resistenz und Differenzierung spielt.

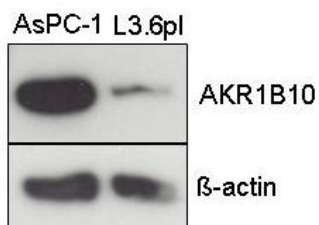


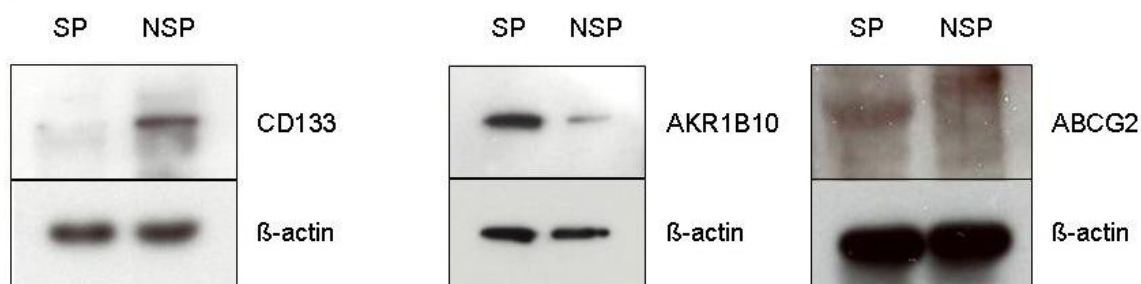
Abbildung 25: Westernblot zum Nachweis der AKR1B10 Expression in den Zelllinien AsPC-1 und L3.6pl

AKR1B10 wurde in der Zelllinie AsPC-1 sehr stark exprimiert und in L3.6pl sehr schwach, korrelierend zum Side-Population-Gehalt der beiden Zelllinien.

6.2.5 Analyse von Side-Population- und Non-Side-Population Zellen auf Proteinebene

Im Nachfolgenden sollten die mittels Affymetrix Genchip identifizierte Gene AKR1B10 und ABCG2, aber auch der umstrittene Krebsstammzellmarker CD133 auf Proteinebene in der SP- und NSP-Fraktion überprüft werden. Mittels Westernblot konnte die Überexpression der Gene AKR1B10 und ABCG2 auch auf Proteinebene in der Side-Population verifiziert werden. Interessanterweise wurde CD133 in der NSP-Fraktion überexprimiert und korrelierte somit nicht mit der Side-Population (Abbildung 26 A). Zur Kontrolle, ob der Hoechst-Farbstoff selbst die Expression der untersuchten Gene beeinflusst, wurde ein Westernblot mit der Zelllinie L3.6pl ohne Hoechstzugabe und mit Hoechstzugabe durchgeführt. Keines der hier untersuchten Gene wurde durch den Hoechstfarbstoff stärker beeinflusst (Abbildung 26 B).

A



B

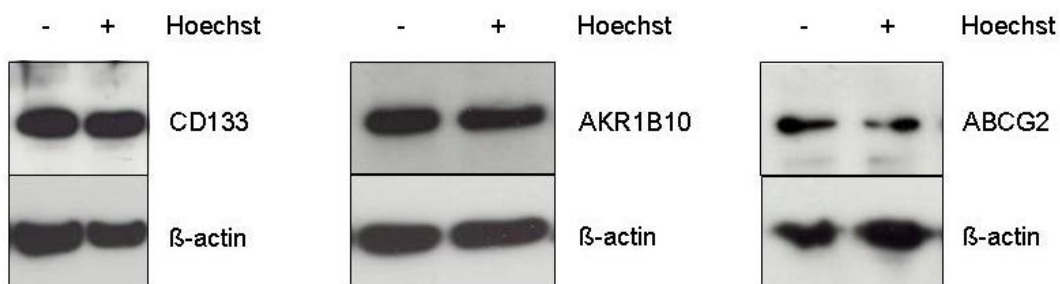


Abbildung 26: Westernblot zum Nachweis der CD133-, AKR1B10- und ABCG2-Expression von der L3.6pl SP- und NSP-Fraktion und Hoechstkontrolle

Der Krebsstammzellmarker CD133 korrelierte auf Proteinebene mit der Non-Side-Population. AKR1B10 und ABCG2 wurden auch auf Proteinebene in der Side-Population überexprimiert (A). Der Hoechst-Farbstoff beeinflusste weder die CD133- noch die AKR1B10- oder ABCG2-Expression (B) in stärkerem Ausmaß.

Zusätzlich wurden Hoechst/CD133 und Hoechst/ABCG2 Doppelfärbungen durchgeführt und diese durchflusszytometrisch analysiert. Da der CD133 positive Anteil in der Zelllinie L3.6pl mit $0,13\% \pm 0,05\%$ jedoch sehr gering war, konnte hier keine Aussage getroffen werden.

Mit 13,95 % wurde eine Anreicherung der ABCG2 positiven Zellen in der SP-Fraktion gegenüber der NSP-Fraktion (2,61 %) festgestellt.

Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass die Side-Population AKR1B10, sowie ABCG2 auf mRNA- und Protein-Ebene überexprimiert. CD133 wurde hingegen vermehrt in der Non-Side-Population exprimiert. Die Expression dieser Gene ließ sich durch den Hoechst-Farbstoff nicht in größerem Ausmaß beeinflussen.

6.3 Chemotherapie-Resistenz und die Rolle von Krebsstammzellen

6.3.1 Erstellung von Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Zellen – Auswirkungen auf den Side-Population/ABCG2-Gehalt

Da das Gen ABCG2 aufgrund seiner Funktion als *multidrug-efflux* Symporter, sowie Krebsstammzellen allgemein, sehr stark in Bezug auf ihre Chemotherapie-Resistenz diskutiert werden, sollte untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen Chemotherapie-Resistenz und potentiellen Krebsstammzellen gibt und ob AKR1B10 diesbezüglich eine Rolle spielt.

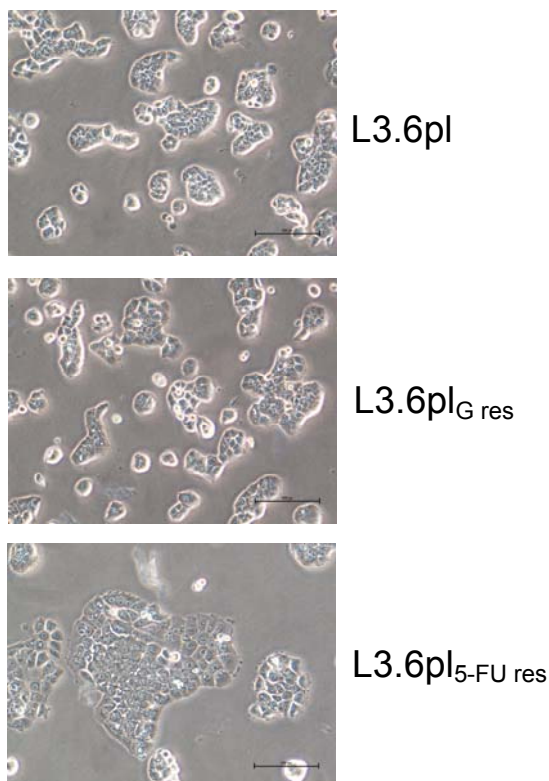


Abbildung 27: Darstellung der sensitiven, Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl

Optisch zeigte sich kein Unterschied zwischen der sensitiven und Gemcitabin-resistenten Zelllinie. Die 5-FU-resistente Zelllinie hingegen wuchs in kompakteren und wesentlich größeren Inseln.

Dazu wurde die Zelllinie L3.6pl, wie in Material und Methoden beschrieben, kontinuierlich dem Chemotherapeutikum Gemcitabin oder 5-FU in steigender Konzentration ausgesetzt. Durch diesen kontinuierlichen Selektionsdruck stieg die IC_{50} der mit Gemcitabin behandelten Zellen (im Nachfolgenden als L3.6pl_{G res} deklariert) signifikant von 6,11 ng/ml \pm 0,93 ng/ml über 34,88 ng/ml und 68,19 ng/ml auf 119,77 ng/ml \pm 5,12 ng/ml. Durch die kontinuierliche Behandlung der Zellen mit 5-FU stieg die IC_{50} von 0,1 μ g/ml \pm 0,00 μ g/ml auf 1,52 μ g/ml \pm 0,39 μ g/ml (Abbildung 30 A) als Zeichen ihrer Resistenz (im Nachfolgenden als L3.6pl_{5-FU res} deklariert).

Optisch unterschied sich die Gemcitabin-resistente Zelllinie nicht von ihrer sensitiven Mutterzelllinie. Die 5-FU-resistente Variante wuchs gedrungener und bildete wesentlich größere Kolonien aus (Abbildung 27).

Im Wachstumsverhalten ergaben sich ebenso keine Unterschiede bezüglich der Gemcitabin-resistenten und der sensitiven Zelllinie. Die 5-FU-resistente Variante wuchs jedoch vergleichsweise langsamer (Abbildung 28).

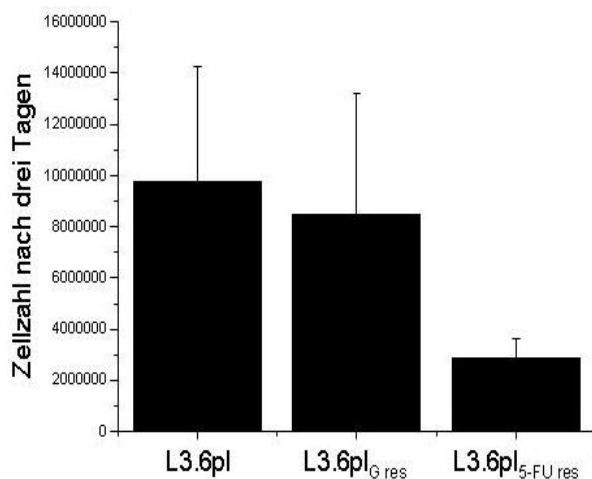


Abbildung 28: Wachstumsverhalten der sensitiven, Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl

Das Wachstumsverhalten der Gemcitabin-resistenten Variante unterschied sich kaum von der Mutterzelllinie, die 5-FU-resistente Variante zeigte jedoch ein sehr viel langsames Wachstum. Angegeben ist die Zellzahl drei Tage nach Auslegen von zwei Millionen Zellen.

Des Weiteren wurden die Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Varianten von L3.6pl hinsichtlich ihrer Proteinexpression von TS, Desoxycytidinkinase, hENT-1 und -2 untersucht. Bei der 5-FU-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl konnte mittels Westernblot eine Überexpression der TS gegenüber der Gemcitabin-resistenten und sensitiven Zelllinie festgestellt werden, ein Mechanismus, welcher Resistenz gegenüber 5-FU verleiht (Abbildung 29 A). Der humane ENT1 Transporter zur Aufnahme von Gemcitabin in die Zelle wurde zwar in der Gemcitabin-resistenten Variante weniger stark exprimiert als in der 5-FU-resistenten Variante, jedoch

war kein Unterschied zwischen der sensitiven und Gemcitabin-resistenten Variante ersichtlich (Abbildung 29 B). Hinsichtlich der hENT2- und Desoxycytidinkinase-Expression war kein Unterschied feststellbar.

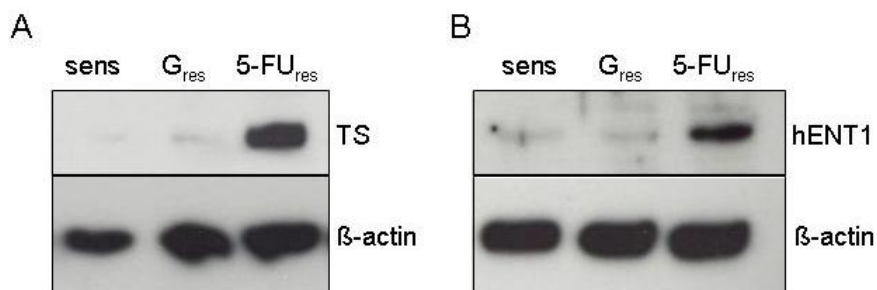


Abbildung 29: Westernblot zum Nachweis der Resistenzmechanismen in den Chemotherapie-resistenten Varianten L3.6pl_{G res} und L3.6pl_{5-FU res}

Gegenüber L3.6pl und L3.6pl_{G res} wies L3.6pl_{5-FU res} sowohl eine verstärkte TS- (A), als auch hENT1-Expression (B) auf.

In der Zelllinie L3.6pl_{G res} stieg korrelierend mit ihrer IC₅₀ der durchflusszytometrisch gemessene Anteil an ABCG2 positiven Zellen von 0,88 % ± 0,3 % über 1,4 % ± 1,04 % und 1,6 % ± 0,86 % auf 2,89 % ± 0,88 %, wohingegen der Anteil an ABCG2 positiven Zellen mit Resistenzzunahme gegen 5-FU unverändert blieb (0,86 % ± 0,27 % vs. 0,86 % ± 0,28 %) (Abbildung 30 B).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht auch der Anteil an SP-Zellen. So stieg dieser in der Gemcitabin-resistenten Zelllinie signifikant von 0,9 % ± 0,22 % über 1,21 % und 1,73 % auf 5,38 % ± 0,84 % an (Abbildung 31 A). In der 5-FU-resistenten Zelllinie sank dieser signifikant auf 0,45 % ± 0,14 % (Abbildung 31 B).

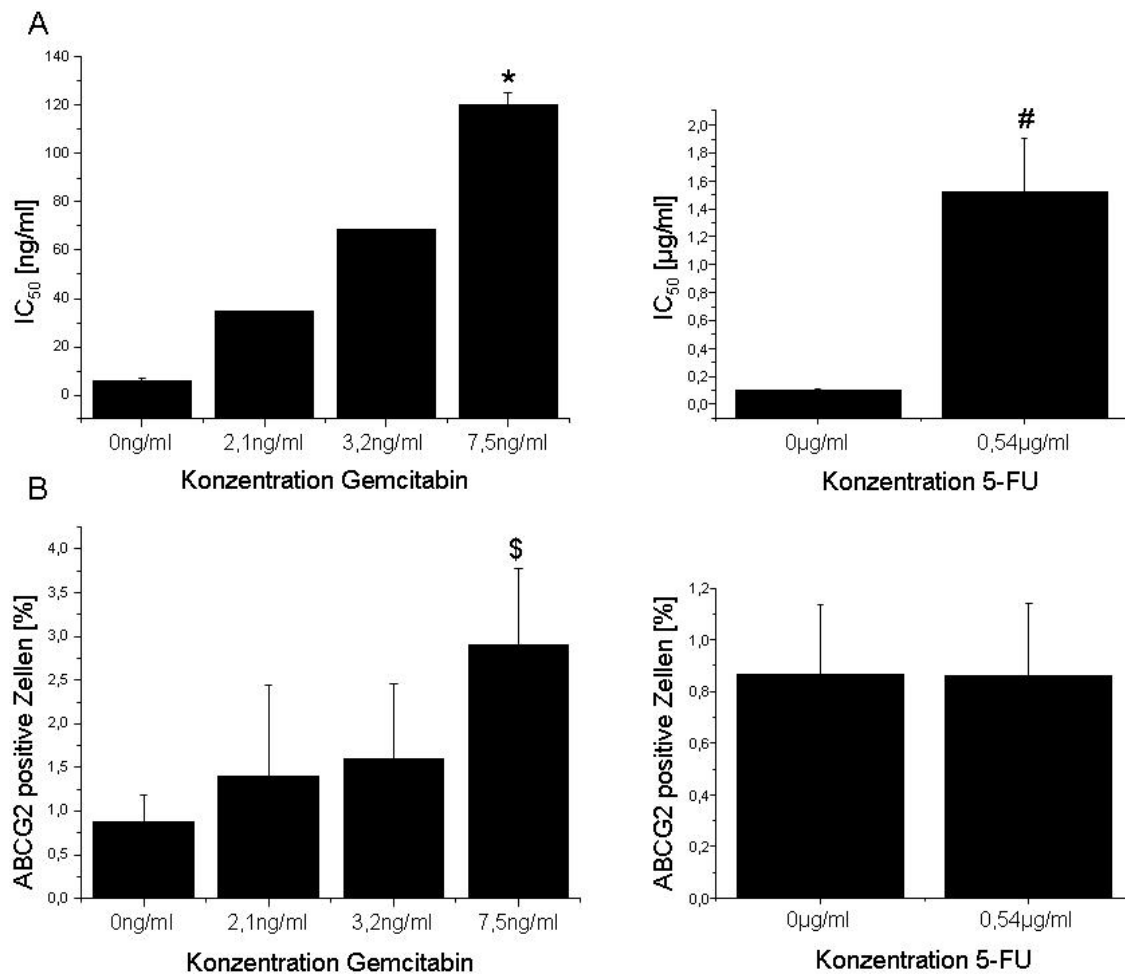


Abbildung 30: IC₅₀ der Chemotherapie-resistenten Zelllinien in Korrelation zum Anteil an ABCG2 positiven Zellen

Durch kontinuierliche Behandlung mit den Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-FU stieg die IC₅₀ signifikant an (A). 0 ng/ml Gemcitabin vs. 7,5 ng/ml Gemcitabin $p^* < 1E^{-9}$; 0 µg/ml 5-FU vs. 0,54 µg/ml 5-FU $p^{\#} < 0,05$.

In der Zelllinie L3.6_{plG res} stieg korrelierend zur IC₅₀ auch der Anteil an ABCG2 positiven Zellen. Der Prozentsatz von ABCG2 blieb hingegen in der Zelllinie L3.6_{pl5-FU res} unverändert (B). ABCG2-Gehalt 0 ng/ml Gemcitabin vs. 7,5 ng/ml Gemcitabin $p^{\$} < 5E^{-4}$.

Eine durchflusszytometrische Doppelfärbung der Gemcitabin-resistenten Zelllinie mit Hoechst und ABCG2 bestätigte die Korrelation zwischen der Side-Population und ABCG2 erneut, wenngleich der Prozentsatz in der Non-Side-Population leicht anstieg. Es erwiesen sich 14,8 % der SP-Zellen und 5,83 % der NSP-Zellen als ABCG2 positiv.

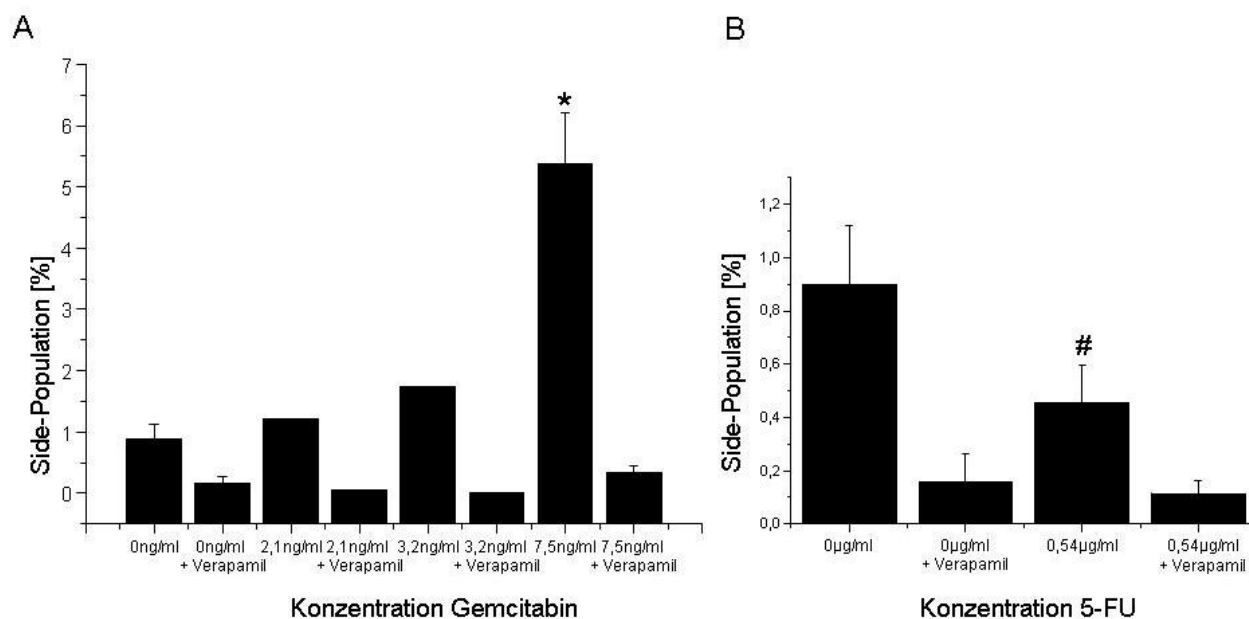


Abbildung 31: Side-Population-Gehalt in den Chemotherapie-resistenten Varianten der Zelllinie L3.6pl

Nach Behandlung mit Gemcitabin stieg der Anteil an Side-Population Zellen signifikant an (A). Kontroverserweise führte die Behandlung mit 5-FU zu einer signifikanten Reduktion an Side-Population Zellen (B). 0 ng/ml Gemcitabin vs. 7,5 ng/ml Gemcitabin $p^* < 1E^{-20}$; 0 µg/ml 5-FU vs. 0,54 µg/ml 5-FU $p^{\#} < 0,005$.

6.3.2 Auswirkungen der Chemotherapie-Resistenz auf den Gehalt weiterer potentieller Krebsstammzellmarker

Wie bereits erwähnt, zählen CD133, CD24, CD44 und ESA zu potentiellen Krebsstammzellmarker beim Pankreaskarzinom. Deshalb sollte mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, ob diese bei Chemotherapie-Resistenz gegen Gemcitabin und 5-FU eine Rolle spielen. Weder in den Gemcitabin- noch 5-FU-resistenten Zellen war ein signifikanter Anstieg an CD133-positiven Zellen ersichtlich (L3.6pl_{G res}, 0,21 % ± 0,15 %, L3.6pl_{5-FU res}, 0,08 % ± 0,06 %). Mit 0,13 % ± 0,05 % war der Gehalt an CD133-positiven Zellen in der sensitiven Zelllinie L3.6pl sehr gering. Um die Funktionalität des Antikörpers gewährleisten zu können, wurde die Zelllinie GC38 als Positivkontrolle mitgeführt. Der Anteil an CD24-positiven Zellen in der sensitiven Zelllinie L3.6pl ging mit 0,02 % ± 0,01 % nahezu gegen null. Nach Behandlung mit Gemcitabin stieg er jedoch signifikant auf 1,06 % ± 0,09 % und nach Behandlung mit 5-FU sogar auf 6,71 % ± 0,16 % (Abbildung 32). Der Marker CD44 zeigte auch eine Korrelation zu ABCG2 beziehungsweise zur Side-Population. So waren 88,14 % der sensitiven Zellen CD44-positiv, 95,91 % der L3.6pl_{G res} und 80,56 % der L3.6pl_{5-FU res}, jedoch schien er aufgrund des an sich hohen Anteils an positiven Zellen in diesem Fall als Krebsstammzellmarker ungeeignet. Ebenso ESA, welches 99,62 % der sensitiven Zellen,

99,36 % der L3.6pl_{G res} und 98,88 % der L3.6pl_{5-FU res} färbte und somit nicht mit Chemotherapie-Resistenz korrelierte.

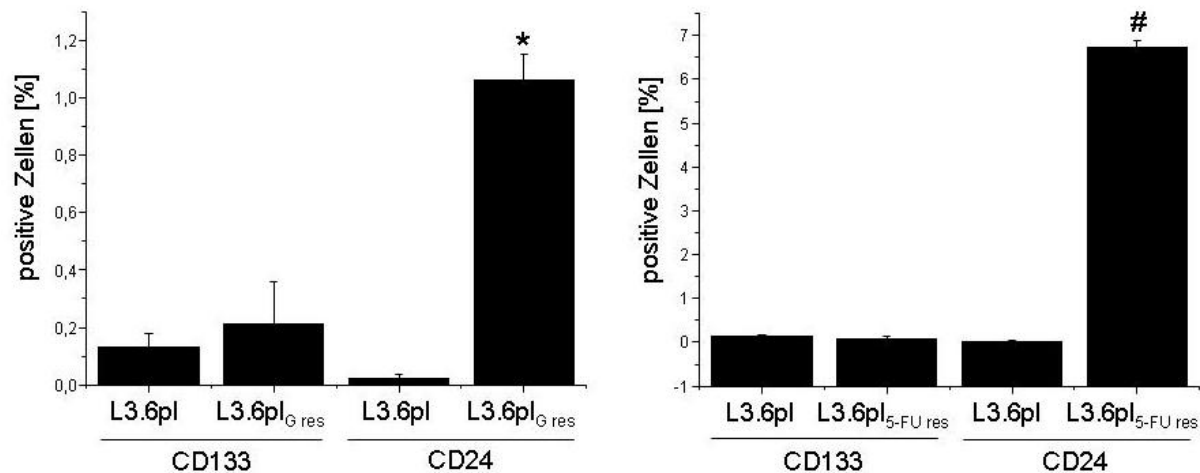


Abbildung 32: Gehalt der potentiellen Krebsstammzellmarker CD133 und CD24 in der sensitiven Zelllinie L3.6pl und ihren Chemotherapie-resistenten Varianten

Der Anteil des Krebsstammzellmarkers CD133 änderte sich aufgrund der Chemotherapie-Resistenz nicht signifikant. Der Krebsstammzellmarker CD24 zeigte eine signifikante Erhöhung in der Zelllinie L3.6pl_{G res} und ein noch stärkeres Ansteigen in der Zelllinie L3.6pl_{5-FU res}. CD24-Gehalt in L3.6pl vs. L3.6pl_{G res} $p^* < 1E^{-5}$; CD24-Gehalt in L3.6pl vs. L3.6pl_{5-FU res} $p^{\#} < 5E^{-7}$.

Da der Anteil an CD24 in den Chemotherapie-resistenten Zellen erhöht war, sollte analysiert werden, ob dieser Marker in der Side-Population Fraktion, beziehungsweise den ABCG2 positiven Zellen angereichert ist. Um dies zu untersuchen, wurden mit L3.6pl_{G res} durchflusszytometrische Doppelfärbungen auf Hoechst/CD24 und ABCG2/CD24 durchgeführt. Diese zeigten, dass der Marker CD24 ohne signifikanten Unterschied gleichmäßig in der SP-Fraktion (12,01 % \pm 4,12 %) und NSP-Fraktion (10,65 \pm 4,51 %) exprimiert wird und lediglich 0,08 % \pm 0 % der Zellen sowohl für CD24 als auch für ABCG2 positiv waren.

Unterstützend zur Durchflusszytometrie wurden die resistenten Zelllinien und ihre sensitive Mutterzelllinie mittels Westernblot auf CD133, AKR1B10 und ABCG2 hin untersucht (Abbildung 33). Der Krebsstammzellmarker CD133 wurde in L3.6pl und L3.6pl_{G res} gleichermaßen exprimiert, in L3.6pl_{5-FU res} nahm die Expression leicht ab. AKR1B10 wurde in der Zelllinie L3.6pl_{G res} deutlich überexprimiert, in der 5-FU-resistenten Variante wurde der potentielle Krebsstammzellmarker jedoch nur sehr schwach exprimiert. Die Expression von ABCG2 war in der Zelllinie L3.6pl_{G res} ebenfalls leicht erhöht und in der Zelllinie L3.6pl_{5-FU res} vermindert.

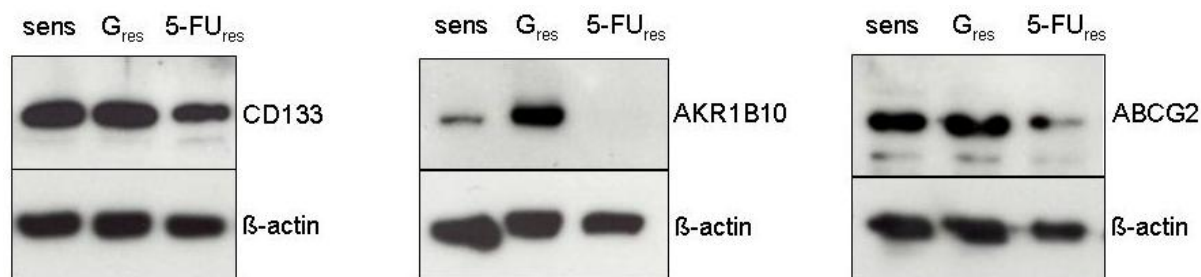


Abbildung 33: Protein-Expressionsanalyse von CD133, AKR1B10 und ABCG2 in der sensitiven Zelllinie L3.6pl und ihren Chemotherapie-resistenten Varianten

Die Behandlung der Zellen mit Gemcitabin führte zu keiner Veränderung der Expression von CD133, jedoch zu einem starken Anstieg der AKR1B10-Expression und einem leichten Anstieg der Expression von ABCG2. Eine Behandlung mit 5-FU verringerte die Expression von CD133 und ABCG2 leicht, die von AKR1B10 stark.

Um festzustellen, ob die Überexpression von AKR1B10 in der Gemcitabin-resistenten Zelllinie ausschließlich auf den erhöhten Anteil der Side-Population zurückzuführen ist oder ob diese durch die kontinuierliche Behandlung mit Gemcitabin auch an ihre differenzierten Nachkommen weitergegeben wird, wurde ein Westernblot mit Side- und Non-Side-Population Zellen der sensitiven und Gemcitabin-resistenten Zellen der Zelllinie L3.6pl durchgeführt (Abbildung 34). Dieser zeigte, dass die AKR1B10 Expression der Gemcitabin-resistenten Zellen fast ausschließlich auf den damit einhergehenden erhöhten Anteil an Side-Population zurückzuführen ist und diese auch in den Gemcitabin-resistenten Zellen in der Non-Side-Population lediglich sehr schwach ist.

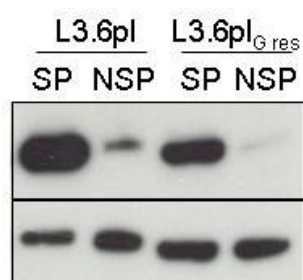


Abbildung 34: AKR1B10 Protein-Expression in Side- und Non-Side-Population Zellen der sensitiven und Gemcitabin-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl

Auch in der Gemcitabin-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl war die Expression von AKR1B10 hauptsächlich auf die Side-Population beschränkt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass ABCG2 in der Side-Population angereichert ist, CD133 überwiegend in der Non-Side-Population exprimiert wird und CD24 ebenfalls keinen spezifischen Marker für die Side-Population darstellt und innerhalb dieser zu ABCG2 eine andere Subpopulation bildet. Der Gehalt des Markers CD133 ließ sich weder von Gemcitabin

noch von 5-FU beeinflussen und scheint somit als Krebsstammzellmarker eher ungeeignet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser eine weitere Krebsstammzellpopulation markiert. ABCG2 und die Side-Population zeigten eine starke Korrelation und stiegen mit der Resistenz gegen Gemcitabin an, ABCG2 blieb nach Behandlung mit 5-FU gleich, jedoch zeigte die Side-Population einen Rückgang. Somit scheint ABCG2 und die Side-Population eine korrelierende Subpopulation von Krebsstammzellen zu sein, welche durch Gemcitabin selektioniert wird. Die Expression von AKR1B10 korrelierte ebenfalls mit diesen Resultaten und scheint daher ein Marker für die Side-Population und Gemcitabin-Resistenz zu sein. Der Marker CD24 reagierte sowohl auf Gemcitabin und 5-FU mit einer Erhöhung seines Prozentsatzes und könnte somit einen weiteren Krebsstammzellmarker repräsentieren, welcher jedoch unabhängig von der Side-Population ist.

6.4 Expression des Proteins AKR1B10 in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas von Patienten

Anhand von neun Patientengewebeproben, bestehend aus jeweils Normal- und Tumorgewebe, wurde die Expression der Aldoketoreduktase 1B10 mittels Westernblot untersucht.

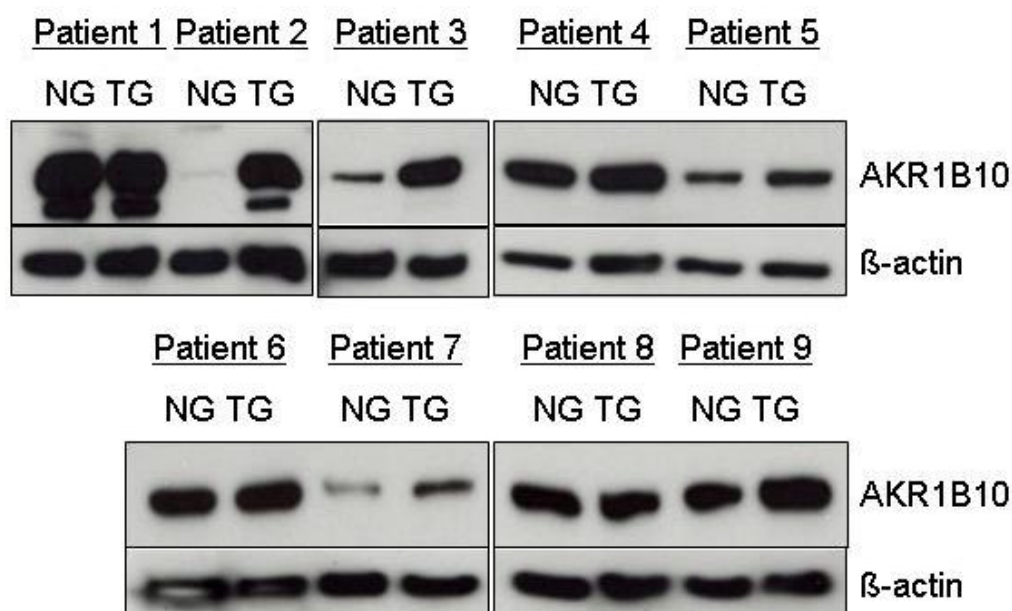


Abbildung 35: Westernblot zum Nachweis der AKR1B10-Expression in Patientengewebe

Dargestellt ist die Westernblotanalyse des Proteins AKR1B10 in Gewebe von neun Patienten, jeweils in Normalgewebe (NG) und Tumorgewebe (TG).

Bei fünf Patienten waren Expressionsunterschiede zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe zu sehen, davon bei zwei Patienten ein sehr deutlicher (Patient 2 und 3), bei zwei Patienten ein mittlerer (Patient 7 und 9) und bei einem der Patienten (Patient 5) ein leichter (Abbildung 35). Insgesamt war die Expression von AKR1B10 in allen Proben relativ stark.

Das Tumorgrading zeigt, dass bei den beiden Patienten mit dem stärksten Expressionsunterschied (Patient 2 und 3) am wenigsten Lymphknoten auf Metastasen hin untersucht wurden und davon keine befallen war (pN0 (0/1) und pN0 (0/4)). Bei den anderen Patienten (Patient 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9) wurden weitaus mehr Lymphknoten untersucht und lediglich die Lymphknoten von 3 Patienten waren ohne Befund (pN0 (0/11), pN0 (0/8), pN0 (0/17)), pN1 (6/29), pN1 (4/16), pN1 (3/29) und pN1 (7/22). Einer der Patienten (Patient 6) wies Fernmetastasen in der Leber auf und bei zwei der Patienten (Patient 4 und 8) konnten Angioinvasionen festgestellt werden. Die zwei Patienten mit dem sehr deutlichen Expressionsunterschied von AKR1B10 wiesen weder Angioinvasionen auf, noch waren Fernmetastasen bekannt.

6.5 Curcuminoide als Therapeutika

Das aus der Javanischen Gelbwurz (*Curcuma longa*) gewonnene Curcuma setzt sich überwiegend aus der Hauptkomponente Curcumin (77 %) und seinen zwei Analogen Demethoxycurcumin (DMC) (17 %) und Bisdemethoxycurcumin (BDMC) (3 %) zusammen^[233].

Für nachfolgende Versuche wurde eine solche Mischung verwendet, welche aufgrund ihrer Hauptkomponente jedoch im Folgenden als Curcumin deklariert wird. Curcumin, DMC und BDMC sind natürliche Komponenten mit einem breiten Wirkungsspektrum, das unter anderem antibakterielle, antivirale, antiinflammatorische und anticancerogene Eigenschaften mit einschließt. Von großem Vorteil erweist sich seine im Allgemeinen gute Verträglichkeit^[234, 235]. Curcuminoide, insbesondere das Analog Bisdemethoxycurcumin, inhibieren AKR1B10^[236, 237] und sind ebenso wirksame Modulatoren des ABCG2 *drug-efflux* Symporters, vor allem Curcumin^[238]. Deshalb erschienen Curcuminoide als mögliche Therapeutika zur Eliminierung von Side-Population Zellen als potentielle Krebsstammzellen. Nach einer vierundzwanzigstündigen Behandlung von L3.6pl_{G res} mit Curcumin wurden die Zellen auf ihren Gehalt an Side-Population Zellen hin untersucht (Abbildung 36).

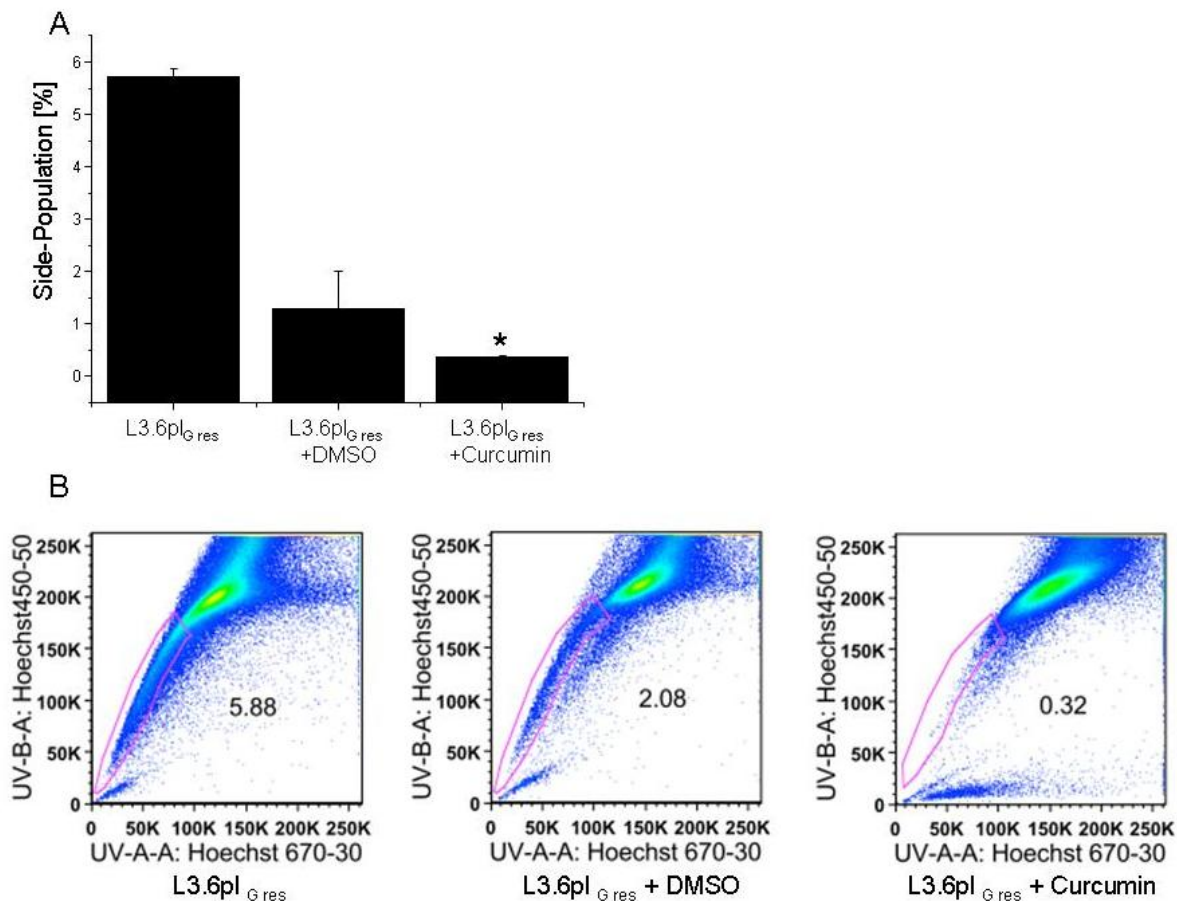


Abbildung 36: Side-Population-Gehalt in der Zelllinie L3.6pl_{G res} nach Behandlung mit Curcumin

Die Behandlung von L3.6pl_{G res} mit Curcumin führte zu einer signifikanten Reduktion der Side-Population. In der Kontrollgruppe, welche mit DMSO behandelt wurde, war ebenfalls ein Rückgang der Side-Population zu verzeichnen, so dass die Abnahme der Side-Population zwischen Kontrollgruppe und der mit Curcumin behandelten Zellen keine Signifikanz zeigte (A). L3.6pl_{G res} vs. L3.6pl_{G res} + Curcumin $p^* < 1E^{-6}$.

Density plots der Durchflusszytometrie zeigten jedoch eine Veränderung im Schweif der Side-Population nach Behandlung mit Curcumin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle oder L3.6pl_{G res} (B).

Im Vergleich zu L3.6pl_{G res} führte die Behandlung mit Curcumin zu einem signifikanten Rückgang der Side-Population von $5,71\% \pm 0,17\%$ auf $0,36\% \pm 0,04\%$. Dieser war mit dem von Verapamil vergleichbar ($0,33\% \pm 0,13\%$). Da das Curcumin in DMSO gelöst war, wurde DMSO als Kontrolle verwendet. Die Behandlung mit DMSO führte zu einem Rückgang der Side-Population auf $1,29\% \pm 0,72\%$. Zwischen der Kontrollgruppe und der mit Curcumin behandelten Zellen konnte zwar noch ein Rückgang der Side-Population von $0,93\%$ verzeichnet werden, welcher jedoch keine Signifikanz zeigte (Abbildung 36 A). *Density plots* der Durchflusszytometrie zeigten, dass der Schweif der Side-Population sowohl in der Probe L3.6pl_{G res} als auch in der DMSO-Kontrolle sehr schön zu sehen war, dessen Form in der mit Curcumin behandelten Probe aber nur noch sehr schwer auszumachen und stark nach oben

versetzt war, was dennoch auf eine Wirkung des Curcumins schließen lässt (Abbildung 36 B). Vorversuche mit der Zelllinie L3.6pl zeigten ebenfalls einen Rückgang der Side-Population nach Behandlung mit Curcumin, jedoch einen Anstieg in der DMSO-Kontrolle.

Nach Behandlung von L3.6pl_{G res} mit Curcumin wurde ebenfalls der Anteil an ABCG2 und CD24 positiven Zellen per Durchflusszytometrie ermittelt. Im Gegensatz zum SP-Anteil, welcher durch den Rückgang der DMSO-Kontrolle lediglich eine Tendenz der SP-reduzierenden Wirkung von Curcumin zeigte, hatte die Behandlung mit DMSO auf den ABCG2-Gehalt keinerlei Auswirkung. Dieser stieg gegenüber dem von L3.6pl_{G res} (2,83 % ± 0,8 %) mit 3,27 % ± 0,08 % leicht an. Die Behandlung mit Curcumin konnte den Anteil an ABCG2 positiven Zellen auf 0,59 % ± 0,21 % signifikant reduzieren (Abbildung 37 A).

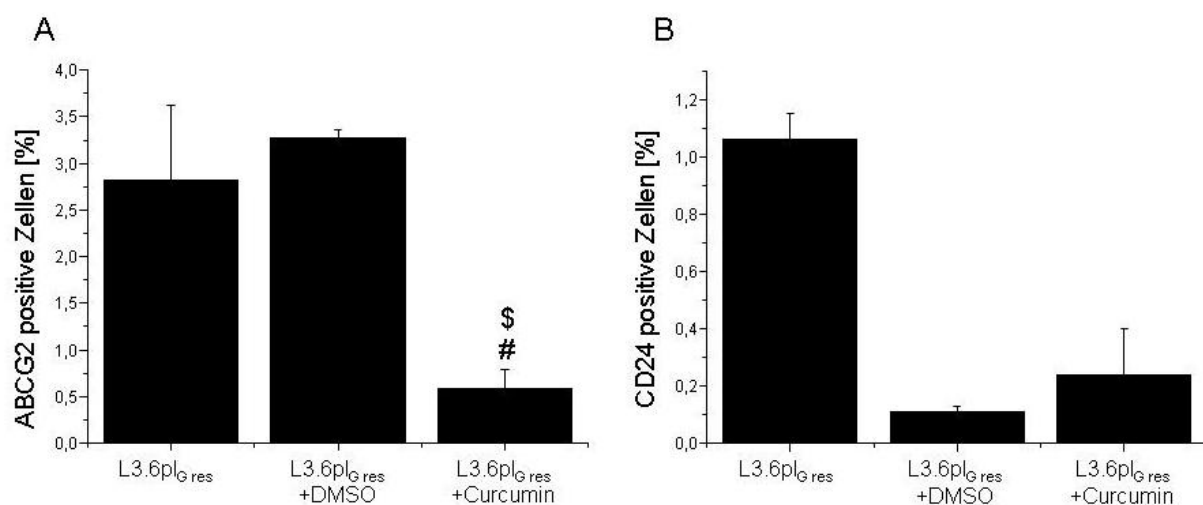


Abbildung 37: Anteil an ABCG2- und CD24 positiven Zellen nach Behandlung der Zelllinie L3.6pl_{G res} mit Curcumin

Zwischen der DMSO-Kontrollgruppe und L3.6pl_{G res} ergab sich kein signifikanter Unterschied im Gehalt an ABCG2. Nach Behandlung mit Curcumin sank der ABCG2-Anteil signifikant (A). L3.6pl_{G res} vs. L3.6pl_{G res} + Curcumin $p^{\#} < 0,005$; L3.6pl_{G res} + DMSO vs. L3.6pl_{G res} + Curcumin $p^{\$} < 5E^{-5}$.

Zum Ansprechen von Curcumin auf den CD24-Gehalt konnte keine Aussage getroffen werden, da der Anteil in der Kontrollgruppe sehr stark zurückging und der Marker CD24 somit durch DMSO stark beeinflusst wurde (B).

Die Wirkung von Curcumin auf den Marker CD24 konnte nicht ermittelt werden, da der Gehalt in der DMSO-Kontrollgruppe (0,11 % ± 0,02 %) im Vergleich zu L3.6pl_{G res} (1,06 % ± 0,09 %) sehr stark zurückging (Abbildung 37 B). Der Gehalt erwies sich niedriger als nach der Behandlung mit Curcumin (0,24 % ± 0,16 %), was darauf schließen lässt, dass DMSO die Oberflächenexpression von CD24 stark beeinflusst.

Da AKR1B10 als Side-Population Marker ermittelt wurde, sollte die Wirkung von Curcumin auf diesen ebenfalls untersucht werden. Ein Westernblot zeigte, dass DMSO die Expression von AKR1B10 im Vergleich zur unbehandelten Probe nur sehr gering beeinflusst. Die

Behandlung mit Curcumin führte jedoch zu einer starken Verringerung der Expression von AKR1B10 (Abbildung 38).

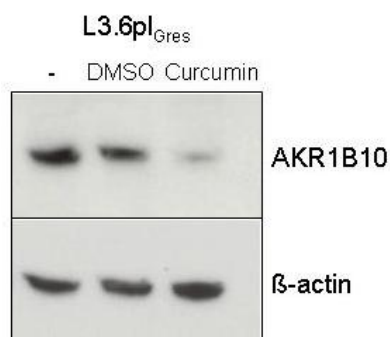


Abbildung 38: Westernblot zum Nachweis des Einflusses von Curcumin auf die Expression der Aldoketoreduktase 1B10

Die Behandlung mit Curcumin führte zu einer Hemmung der AKR1B10 Expression. Anhand einer Kontrolle mit DMSO konnte eine DMSO-bezogene Reduktion des Proteins AKR1B10 ausgeschlossen werden, so dass diese auf die Wirkung des Curcumins zurückzuführen war.

Schlussfolgernd eignet sich Curcumin zur Eliminierung der Side-Population Zellen, welche als potentielle Krebsstammzellen angesehen werden können, da es sowohl zu einem Rückgang der Side-Population als auch zu einer Verringerung ihrer Marker ABCG2 und AKR1B10 führte.

7 Diskussion

7.1 Identifizierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom

7.1.1 Hoechst 33342 als Krebsstammzellmarker

Die Hoechstoffärbung wird unter anderem verwendet, um potentielle Krebsstammzellen in Form des Side-Population-Phänotyps zu identifizieren. Ein entscheidendes Kriterium spielt hierbei eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapien, welche ihnen überwiegend durch den ABCG2-Symporter verliehen wird. Des Weiteren wurden Side-Population Zellen bereits in einigen Arbeiten als potentielle Krebsstammzellen, beziehungsweise als Anreicherung von potentiellen Krebsstammzellen beschrieben^[97, 103, 107, 113, 122, 124, 125]. Da Hoechst 33342 jedoch ein Membran-permeabler Farbstoff ist, welcher an Adenin-Thymin-reiche Regionen der DNA bindet^[239], musste gewährleistet sein, dass dieser Farbstoff zu keinerlei Veränderungen der Zelle, welche die experimentellen Daten beeinflussen, führt. Christgen et al. zeigten bereits, dass die Gene SOX17, EPC1 und SPRY1 in humanen Brustkarzinomzelllinien durch den Farbstoff herunterreguliert werden, die ABCG2 Expression davon jedoch nicht betroffen ist^[240]. Durch einen Westernblot konnten solche unerwünschten Effekte bei AKR1B10, ABCG2 und CD133 ausgeschlossen werden (Abbildung 26 B).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen sehr deutlich auf das Krebsstammzell-Potential der SP-Zellen hin. Dennoch kann bei dieser Methode keine klare Abgrenzung zwischen Side-Population Zelle und Non-Side-Population Zelle erfolgen. Die exakte Definition liegt hierbei im Ermessen des Betrachters. Die Side-Population definiert sich als Zellpopulation, welche in der Lage ist den Hoechstfarbstoff aus der Zelle wieder auszuschleusen. Die Zellen werden im FACS-Gerät simultan bei UV-rot- und UV-blau-Licht betrachtet. Die SP-Zellen erscheinen als Schweif, welcher von der Hauptpopulation abzweigt und in den linken unteren Quadranten des FACS-Profiles mündet. So ist es bei der Auswertung der Durchflusszytometrie möglich, das „Gate“ der Side-Population näher an die Hauptpopulation zu legen oder auch weiter davon entfernt. Verapamilhydrochlorid dient hierbei als Hilfe für das Setzen des „Gates“, wobei die Kontrolle an sich wiederum sehr stark von der verwendeten Konzentration abhängig ist. Die SP-Zellen zeigen sich in Form eines Schweifes, welcher ein unterschiedliches Spektrum an Stärke und Aktivität des ABCG2-Symporters aufweist. So pumpen die Zellen im linken Quadranten ganz unten am meisten Farbstoff aus der Zelle heraus, die Zellen nahe der Hauptpopulation am wenigsten, sie

werden jedoch alle als SP-Zellen deklariert. Zu den „Gating“-Problemen kommt hinzu, dass die Form des Schweifes und der Prozentsatz an SP-Zellen entscheidend von der Konzentration des Hoechst-Farbstoffs, der Inkubationszeit und Inkubationstemperatur beeinflusst werden.

Dennoch konnte nach Optimierung dieser Parameter in den Zelllinien L3.6pl und AsPC-1 ein relativ konstanter Prozentsatz an SP-Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigten sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* Krebsstammzell-Charakteristika. SP-Zellen waren in der Lage sich selbst zu erneuern und zu differenzieren, zeigten verstärkte Tumorinduktion und Metastasierung im Vergleich zu NSP-Zellen und eine differentielle Expression von Genen, welche in Zusammenhang mit Tumorinduktion, Differenzierung, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz stehen.

7.1.2 Prozentualer Anteil der Side-Population

In einigen Arbeiten wurde bereits der Side-Population-Anteil verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. So wiesen die Zelllinien SW1990, Capan-2 und BxPC-3 in einer Studie von Zhang et al. $2,7 \% \pm 0,35 \%$, $3,6 \% \pm 1,2 \%$ und $2,8 \% \pm 0,8 \%$ Side-Population auf^[125] und in einer Veröffentlichung von Kabashima wiesen die Zelllinien Panc-1, KP-1NL und Capan-2 $9,9 \% \pm 2,3 \%$, $20,2 \% \pm 1,8 \%$ und $8,2 \% \pm 5,2 \%$ Side-Population auf. Die Zelllinie MIA PaCa-2 zeigte hingegen korrelierend mit unserem Ergebnis keine SP-Zellen^[113]. Der prozentuale Anteil an Side-Population einer Zelllinie hängt sehr stark von der Hoechstkonzentration, Färbedauer, Inkubationstemperatur und der Auswertung ab, scheint jedoch für jede Zelllinie bei gleichem Versuchsaufbau spezifisch zu sein.

Da die Zelllinie FG keine Side-Population aufwies, wäre es möglich, dass sich der Side-Population Phänotyp durch die *in vivo* Selektion von FG zu L3.6pl entwickelt hat und dieser somit, wie die Experimente des orthotopen Tumormodells in Nacktmäusen zeigten, für das verstärkte Primärtumorwachstum und Metastasierungspotential der L3.6pl Zellen verantwortlich ist. Vergleicht man den Side-Population-Anteil der Zelllinie L3.6pl ($0,9 \% \pm 0,22 \%$) mit dem der Zelllinie AsPC-1, war Letzterer mit $62,37 \% \pm 5,63 \%$ sehr viel höher, obwohl das Metastasierungspotential dieser Zelllinie weitaus geringer ist. Aufgrund des *drug-efflux* Potentials der Side-Population steht diese ebenfalls für erhöhte Resistenz gegen Stoffe, welche mit diesem transportiert werden. Vergleicht man die Gemcitabin- und 5-FU- IC_{50} beider Zelllinien scheint diese bei erhöhter Side-Population ebenfalls größer zu sein. L3.6pl wies gegen 5-FU eine IC_{50} von $0,1 \mu\text{g/ml}$ auf und gegen Gemcitabin eine IC_{50} von $6,11 \text{ ng/ml}$, AsPC-1 wies gegen 5-FU eine IC_{50} von $3 \mu\text{g/ml}$ auf und gegen Gemcitabin eine IC_{50} von $162 \mu\text{g/ml}$. Ausschlaggebend ist hier möglicherweise der sehr große Unterschied in der Gemcitabin-Resistenz, da diese im Gegensatz zu 5-FU mit dem SP-Phänotyp korrelierte.

Ebenso korrelierte die Protein-Expression von AKR1B10 mit dem Side-Population-Phänotyp (Abbildung 25). Die Zellen der Linie AsPC-1 wiesen eine stärkere AKR1B10 Expression auf als Zellen der Linie L3.6pl.

Daraus ergeben sich für die Side-Population zwei voneinander unabhängige Wirkungspotentiale. Zum einen ihr aggressives Potential Tumore zu induzieren und Metastasen zu bilden, zum anderen eine erhöhte Chemotherapie-Resistenz, beispielsweise gegen Gemcitabin. Somit ist nicht der prozentuale Anteil der Side-Population an sich ausschlaggebend, sondern der jeweilige Anteil, welcher für die Aggressivität/Metastasierung oder Resistenz steht. Daher wäre es wichtig innerhalb der Side-Population weitere Marker für diese Subpopulationen zu finden.

7.2 Das Potential der Side-Population zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SP-Zellen der Zelllinien L3.6pl und AsPC-1 nach zwei Wochen und zweimaligen Passagieren in der Lage waren in NSP Zellen zu differenzieren. In der Zelllinie L3.6pl verblieben $6,53 \% \pm 3,92 \%$ SP Zellen in der herausortierten SP-Fraktion, in der Zelllinie AsPC-1 waren es $58,45 \% \pm 0,96 \%$ (Abbildung 13). Im Einklang mit diesen Daten wurde auch in einigen Veröffentlichungen gezeigt, dass Side-Population Zellen in der Lage sind, Non-Side-Population Zellen zu bilden. Dies bezieht sich sowohl auf die humanen Pankreaskarzinomzelllinien SW1990^[125] und PANC-1¹ als auch auf SP-Zellen eines transgenen Glioma-Mausmodells^[97] oder eine kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinie^[123]. Interessant erscheint die Tatsache, dass es nach Reaktivierung von Non-Side-Population Zellen der Zelllinien L3.6pl und AsPC-1 zur Detektion von Side-Population Zellen kam. So wiesen L3.6pl NSP Zellen nach zwei Wochen und zweimaligem Passagieren $0,98 \% \pm 0,33 \%$ SP-Zellen auf, bei der Zelllinie AsPC-1 waren es $49,11 \% \pm 0,8 \%$ (Abbildung 13). Ein Prozentsatz, welcher annähernd dem der unsortierten Zelllinien gleicht. Bei PANC-1 Zellen zeigte die isolierte NSP-Fraktion nach 7 Tagen $0,67 \% \pm 0,29 \%$ SP Zellen^[113], in der Zelllinie SW1990 waren es nach 14 Tagen $0,4 \%$ ^[125]. Die Autoren beider Veröffentlichungen gehen jedoch davon aus, dass NSP-Zellen nicht in der Lage sind, SP-Zellen zu generieren, sondern dass dies auf Unreinheiten bei dem Sortiervorgang zurückzuführen ist. In diesen Fällen wäre es interessant eine weitere Reanalyse nach beispielsweise 2 und 4 Wochen durchzuführen, um zu sehen, ob sich der SP-Prozentsatz weiter dem ursprünglichen SP-Gehalt angleicht. Auch die Lungenkarzinomzelllinie H460 wies in einer Publikation in der sortierten SP-Fraktion nach zwei Wochen mehr SP-Zellen auf ($8,8 \%$) als in der sortierten NSP-Fraktion ($3,7 \%$)^[107]. Der ursprüngliche SP-Gehalt dieser Zelllinie lag bei $5,6 \%$. Bei diesen Werten scheint die

Vermutung naheliegend, dass die Zelllinie nach geraumer Zeit versucht, den SP-Gehalt in den sortierten Fraktionen dem ursprünglichen der unsortierten Zellen anzugleichen. Diese Hypothese wurde bereits beim kleinzelligen Bronchialkarzinom bestätigt^[123] und konnte in unserem Labor auch an einer Ösophaguskarzinomzelllinie gezeigt werden. Insbesondere die Zelllinie AsPC-1 verdeutlicht, dass 49,11 % SP-Zellen in der ursprünglichen NSP-Fraktion vermutlich nicht ausschließlich auf einer Unreinheit der Sortierung beruhen und auch die Resultate der Zelllinie L3.6pl verweisen auf eine aktive Wiederherstellung des ursprünglichen Verhältnisses an SP- und NSP-Zellen. Um eine solch intensive Proliferation von SP-Zellen zu ermöglichen, muss zunächst das Vorhandensein einiger weniger SP-Zellen in der NSP-Fraktion gewährleistet sein. Unter Umständen ist dies durch Unreinheiten bei der Sortierung gegeben. Kurz nach dem Sortiervorgang zeigte eine erneute Analyse von NSP-Zellen der Zelllinie L3.6pl, dass diese 0,01 % SP-Zellen aufwiesen. Eine Umwandlung von NSP-Zellen zu SP-Zellen erscheint zunächst unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch das eventuelle Vorhandensein von inaktiven *drug-efflux* Transportern während des Sortierens muss berücksichtigt werden. Sollte dies der Fall sein, wird eine Zelle mit inaktiven Efflux-Symportern der Gruppe der NSP-Zellen zugeordnet. Kommt es anschließend zu einer Aktivierung der Efflux Symporter ist diese SP-Zelle in der NSP-Fraktion vorzufinden, welche durch sich selbsterhaltende Zellteilungen in der Lage ist sich zu vermehren.

7.3 Charakterisierung potentieller Krebsstammzellen beim Pankreaskarzinom

7.3.1 Das Potential der Side-Population zur Tumorinduktion im orthotopen Pankreastumormodell

Nach orthotoper Injektion von SP-, NSP- und unsortierten Zellen in immundefiziente Mäuse zeigten sich, gemessen an Tumolvolumen und -masse, SP-Zellen sehr viel tumorigener als unsortierte Zellen und diese wiederum als NSP-Zellen, entsprechend ihrem SP-Gehalt zum Zeitpunkt der Injektion. Dies traf sowohl auf die Zelllinie L3.6pl zu, denn die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten eine hohe Signifikanz, aber auch die Ergebnisse der Zelllinie AsPC-1 zeigten eine solche Tendenz. Dennoch sollte auf den Aspekt eingegangen werden, dass auch die NSP-Fraktion in der Lage war Tumore zu induzieren, insbesondere die der Zelllinie AsPC-1. *In vitro* Experimente zeigten, dass zwei Wochen nach Sortieren der Zellen sowohl bei der Zelllinie L3.6pl als auch bei AsPC-1 in der NSP-Fraktion ein SP-Gehalt nahezu identisch dem ursprünglichen SP-Gehalt dieser Zelllinien vorzufinden war (Abbildung 13). Ebenso reduzierte sich nach zwei Wochen der SP-Gehalt der sortierten SP-Fraktion.

Sollte sich dieses Phänomen auch *in vivo* ereignen, lässt dies den Schluss zu, dass Tiere, welchen SP-Zellen injiziert wurden, lediglich einen Vorsprung hinsichtlich des Tumorwachstums gegenüber den Tieren, welchen NSP-Zellen injiziert wurden, haben, da diese nach etwa zwei Wochen den gleichen SP-Gehalt wie die unsortierte Zelllinie aufwiesen. Da bei der Zelllinie AsPC-1, welche in etwa genauso viele SP-Zellen wie NSP-Zellen aufwies, nach Sortieren die Abweichung von SP- und NSP-Gehalt zum Ursprungsgehalt kleiner ist als bei der Zelllinie L3.6pl, findet hier eine schnellere Anpassung an den Ursprungsgehalt statt beziehungsweise stehen schneller ausreichende Mengen an aggressiven SP-Zellen zur Tumorinduktion zur Verfügung. Dies könnte die signifikanteren Ergebnisse der Zelllinie L3.6pl gegenüber AsPC-1 erklären. Ein Tierversuch mit sehr viel längerer Versuchslaufzeit könnte hierzu Belege liefern. Je länger der Tierversuch wäre, desto weniger Unterschiede sollten zwischen der SP- und NSP-Gruppe ersichtlich sein. Dies ist ethisch gesehen jedoch nicht zulässig und auch praktisch nicht zu realisieren, da bei der längeren Versuchsdauer in dieser Arbeit bereits drei der L3.6pl-SP-Tiere kurz vor Versuchsende verstorben sind. Diese hohe Todesrate belegt erneut die Aggressivität der SP-Zellen.

Nach Opferung der Tiere des Versuchs mit L3.6pl Zellen wurde immunhistologisch auf den Paraffinschnitten nicht nur eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung, sondern ebenso eine Ki-67 Färbung zum Nachweis der Zellproliferation durchgeführt. Zu erwarten wäre eine starke Expression in der SP-Gruppe und eine schwache Expression in der NSP-Gruppe gewesen. Die Färbung zeigte jedoch eine starke Proliferation in der NSP-Gruppe, eine mittelstarke in der Gruppe der unsortierten Zellen und eine schwächere in der SP-Gruppe (Abbildung 18). Dieses Ergebnis korrelierte stark mit dem Grad der Nekrose. Je mehr nekrotische Areale vorhanden waren, desto weniger stark wurde Ki-67 exprimiert. Dies ist in sofern plausibel, da nekrotische Zellen nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren. Die Randregionen der SP-Gruppe wiesen weniger Nekrose und eine stärkere Ki-67 Expression auf. Die starke Zellproliferation in der NSP-Gruppe unterstützt die Hypothese, dass sich nach einiger Zeit der SP-Gehalt in der NSP-Fraktion dem ursprünglichen SP-Gehalt der Zelllinie angleicht, was somit zu einer verspäteten Tumorinduktion führt. Des Weiteren sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Tumorinduktion in der NSP-Gruppe ihren Ursprung in weiteren SP-unabhängigen Krebsstammzell-Subpopulationen wie beispielsweise CD133 oder CD24 haben könnte.

Die *in vivo* Versuche dieser Arbeit belegen deutlich die Krebsstammzellcharakteristika der SP-Zellen. Diese beziehen sich nicht nur auf die Fähigkeit der SP-Zellen verstärkt Tumore zu induzieren (Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21), sondern auch auf das starke Metastasierungspotential (Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2).

7.3.2 Analyse von SP- und NSP-Zellen der Zelllinie L3.6pl auf mRNA-Ebene mittels Affymetrix Microarray

Die Genchipanalyse zeigte einige Unterschiede auf RNA-Ebene zwischen der SP- und NSP-Fraktion auf (Tabelle 6.3 und Tabelle 6.4). Dies verdeutlicht sehr stark die Heterogenität dieser Zelllinie und das Vorhandensein einer Zellhierarchie.

Der *drug-efflux* Symporter ABCG2 war mit einem *2 fold change* von 2,48 das Gen, welches am zweitstärksten in der Side-Population überexprimiert wurde. ABCG2 wurde bereits hinsichtlich seiner Eignung als Stammzellmarker und Marker für Chemotherapie-Resistenz besprochen. Seine hohe Expression in der SP-Gruppe diene als Verifizierung für die Sortierung der Analyse-Proben und bestätigte seine Rolle für die Ausbildung des Side-Population-Phänotyps. Den höchsten *2 fold change* wies das Gen AKR1B10 mit 3,787 auf. Ihm wurde besondere Beachtung geschenkt, da es als einziges Gen stärker als ABCG2 exprimiert wurde. Die Aldoketoreduktase 1B10 gehört zur AKR1B Unterfamilie, welche wiederum der Aldoketoreduktase (AKR) Superfamilie zu zuordnen ist (Abbildung 39).

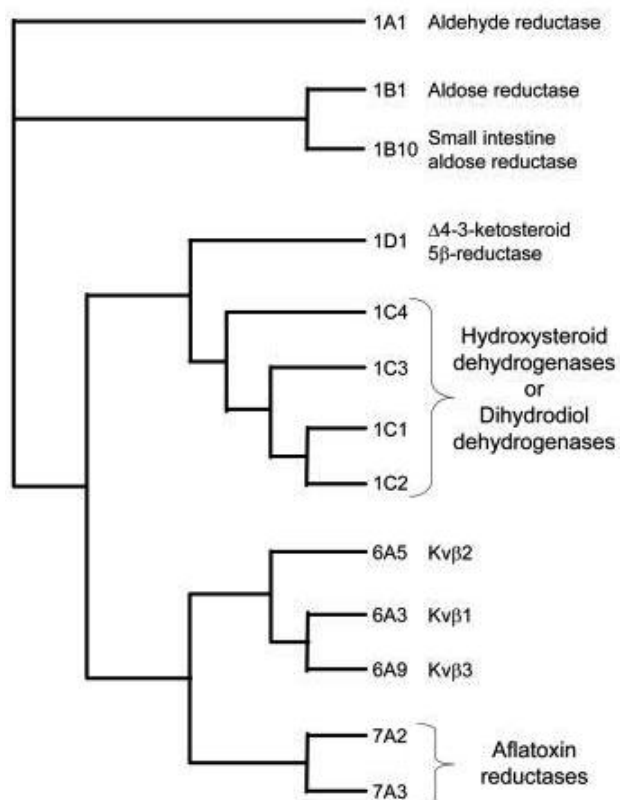


Abbildung 39: Kladogramm humaner AKRs (nach Barski et al. [232])

Säugetier AKRs lassen sich in drei Familien gliedern, AKR1, AKR6 und AKR7. Es konnten bisher dreizehn unterschiedliche menschliche AKR Proteine identifiziert werden, welche diesen drei Hauptfamilien zu zuordnen sind.

Zu AKR1B1 liegt eine Identität von 71 % vor^[241]. Während AKR1B10 hauptsächlich im Dünndarm, Dickdarm, schwächer in der Leber und in sehr abgeschwächter Form auch im Thymus, der Prostata und Hoden, für gewöhnlich jedoch nicht im Pankreas exprimiert wird, tritt die Expression der Aldose Reduktase in einem breiten Spektrum von Geweben inklusive Pankreas auf^[241]. Die Aldoketoreduktase 1B10 erwies sich bereits als potentieller Remissionsmarker bei Gebärmutterhalskrebs^[174] und als Tumormarker für das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom bei Rauchern^[175]. Die Aldoketoreduktase 1B10 konnte sogar in plattenepithelialen Metaplasien nachgewiesen werden, bei welchen es sich um präkanzeröse Läsionen des Plattenepithelkarzinoms handelte^[175]. Eine Überexpression trat auch beim Leberkarzinom auf^[241] und *Silencing* des Gens führte zu einer Inhibition des Wachstums von colorektalen Krebszellen^[176].

Des Weiteren scheint es für Krebsstammzeleigenschaften wie Inhibition von Differenzierung oder Chemotherapie-Resistenz mit verantwortlich zu sein. AKRs sind NADPH abhängige Oxidoreduktasen, welche durch Funktionalisieren von Carbonylgruppen an Aldehyden oder Ketonen zur Bildung von Primär- oder Sekundäralkoholen beitragen^[177]. Die Affinität von AKR1B10 zu Glukose ist geringer als die von AKR1B1. So scheint es, dass Retinale von AKR1B10 bevorzugt werden.

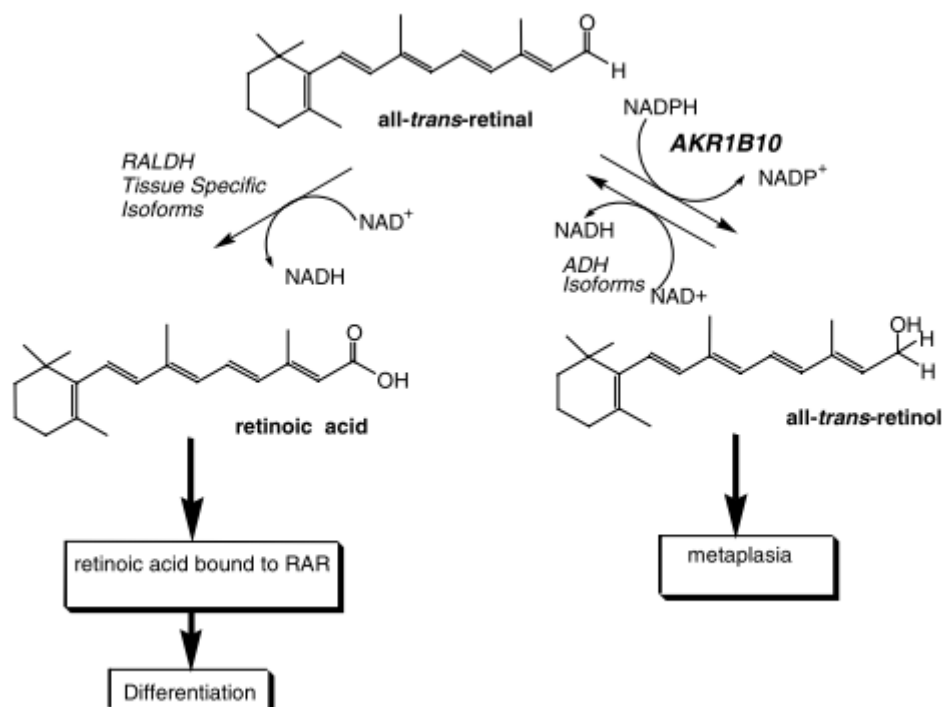


Abbildung 40: Potentielle Rolle von AKR1B10 beim Retinolsäure-Signalweg (nach Penning^[177])

Durch Überexpression von AKR1B10 werden die All-Trans-Retinale in All-Trans-Retinole umgewandelt, so dass keine Retinolsäure vermittelte Differenzierung mehr stattfinden kann.

Normalerweise werden All-Trans-Retinale irreversibel zu Retinolsäure konvertiert. Wird AKR1B10 jedoch überexprimiert, wandelt es All-Trans-Retinale in All-trans-Retinole um. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Mechanismus in der Lage ist, eine Retinolsäure vermittelte Differenzierung zu inhibieren^[177] (Abbildung 40). Einige Chemotherapeutika wie Daunorubicin, Doxorubicin oder Oracin stellen Substrate für AKRs dar, da sie Keton-Gruppen aufweisen. AKR1B10 ist in der Lage das cytostatische Daunorubicin oder Oracin zu seinen korrespondierenden Alkoholen zu reduzieren und leistet somit einen potentiellen Beitrag zur Chemotherapie-Resistenz^[242, 243]. Neue Studien zeigten des Weiteren, dass AKR1B10 auch die Synthese von Fettsäuren in Brustkrebszellen beeinflusst, indem es die Stabilität der Acetyl-CoA Carboxylase α reguliert^[244]. Ein weiteres Mitglied der AKR-Familie, AKR1C3 wurde, wenn auch wesentlich geringer, in der Side-Population überexprimiert (2 *fold change* von 1,104) und scheint ebenso ein All-Trans-Retinolsäure vermittelter Differenzierungsinhibitor zu sein, sowie ein Inaktivator von Doxorubicin und Oracin^[224, 226]. Darüber hinaus wurde auch EID3 (*EP300 interacting inhibitor of differentiation 3*) mit einem 2 *fold change* von 1,771 überexprimiert, ein Gen welches die Differenzierung von Muskeln *in vitro* inhibiert^[183], sowie GDF15 (*growth differentiation factor 15*, 2 *fold change* von 1,589), welches der TGF- β Superfamilie zugehört. GDF15 ist auch als MIC-1 (*macrophage-inhibiting cytokine-1*) bekannt und wird, zum Teil im Serum, in colorektalem Karzinom^[191], Pankreaskarzinom^[194], Ovarialkrebs^[196] und Prostatakrebs^[190] überexprimiert. In Letzterem führte GDF15 zur Reduktion der Zelladhäsion. Somit trägt es möglicherweise zur Tumordissemination *in vivo* bei^[193]. Mit einem 2 *fold change* von 1,439 war auch der Orphan Nuklear Rezeptor NR0B1 in der Side-Population der Zelllinie L3.6pl hochreguliert. Seine Überexpression konnte auch in der Side-Population der Lungenadenokarzinomzelllinie A549 gezeigt werden^[201, 202]. In einer Veröffentlichung von Oda et al. wurde die Rolle von NR0B1 beim Lungenadenokarzinom genauer untersucht^[201]. So führte eine Reduktion der Expression durch siRNA weder zu einer Änderung des Gehalts an Side-Population noch zu veränderter Proliferation. Jedoch reagierten die Zellen sensitiver auf das Chemotherapeutikum Topotecan und mit geringerer Fähigkeit zur Invasion und Tumorinduktion. In Patientenproben korrelierte starke Expression von NR0B1 mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und Rezidiven. NR0B1 wird beim Ewing Sarkom durch das Onkoprotein EWS/FLI bzw. EWS/FLI1 reguliert und spielt bei seiner Onkogenese eine Rolle^[199, 200]. Auch beim epithelialen Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass NR0B1 in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose steht^[197]. Des Weiteren ist bekannt, dass NR0B1 für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen mitverantwortlich ist und ein Ausschalten des Gens zu Differenzierung führt^[198]. Die micro RNAs 221 und 21 wiesen einen 2 *fold change* von 1,742 und 1,427 auf. Micro RNAs (miRNAs) erfuhren in jüngster Zeit sehr viel Aufmerksamkeit. Dabei handelt es sich

um kleine, hoch konservierte, nichtkodierende RNAs mit regulativen Eigenschaften, die posttranskriptional stattfinden. Sie wurden 1993 erstmals in *C. elegans* entdeckt^[245, 246]. Das Primärtranskript, die pri-miRNA wird im Nukleus mit Hilfe eines Enzymkomplexes, bestehend aus der Drosha, einer RNase III, und DGCR8, einem RNA-bindenden Protein, zur pre-miRNA prozessiert^[247]. Nach dem Transport durch Exportin 5 ins Zytoplasma prozessiert der Dicer die pre-miRNA zu einer in etwa 20-22 Nukleotid langen reifen miRNA^[248]. Diese binden komplementär an konservierte Sequenzen innerhalb der 3'UTR von Protein kodierenden Genen, um diese auszuschalten. Es wird geschätzt, dass miRNAs bis zu ein Drittel aller humanen Gene regulieren^[189]. So gibt es einige Studien, welche belegen, dass miRNA221 und/oder miRNA21 beim Pankreasadenokarzinom eine wichtige Rolle spielen und differentiell exprimiert werden^[249-251], ebenso beim Gliom, Brustkrebs, Ovarialkarzinom, kolorektalem Karzinom, Magenkarzinom, Leberkarzinom, Prostatakrebs, Lungenkrebs, Leukämie und (papillärem) Schilddrüsenkrebs^[252-256]. Park et al. zeigten, dass eine Antisense Inhibition der miRNA221 oder miRNA21 beim Pankreaskarzinom den Zellzyklus anhält, zu Apoptose sowie zu einer Sensibilisierung für Gemcitabin führt^[189]. Rieu et al. zeigten, dass die Expression von miRNA21 und miRNA221 in humanen PanINs mit dem Grad der Läsion ansteigt^[257]. Laut microRNA.org weisen die herunterregulierten Gene GBP6 und MPPED2 eine potentielle Bindestelle für die miRNA21 und PTPRZ1 eine potentielle Bindestelle für die miRNA221 auf. Es wäre denkbar, dass die beiden micro RNAs unter Umständen über direkte oder indirekte Mechanismen für das unterschiedliche Expressionsmuster zwischen Side-Population und Non-Side-Population (mit)verantwortlich sind. Daher sollte ihre Rolle weiter untersucht werden.

MAP1B (2 fold change von 1,377) interagiert mit dem Tumorsuppressor RASSF1A, weshalb angenommen wird, dass seine Funktion als Tumorsuppressor über die Interaktion mit Mikrotubuli stattfindet^[211]. TXNRD1 (2 fold change von 1,284) korrelierte bei Brustkrebs mit einem kürzeren metastasefreien Überleben und ist bei ERBB2-positiven Patienten erhöht^[184]. Eine Reduktion der Expression in murinen Lungenkarzinomzellen führte zu einer Morphologie und einem Wachstumsverhalten, welches dem von normalen Zellen gleicht. *In vivo* zeigten Mäuse weniger Metastasen und eine Reduktion in der Tumorprogression verglichen mit der Kontrollgruppe^[185]. NID2 (2 fold change von 1,217) zeigte Potential als neuer Biomarker beim Ovarialkarzinom^[205]. Mit einem ähnlichen 2 fold change von 1,216 folgte NTS, ein Stimulant für das Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie MIAPaCa-2^[210]. Dabei kommt es durch NTS zu einer Stimulation von ERK und JNK^[208]. Beim Pleuramesotheliom korrelierte es mit einer schlechten Prognose und ein Ausschalten in der Zelllinie MSTO-211H führte zu einem signifikanten Rückgang von Invasion und Migration^[206]. In einigen Krebsarten wie Lungen-, Brust- und Prostatakrebs oder Melanomen konnte eine Hochregulation von Wnt5a (2 fold change von 1,152) ausgemacht werden^[212]. Beim

Melanom und Magenkarzinom nimmt diese mit der Progression zu und ist mit einer schlechten Prognose für den Patienten behaftet^[213, 215]. Des Weiteren stimuliert Wnt5a die Migration und Invasion von Krebszellen beim Magen- und Pankreaskarzinom^[216]. S100P gehörte ebenso zu den Genen, welche in der Side-Population hochreguliert waren (2 *fold change* von 1,123) und wird auch beim Pankreaskarzinom überexprimiert^[219]. *In vitro* wurde es in Zusammenhang mit Zellproliferation, Migration, Invasion und der Aggressivität von Tumoren der Bauchspeicheldrüse gebracht^[217]. Ein großer Vorteil von S100P ist, dass eine Detektion im Pankreassaft möglich ist und es einen spezifischen Marker für das Pankreaskarzinom darstellt und nicht, wie viele andere Marker, bei chronischer Pankreatitis exprimiert wird^[222, 223, 258]. S100P spielt jedoch auch bei Brustkrebs, Prostatakrebs, Darmkrebs und Lungenkrebs eine Rolle^[218, 221]. Die Schlusslichter bildeten GDA und RSPO3 mit einem 2 *fold change* von 1,104 und 1,027. Die Guanin-desaminase ist ein Enzym, welches Guanin zu Xanthin desaminiert. Einige Purin Antagonisten mit dem Baustein Guanin werden als Chemotherapeutikum eingesetzt und durch die GDA inaktiviert^[228]. R-Spondin 3 hatte einen 2 *fold change* von 1,027. In der Literatur wurde beschrieben, dass es Angiogenese fördert, bei der Aktivierung des Wnt-Signalwegs eine Rolle spielt, indem es DKK1 inhibiert und ein potentiell Onkogen bei Brustkrebs darstellt^[229-231].

Eine Vielzahl kleiner, nicht kodierender RNAs, wie snoRNA, Y RNA, snRNA, spliceosomal RNA, ncRNA, scRNA oder rRNA wurden ebenso in der Side-Population überexprimiert. Y RNAs können durch ihr Binden an Ro die Bindung von missgefalteten, nicht kodierenden RNAs an Ro unterbinden. Normalerweise bindet Ro missgefaltete RNAs und ist somit für die Qualitätskontrolle nicht kodierender RNAs zuständig^[259]. Durch die Überexpression von Y RNAs könnte es somit zu einer Anreicherung missgefalteter RNAs kommen, welche wiederum zu Zellschäden führen. Y RNAs werden auch für die DNA-Replikation benötigt und in Tumoren der Harnblase, Cervix, Colon, Niere, Lunge und Prostata überexprimiert^[260, 261]. SnoRNAs sind überwiegend für die Prozessierung und Modifikation von rRNA zuständig, während die snRNA als katalytisch aktiver Bestandteil des Spleißosoms beim Spleißen involviert ist^[262].

In Analysen von Side-Population- und Non-Side-Population Zellen der humanen Lungenadenokarzinomzelllinie A549 wurden ABCG2 (2 *fold change* von 2,51), NR0B1 (2 *fold change* von 2,78) und andere Mitglieder der Aldoketoreduktasen, AKR1C1 und AKR1C2 (2 *fold change* von 3,11) ebenfalls in der Side-Population überexprimiert^[202]. Dies zeigt, dass die 2 *fold changes* des Affymetrix Microarrays in dieser Arbeit ähnliche Werte aufwiesen, wie in anderen Untersuchungen von SP- und NSP-Zellen und es nichts Ungewöhnliches ist, wenn andere Gene stärker differentiell exprimiert werden als der Selektionsmarker ABCG2. Die mittels Affymetrix Genchip zwischen Side-Population und Non-Side-Population ermittelten, differentiell exprimierten Gene zeigen mögliche Ursachen für deren Unterschied

in ihrem Potential der Tumorinduktion, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz auf. Einige wurden bereits hinsichtlich Tumorinduktion, Differenzierung, Metastasierung und Chemotherapie-Resistenz in der Literatur diskutiert und scheinen im Bereich der Krebsstammzellcharakteristika eine Rolle zu spielen.

7.4 Chemotherapie-Resistenz und die Rolle von Krebsstammzellen

Zur Erstellung der Chemotherapie-resistenten Varianten der Zelllinie L3.6pl wurden Gemcitabin und 5-FU, die Standardchemotherapeutika welche beim Pankreaskarzinom zur Anwendung kommen, verwendet. Anschließend wurden die resistenten Zelllinien auf die Side-Population, AKR1B10 und die potentiellen Krebsstammzellmarker ABCG2, CD133 und CD24 hin untersucht. CD133, unter anderem auch bekannt als AC133 oder Prominin 1, ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein mit fünf Transmembran-Domänen, welches an Membran-Protrusionen lokalisiert ist. Es wird als Marker für hämatopoetische Stammzellen verwendet, seine biologische Funktion ist jedoch bisher unklar^[263]. CD24 oder auch HSA (*heat-stable-antigen*) genannt, ist ein Glykoprotein, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker in die Zellmembran integriert ist und wird auf den meisten unreifen Linien hämatopoetischer Zellen exprimiert. Bei der Reifung von B- und T-Lymphozyten wird es zunächst stark exprimiert, anschließend wird die Expression wieder unterdrückt und gibt somit Aufschluss über den Reifegrad. Die Expression auf naiven B-Zellen vermittelt Zell-Zell Adhäsion, während die Expression auf antigenpräsentierenden Zellen ein co-stimulierendes Signal vermittelt, welches für die Aktivierung der T-Lymphozyten während einer Immunantwort von Bedeutung ist. Mäusen, welchen das HSA-Gen fehlt, zeigten eine Reduktion der späten pre-B und der unreifen B-Zellen im Knochenmark. Die Erythrozyten wiesen eine geringere Halbwertszeit auf und neigten leichter zu Aggregation und hypotonischer Lyse^[264]. Die Expression von CD24 wird auch mit Homeostase in Verbindung gebracht. So können CD24-Antikörper in murinen B-Zellvorläufern Apoptose induzieren und die Anti-CD40 induzierte Proliferation von ruhenden, reifen B-Lymphozyten unterdrücken^[265]. CD24 wirkt auch als co-Stimulant auf die klonale Vermehrung von T-Zellen^[266]. Einen bekannten Ligand stellt das P-Selektin dar^[267], ein Rezeptor für Neutrophile und Monozyten, welcher auf aktivierten Thrombozyten und dem Epithelium exprimiert wird^[268]. Dies könnte für den Prozess der Metastasierung von Bedeutung sein, da CD24-positive Zellen somit in der Lage sind zum Transport im Blutstrom an Thrombozyten und am Zielort an Endothelzellen zu binden^[269].

Mit steigender Resistenz gegen Gemcitabin nahm sowohl der Anteil der Side-Population als auch der Gehalt an ABCG2-, AKR1B10- und CD24- positiven Zellen zu, der von CD133 blieb hingegen unverändert. Mit zunehmender Resistenz gegen 5-FU nahmen jedoch der Side-

Population-Anteil und die Expression von AKR1B10 ab, während der Gehalt an ABCG2 und CD133 unverändert blieb (Abbildung 30, Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33). Weitere Versuche zeigten, dass ABCG2 und AKR1B10 in der Side-Population angereichert sind (Abbildung 26 A), die Side-Population aber nicht mit ABCG2 gleichzusetzen ist, da die Side-Population Zellen mit aktivem *drug-efflux* darstellt, ABCG2 jedoch lediglich das dafür hauptverantwortliche Oberflächenmolekül markiert. In der Non-Side-Population konnten ABCG2-positive Zellen ermittelt werden, welche möglicherweise auf zu diesem Zeitpunkt inaktive Symporter schließen lassen. Ebenso bestand die Side-Population nicht nur aus ABCG2 positiven Zellen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Antikörperfärbung nicht in der Lage ist, alle ABCG2 Oberflächenmoleküle anzufärben, oder es noch weitere *drug-efflux* Symporter gibt, welche an der Ausbildung des Side-Population-Phänotyps beteiligt sind. ABCC2 zeigte bei der Affymetrix-Analyse eine Hochregulation in der Side-Population, wenngleich nicht signifikant. Es gibt einen Fall in welchem die Expression von ABCG2 in humanem Nabelschnurblut nicht mit dem Side-Population-Phänotyp korrelierte^[270]. Während ABCG2 fast alleine für den SP-Phänotyp in Knochenmark verantwortlich ist, sind bei der Milchdrüse Mdr1a und Mdr1b mitverantwortlich^[271].

In den Experimenten dieser Arbeit erwies sich CD133 nicht als Stammzellmarker, da er weder mit der Side-Population korrelierte, noch durch die Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-FU beeinflusst werden konnte. Immer mehr Arbeiten zeigten, dass das Krebsstammzellpotential wie bisher angenommen, nicht auf CD133-positive Zellen beschränkt ist^[272-275]. Kontroverserweise wurde in der Arbeit von Hermann et al. gezeigt, dass CD133-positive Zellen der Zelllinie L3.6pl für einen metastatischen Phänotyp und Gemcitabin-Resistenz verantwortlich sind und es nach Behandlung mit Gemcitabin zu einer Anreicherung kommt^[111]. Ausschlaggebend könnte sein, dass das Gemcitabin hier jedoch nicht kontinuierlich, sondern lediglich für 24 h verabreicht wurde.

ABCG2, AKR1B10 und der Side-Population Phänotyp erwiesen sich in den Experimenten dieser Arbeit als potentielle Stammzellmarker. Diese Marker korrelierten stark und alle drei stiegen mit der Resistenz von Gemcitabin an. Eine Behandlung mit 5-FU zeigte keine Anreicherung dieser Marker, teilweise kam es sogar zu einer Reduktion.

Dies wirft die Frage auf, wie und ob Gemcitabin und 5-FU mit ABCG2, AKR1B10 und der Side-Population in Zusammenhang stehen und welche Resistenzmechanismen in den Zelllinien L3.6pl_{G res} und L3.6pl_{5-FU res} vorliegen. Mittels Westernblot konnte gezeigt werden, dass ein gängiger Resistenzmechanismus bei der Zelllinie L3.6pl_{5-FU res} vorliegt, nämlich eine Überexpression der TS (Abbildung 29). Somit wäre es möglich, dass die 5-FU Resistenz ausschließlich über die TS vermittelt wird und nichts mit der Side-Population, ABCG2 oder AKR1B10 zu tun hat. Es gibt keinerlei Hinweise darauf, dass Gemcitabin selbst oder 5-FU Substrate für den ABCG2-Symporter darstellen^[276]. Laut Dean et al. ist 5-FU ein Substrat für

ABCC11^[277], dieser ABC-Transporter ist bei der Affymetrix-Analyse jedoch nicht in Erscheinung getreten.

Zur Aufklärung der Resistenzmechanismen der Zelllinie L3.6pl_{G res} wurden mittels Westernblot hENT1, hENT2 und die Desoxycytidinkinase untersucht. Bei hENT1 war ein deutlicher Unterschied zwischen der 5-FU-resistenten und der Gemcitabin-resistenten Zelllinie erkennbar, jedoch konnte keine Reduktion der Aufnahmen von Gemcitabin zwischen L3.6pl_{G res} und L3.6pl nachgewiesen werden (Abbildung 29). Ebenso war kein Unterschied hinsichtlich hENT2 und der Desoxycytidinkinase feststellbar. Da jedoch sowohl die Side-Population, als auch ABCG2 und AKR1B10 nach Behandlung mit Gemcitabin anstiegen, liegt die Vermutung nahe, dass vielleicht ein weiterer Gemcitabin vermittelter Resistenzmechanismus existiert. Rudin et al. untersuchten die Toxizität von Gemcitabin hinsichtlich dessen Efflux und seiner Desamination.

Eine nicht selektive Inhibition des ABCC Transporters mittels Probenecid führte zu einer intrazellulären Anreicherung von dFdU (2', 2'-Difluorodesoxyuridin), dem desaminierten Metaboliten von Gemcitabin. Auch die Behandlung mit Verapamil, welches die Transporter ABCB1 und ABCG2 blockt, führte zu ähnlichen, jedoch nicht signifikanten Ergebnissen. Weder Probenecid noch Verapamil zeigten eine Änderung des intrazellulären Gemcitabingehalts nach einer Inhibition der Desaminierung, was auf einen mittels ABC-Transporter vermittelten dFdU-Efflux, jedoch keinen Gemcitabin-Efflux schließen lässt. Eine intrazelluläre Anreicherung von dFdU führte zu einer Inhibition der Cytidindesaminase und somit einer erhöhten Gemcitabinkonzentration mit vermehrter Toxizität. Rudin et al. schlossen somit auf eine ABCC-Transporter vermittelte Gemcitabin-Resistenz aufgrund eines erhöhten dFdU-Efflux welcher eine kontinuierliche Gemcitabindesamination erlaubt, und verwiesen tendentiell auf ein solches Potential von ABCG2^[278]. Ob dFdU möglicherweise auch ein Substrat für AKR1B10 darstellt, ist nicht bekannt.

Die Zelllinie L3.6pl, deren Gehalt an CD24 sehr gering war, zeigte sowohl nach Behandlung mit Gemcitabin als auch mit 5-FU, einen Anstieg dieses Markers. Doppelfärbungen zeigten eine gleichmäßige Verteilung zwischen SP- und NSP-Zellen und keine Überschneidung mit dem Antikörper für ABCG2. Somit muss die CD24-positive Zellpopulation als eine weitere, SP-/ABCG2-/AKR1B10-unabhängige Zellpopulation angesehen werden, mit potentiellem Stammzellcharakter. Um dies zu klären, sind jedoch weitere Versuche, wie sie mit Side-Population Zellen durchgeführt wurden, unerlässlich.

7.5 Expression des Proteins AKR1B10 in Normal- und Tumorgewebe des Pankreas von Patienten

In fünf von neun Patienten waren verschieden starke Expressionsunterschiede von AKR1B10 zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe ersichtlich (Abbildung 35). Es gab Andeutungen für eine Korrelation der AKR1B10 Expression zum Tumorgrading. Um diese verifizieren zu können, müsste jedoch eine größere Anzahl an Patienten untersucht werden. Bei keinem der untersuchten Patienten wurde eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Auffallend bei den untersuchten Patientenproben war eine im Allgemeinen starke Expression von AKR1B10, welche zum Teil auch in den Proben des Normalgewebes auftrat. Da laut Cao et al. AKR1B10 jedoch normalerweise nicht im Pankreas exprimiert wird^[241], könnte diese Expression möglicherweise bereits auf eine Ausdehnung des Tumors auf das Normalgewebe hinweisen, welche pathologisch noch nicht zu erkennen war und mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergehen könnte.

Um die Rolle von AKR1B10 bei der Chemotherapie-Resistenz im Patienten besser untersuchen zu können, wäre eine große Studie unerlässlich, welche sowohl neoadjuvante und adjuvante Therapien, als auch das Gesamtüberleben der Patienten mit berücksichtigen und Einblicke auf das Ansprechen von Gemcitabin hinsichtlich der AKR1B10 Expression geben würde.

7.6 Curcuminoide als Therapeutika

Die Curcuminoide boten sich aufgrund ihrer inhibierenden Wirkung auf AKR1B10 und den ABCG2-Transporter sowie ihrer im Allgemeinen guten Verträglichkeit an^[234-238]. Die inhibierende Wirkung auf AKR1B10 und ABCG2 bzw. die Side-Population konnte in dieser Arbeit *in vitro* bestätigt werden. Einen großen Nachteil stellte jedoch die Hydrophobität des Polyphenols dar. So zeigte das verwendete Lösungsmittel DMSO Einfluss auf den Gehalt der Side-Population. Die Anwendung von Curcumin bei Krebspatienten erscheint vielversprechend, doch seine geringe Bioverfügbarkeit ist ein limitierender Faktor, weshalb es nur bei einigen wenigen Patienten eine biologische Aktivität zeigte^[235]. Eine schlechte Absorption, ein schneller Metabolismus, eine geringe Halbwertszeit und eine schnelle Ausscheidung führen zu geringen Konzentrationen und schlechter Verteilung in Serum und Gewebe. Dagegen sollen Hilfsmittel, welche den Metabolismus hemmen, oder neue Formulierungen mit Nanopartikel, Liposomen und Phospholipidkomplexe Abhilfe schaffen^[279]. Gupta und Dixit zeigten, dass ein Curcumin-Phosphatidyl-Cholin-Komplex eine bessere Bioverfügbarkeit aufwies als Curcumin alleine. Dieser Komplex führte aufgrund seiner Amphiphilität zu einer besseren Absorption und einer besseren Löslichkeit sowohl in

Wasser als auch in Lipiden^[280]. Sasaki et al. konnten mit Hilfe von Nanopartikeln die Plasmakonzentration von Curcumin deutlich erhöhen^[281] und auch Zhang et al. entwickelten Curcumin-Rubusosid-Nanopartikel welche eine bessere Löslichkeit in Wasser und eine größere Stabilität als Curcumin aufwiesen^[282]. Ein Tierversuch mit diesen zur Eliminierung von SP-Zellen könnte Aufschluss über ihr Therapiepotential *in vivo* geben.

7.7 Ursprung einer Krebsstammzelle beim Pankreas

Fast alle Zellen der drei Gewebearten des Pankreas (exokrin, endokrin und duktal) stammen von Pdx1 und Ptf1a exprimierenden Zellen ab^[283, 284]. Einige dieser Zellen exprimieren Cpa1 und werden vor E14 (bei der Maus) als multipotente Vorläuferzellen mit Selbsterneuerungsvermögen angesehen^[285]. Eine transiente Expression von Neurog3 zeigt eine Spezifikation dieser Vorläuferzellen zu endokrinen Zellen wie β - oder α -Zellen an^[283], während die Expression von Cpa1 und Ptf1a nach E14 (bei der Maus) keine multipotenten Vorläuferzellen mehr anzeigt, sondern eine Spezifikation zu azinösen, exokrinen Zellen^[284, 285]. Im postnatalen Pankreas ohne etwaige Verletzungen gibt es keinerlei Hinweise mehr auf Stamm- oder Progenitor-Zellen. Zellwachstum, welches aufgrund der Langlebigkeit der Zellen bei der Bauchspeicheldrüse sehr gering ist, findet vielmehr durch Teilung von bereits differenzierten Zellen statt. So produzieren β -Zellen durch Selbstduplizierung neue β -Zellen^[286] und azinöse Zellen replizieren sich zur Regeneration von azinösen Zellen^[287]. Eine Transdifferenzierung von exokrinen Zellen in endokrine wie von azinösen Zellen in β -Zellen findet normalerweise nicht statt^[287]. Dennoch gibt es Hinweise auf die Existenz von fakultativen Stammzellen des Pankreas^[288]. Es konnte gezeigt werden, dass nach Ligation des Pankreasgangs, eine erneute Expression von Neurog3 in dukталen Zellen nachweisbar war. Diese Zellen zeigten nachfolgend eine Neogenese zu β -Zellen^[284, 289]. Auch konnte beobachtet werden, dass nach einem sehr hohen Verlust von β -Zellen, α -Zellen zu β -Zellen transdifferenzieren können^[290]. Ebenso gibt es Indizien, dass eine Regeneration der Bauchspeicheldrüse nach Pankreatitis durch die Reaktivierung des Notch Signalwegs und der damit einhergehenden Dedifferenzierung erfolgt^[291]. Eine Studie von Rovira et al. verwies auf Centroacinar- und Terminalduct-Zellen, Zellen, welche am Übergang von peripheren azinösen Zellen und dem benachbarten dukталen Epithel zu finden sind, als potentielle Progenitorzellen des Pankreas. Ein Teil dieser Zellen exprimiert ALDH1 und Transkriptionsfaktoren des embryonalen Pankreas, wie Sca1, Sdf1, c-Met, Nestin und Sox9. Diese Zellen zeigten spontane endo- und exokrine Differenzierung^[292]. Der *drug-efflux* Symporter ABCG2 konnte sowohl in Inselzellen als auch in azinösen Zellen des Pankreas detektiert werden^[293] und auch der Side-Population Phänotyp trat sowohl bei Insel-, als auch bei nicht-Insel-Zellen auf^[294].

Fest steht, dass die Bauchspeicheldrüse keine herkömmliche Stammzellnische aufweist, sondern, wenn überhaupt, lediglich fakultative Stammzellen, welche durch Dedifferenzierung aus adulten Zellen des Pankreas hervorgehen. Somit deutet der Ursprung einer Krebsstammzelle beim Pankreaskarzinom auf keine herkömmliche, sondern eher auf eine solche fakultative Stammzelle hin. Dies könnte auch die Dedifferenzierung einer NSP-Zelle zu einer SP-Zelle erklären.

8 Literaturverzeichnis

1. Bramhall, S.R., et al., *Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study*. Br J Surg, 1995. **82**(1): p. 111-5.
2. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
3. Van Cutsem, E., et al., *Systemic treatment of pancreatic cancer*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004. **16**(3): p. 265-74.
4. Rosewicz, S. and B. Wiedenmann, *Pancreatic carcinoma*. Lancet, 1997. **349**(9050): p. 485-9.
5. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
6. Flanders, T.Y. and W.D. Foulkes, *Pancreatic adenocarcinoma: epidemiology and genetics*. J Med Genet, 1996. **33**(11): p. 889-98.
7. Talamini, R., et al., *Tobacco smoking, alcohol consumption and pancreatic cancer risk: A case-control study in Italy*. Eur J Cancer, 2009.
8. Lowenfels, A.B., et al., *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group*. N Engl J Med, 1993. **328**(20): p. 1433-7.
9. Vrieling, A., et al., *Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Int J Cancer, 2009.
10. Johansen, D., et al., *Different markers of alcohol consumption, smoking and body mass index in relation to risk of pancreatic cancer. A prospective cohort study within the Malmo Preventive Project*. Pancreatology, 2009. **9**(5): p. 677-86.
11. Tramacere, I., et al., *Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation*. Int J Cancer, 2009.
12. Schenk, M., et al., *Familial risk of pancreatic cancer*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(8): p. 640-4.
13. Brune, K.A., et al., *Importance of Age of Onset in Pancreatic Cancer Kindreds*. J Natl Cancer Inst, 2010.
14. Brat, D.J., et al., *Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(2): p. 163-9.
15. Keim, V., *Chronic Pancreatitis - Pancreas Cancer: Influence of Genetic Factors*. Praxis, 2005. **94**: p. 811 - 817.

16. Brockie, E., A. Anand, and J. Albores-Saavedra, *Progression of atypical ductal hyperplasia/carcinoma in situ of the pancreas to invasive adenocarcinoma*. *Ann Diagn Pathol*, 1998. **2**(5): p. 286-92.
17. Slebos, R.J., et al., *K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. **9**(11): p. 1223-32.
18. Hruban, R.H., R.E. Wilentz, and S.E. Kern, *Genetic progression in the pancreatic ducts*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(6): p. 1821-5.
19. Hruban, R.H., et al., *K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(2): p. 545-54.
20. Grunewald, K., et al., *High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas*. *Int J Cancer*, 1989. **43**(6): p. 1037-41.
21. Terhune, P.G., et al., *K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1998. **7**(6): p. 515-21.
22. Hruban, R.H., et al., *Progression model for pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(8): p. 2969-72.
23. Yanagisawa, A., et al., *Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation*. *Cancer Res*, 1993. **53**(5): p. 953-6.
24. Wilentz, R.E., et al., *K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma*. *Cancer*, 1998. **82**(1): p. 96-103.
25. Berthelemy, P., et al., *Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer*. *Ann Intern Med*, 1995. **123**(3): p. 188-91.
26. Berndt, C., et al., *K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases*. *Clin Chem*, 1998. **44**(10): p. 2103-7.
27. Day, J.D., et al., *Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms*. *Hum Pathol*, 1996. **27**(2): p. 119-24.
28. Komoto, M., et al., *HER2 overexpression correlates with survival after curative resection of pancreatic cancer*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(7): p. 1243-7.
29. Geradts, J., et al., *Immunohistochemical p16INK4a analysis of archival tumors with deletion, hypermethylation, or mutation of the CDKN2/MTS1 gene. A comparison of four commercial antibodies*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2000. **8**(1): p. 71-9.

30. Caldas, C., et al., *Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 27-32.
31. Hustinx, S.R., et al., *Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion*. Mod Pathol, 2005. **18**(7): p. 959-63.
32. Schutte, M., et al., *Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3126-30.
33. Schneider, G. and R.M. Schmid, *Genetic alterations in pancreatic carcinoma*. Mol Cancer, 2003. **2**: p. 15.
34. Yu, D. and M.C. Hung, *The erbB2 gene as a cancer therapeutic target and the tumor- and metastasis-suppressing function of E1A*. Cancer Metastasis Rev, 1998. **17**(2): p. 195-202.
35. Parsons, B.L. and F. Meng, *K-RAS mutation in the screening, prognosis and treatment of cancer*. Biomark Med, 2009. **3**(6): p. 757-69.
36. Lee, E.Y. and W.J. Muller, *Oncogenes and tumor suppressor genes*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(10): p. a003236.
37. Russo, A., et al., *The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7518-28.
38. Mogi, A. and H. Kuwano, *TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 583929.
39. Olivier, M. and P. Taniere, *Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes*. Curr Opin Oncol, 2011. **23**(1): p. 88-92.
40. Friedenson, B., *BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian*. MedGenMed, 2005. **7**(2): p. 60.
41. Miyaki, M. and T. Kuroki, *Role of Smad4 (DPC4) inactivation in human cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(4): p. 799-804.
42. Lionetto, R., et al., *No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(6): p. 882-7.
43. Cullinan, S., et al., *A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma*. Cancer, 1990. **65**: p. 2207-2212.
44. Neoptolemos, J.P., et al., *Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials*. Br J Cancer, 2009. **100**(2): p. 246-50.

45. Lokich, J., et al., *Chemotherapy in pancreatic carcinoma: 5 fluorouracil (5FU) and 1,3 bis-(2 chloretjyl)-1-nitrosourea (BCNU)*. Ann Surg, 1974. **179**(4): p. 450-3.
46. Heidelberger, C., et al., *Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds*. Nature, 1957. **179**(4561): p. 663-6.
47. Rutman, R.J., A. Cantarow, and K.E. Paschkis, *Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma*. Cancer Res, 1954. **14**(2): p. 119-23.
48. Parker, W.B. and Y.C. Cheng, *Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil*. Pharmacol Ther, 1990. **48**(3): p. 381-95.
49. Peters, G.J., et al., *Thymidylate synthase and drug resistance*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(7-8): p. 1299-305.
50. Wilkinson, D.S. and H.C. Pitot, *Inhibition of ribosomal ribonucleic acid maturation in Novikoff hepatoma cells by 5-fluorouracil and 5-fluorouridine*. J Biol Chem, 1973. **248**(1): p. 63-8.
51. Berlin, J. and A.B. Benson, 3rd, *Chemotherapy: Gemcitabine remains the standard of care for pancreatic cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(3): p. 135-7.
52. Pasetto, L.M., et al., *Old and new drugs in systemic therapy of pancreatic cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. **49**(2): p. 135-51.
53. Burris, H.A., 3rd, 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): p. 2403-13.
54. Hertel, L.W., et al., *Synthesis of 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribose and 2-deoxy-2,2-difluoro-D-ribofuranosyl nucleotides*. J. Org. Chem., 1988. **53**(11): p. 2406-2409.
55. Mackey, J.R., et al., *Gemcitabine transport in xenopus oocytes expressing recombinant plasma membrane mammalian nucleoside transporters*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(21): p. 1876-81.
56. Damaraju, V.L., et al., *Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7524-36.
57. Heinemann, V., et al., *Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine*. Cancer Res, 1988. **48**(14): p. 4024-31.
58. Gandhi, V. and W. Plunkett, *Modulatory activity of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides*. Cancer Res, 1990. **50**(12): p. 3675-80.

59. Heinemann, V., et al., *Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine*. Mol Pharmacol, 1990. **38**(4): p. 567-72.
60. Plunkett, W., et al., *Gemcitabine: preclinical pharmacology and mechanisms of action*. Semin Oncol, 1996. **23**(5 Suppl 10): p. 3-15.
61. Huang, P., et al., *Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis*. Cancer Res, 1991. **51**(22): p. 6110-7.
62. Huang, P. and W. Plunkett, *Fludarabine- and gemcitabine-induced apoptosis: incorporation of analogs into DNA is a critical event*. Cancer Chemother Pharmacol, 1995. **36**(3): p. 181-8.
63. Lehmann, J., et al., *[Gemcitabine in advanced bladder cancer]*. Urologe A, 2003. **42**(1): p. 63-77.
64. Reyes, P. and T.C. Hall, *Synthesis of 5-fluorouridine 5'-phosphate by a pyrimidine phosphoribosyltransferase of mammalian origin. II. Correlation between the tumor levels of the enzyme and the 5-fluorouracil-promoted increase in survival of tumor-bearing mice*. Biochem Pharmacol, 1969. **18**(10): p. 2587-90.
65. Kessel, D., T.C. Hall, and I. Wodinsky, *Nucleotide formation as a determinant of 5-fluorouracil response in mouse leukemias*. Science, 1966. **154**(751): p. 911-3.
66. Sobrero, A.F., et al., *Defective facilitated diffusion of nucleosides, a primary mechanism of resistance to 5-fluoro-2'-deoxyuridine in the HCT-8 human carcinoma line*. Cancer Res, 1985. **45**(7): p. 3155-60.
67. Pinedo, H.M. and G.F. Peters, *Fluorouracil: biochemistry and pharmacology*. J Clin Oncol, 1988. **6**(10): p. 1653-64.
68. Peters, G.J., et al., *Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1587**(2-3): p. 194-205.
69. Nakano, Y., et al., *Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells*. Br J Cancer, 2007. **96**(3): p. 457-63.
70. Mackey, J.R., et al., *Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines*. Cancer Res, 1998. **58**(19): p. 4349-57.
71. Spratlin, J., et al., *The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine-treated pancreas adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6956-61.
72. Giovannetti, E., et al., *Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine*. Cancer Res, 2006. **66**(7): p. 3928-35.

73. Kroep, J.R., et al., *Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(6): p. 371-6.
74. Bergman, A.M., et al., *In vivo induction of resistance to gemcitabine results in increased expression of ribonucleotide reductase subunit M1 as the major determinant*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9510-6.
75. Schöler, H.R., *Das Potenzial von Stammzellen Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 2004. **47**: p. 565-577.
76. Lobo, N.A., et al., *The biology of cancer stem cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 675-99.
77. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.
78. Bruce, W.R. and H. Van Der Gaag, *A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO*. Nature, 1963. **199**: p. 79-80.
79. Pierce, G.B. and C. Wallace, *Differentiation of malignant to benign cells*. Cancer Res, 1971. **31**(2): p. 127-34.
80. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human tumor stem cells*. Science, 1977. **197**(4302): p. 461-3.
81. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
82. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
83. Ischenko, I., et al., *Metastatic activity and chemotherapy resistance in human pancreatic cancer--influence of cancer stem cells*. Surgery, 2009. **146**(3): p. 430-4.
84. Pardal, R., M.F. Clarke, and S.J. Morrison, *Applying the principles of stem-cell biology to cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(12): p. 895-902.
85. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
86. Ito, K., R. Bernardi, and P.P. Pandolfi, *A novel signaling network as a critical rheostat for the biology and maintenance of the normal stem cell and the cancer-initiating cell*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(1): p. 51-9.
87. Bomken, S., et al., *Understanding the cancer stem cell*. Br J Cancer, 2010. **103**(4): p. 439-45.
88. Krivtsov, A.V., et al., *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 818-22.

89. Cozzio, A., et al., *Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3029-35.
90. Hermann, P.C., et al., *Cancer stem cells in solid tumors*. Semin Cancer Biol, 2010.
91. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
92. Wright, M.H., et al., *Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(1): p. R10.
93. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 555-67.
94. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
95. Wu, A., et al., *Persistence of CD133+ cells in human and mouse glioma cell lines: detailed characterization of GL261 glioma cells with cancer stem cell-like properties*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(1): p. 173-84.
96. Son, M.J., et al., *SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(5): p. 440-52.
97. Harris, M.A., et al., *Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma*. Cancer Res, 2008. **68**(24): p. 10051-9.
98. Dalerba, P., et al., *Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(24): p. 10158-63.
99. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
100. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
101. Yang, Z.F., et al., *Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(2): p. 153-66.
102. Ma, S., et al., *Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2542-56.
103. Chiba, T., et al., *Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 240-51.
104. Eramo, A., et al., *Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 504-14.

105. Bertolini, G., et al., *Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(38): p. 16281-6.
106. Kim, C.F., et al., *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer*. Cell, 2005. **121**(6): p. 823-35.
107. Ho, M.M., et al., *Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4827-33.
108. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
109. Miki, J., et al., *Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens*. Cancer Res, 2007. **67**(7): p. 3153-61.
110. Li, C., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 1030-7.
111. Hermann, P.C., et al., *Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 313-23.
112. Rasheed, Z.A., et al., *Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(5): p. 340-51.
113. Kabashima, A., et al., *Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion*. Int J Cancer, 2009. **124**(12): p. 2771-9.
114. Higgins, C.F., *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 67-113.
115. Staud, F. and P. Pavek, *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 720-5.
116. Doyle, L.A. and D.D. Ross, *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7340-58.
117. Haraguchi, N., et al., *Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 506-13.
118. Hirschmann-Jax, C., et al., *A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(39): p. 14228-33.
119. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1028-34.

120. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2002. **99**(2): p. 507-12.
121. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
122. Dou, J., et al., *Identifying tumor stem-like cells in mouse melanoma cell lines by analyzing the characteristics of side population cells*. *Cell Biol Int*, 2009.
123. Salcido, C.D., et al., *Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 2010. **102**(11): p. 1636-44.
124. Zhou, J., et al., *Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(6): p. 925-30.
125. Zhang, S.N., et al., *Characterization of a cancer stem cell-like side population derived from human pancreatic adenocarcinoma cells*. *Tumori*, 2010. **96**(6): p. 985-92.
126. Challen, G.A. and M.H. Little, *A side order of stem cells: the SP phenotype*. *Stem Cells*, 2006. **24**(1): p. 3-12.
127. Tan, M.H., et al., *Characterization of a new primary human pancreatic tumor line*. *Cancer Invest*, 1986. **4**(1): p. 15-23.
128. Dahiya, R., et al., *Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC-1 mucin gene*. *Cancer Res*, 1993. **53**(6): p. 1437-43.
129. Yunis, A.A., G.K. Arimura, and D.J. Russin, *Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase*. *Int J Cancer*, 1977. **19**(1): p. 128-35.
130. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. *Int J Cancer*, 1975. **15**(5): p. 741-7.
131. Jaffee, E.M., et al., *Development and characterization of a cytokine-secreting pancreatic adenocarcinoma vaccine from primary tumors for use in clinical trials*. *Cancer J Sci Am*, 1998. **4**(3): p. 194-203.
132. Norman, J., et al., *Functional glucocorticoid receptor modulates pancreatic carcinoma growth through an autocrine loop*. *J Surg Res*, 1994. **57**(1): p. 33-8.
133. Peiper, M., et al., *Human pancreatic cancer cells (MPanc-96) recognized by autologous tumor-infiltrating lymphocytes after in vitro as well as in vivo tumor expansion*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(6): p. 993-9.

134. Sato, N., et al., *Establishment of a new human pancreatic cancer cell line, NOR-P1, with high angiogenic activity and metastatic potential*. *Cancer Lett*, 2000. **155**(2): p. 153-61.
135. Kyriazis, A.P., et al., *Establishment and characterization of human pancreatic adenocarcinoma cell line SW-1990 in tissue culture and the nude mouse*. *Cancer Res*, 1983. **43**(9): p. 4393-401.
136. Drucker, B.J., et al., *A new human pancreatic carcinoma cell line developed for adoptive immunotherapy studies with lymphokine-activated killer cells in nude mice*. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988. **24**(12): p. 1179-87.
137. Schoumacher, R.A., et al., *A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(10): p. 4012-6.
138. Metzgar, R.S., et al., *Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies*. *Cancer Res*, 1982. **42**(2): p. 601-8.
139. Owens, R.B., et al., *Epithelial cell cultures from normal and cancerous human tissues*. *J Natl Cancer Inst*, 1976. **56**(4): p. 843-9.
140. Morgan, R.T., et al., *Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma*. *Int J Cancer*, 1980. **25**(5): p. 591-8.
141. Vezeridis, M.P., et al., *In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse*. *Cancer*, 1992. **69**(8): p. 2060-3.
142. Bruns, C.J., et al., *In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice*. *Neoplasia*, 1999. **1**(1): p. 50-62.
143. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **58**(2): p. 209-14.
144. Chen, W.H., et al., *Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites*. *In Vitro*, 1982. **18**(1): p. 24-34.
145. Grant, A.G., D. Duke, and J. Hermon-Taylor, *Establishment and characterization of primary human pancreatic carcinoma in continuous cell culture and in nude mice*. *Br J Cancer*, 1979. **39**(2): p. 143-51.
146. Vila, M.R., et al., *New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation*. *Lab Invest*, 1995. **72**(4): p. 395-404.
147. Frazier, M.L., et al., *Establishment of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line, MDAPanc-3*. *Pancreas*, 1990. **5**(1): p. 8-16.
148. Yamada, H., et al., *Establishment of a human pancreatic adenocarcinoma cell line (PSN-1) with amplifications of both c-myc and activated c-Ki-ras by a point mutation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **140**(1): p. 167-73.

149. Okabe, T., N. Yamaguchi, and N. Ohsawa, *Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. *Cancer*, 1983. **51**(4): p. 662-8.
150. Gysin, S., et al., *Analysis of genomic DNA alterations and mRNA expression patterns in a panel of human pancreatic cancer cell lines*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005. **44**(1): p. 37-51.
151. Moore, P.S., et al., *Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4*. *Virchows Arch*, 2001. **439**(6): p. 798-802.
152. Campbell, P.M., et al., *TLN-4601 suppresses growth and induces apoptosis of pancreatic carcinoma cells through inhibition of Ras-ERK MAPK signaling*. *J Mol Signal*, 2010. **5**: p. 18.
153. Rejiba, S., et al., *K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(7): p. 1128-36.
154. Immervoll, H., et al., *Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes*. *Virchows Arch*, 2006. **448**(6): p. 788-96.
155. Buchler, P., et al., *Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody (herceptin)*. *J Gastrointest Surg*, 2001. **5**(2): p. 139-46.
156. Tzeng, C.W., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) is highly conserved in pancreatic cancer*. *Surgery*, 2007. **141**(4): p. 464-9.
157. Yokoi, K., et al., *Simultaneous inhibition of EGFR, VEGFR, and platelet-derived growth factor receptor signaling combined with gemcitabine produces therapy of human pancreatic carcinoma and prolongs survival in an orthotopic nude mouse model*. *Cancer Res*, 2005. **65**(22): p. 10371-80.
158. Yang, H., et al., *RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): p. 5518-27.
159. Hotz, H.G., et al., *VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer*. *Surgery*, 2005. **137**(2): p. 192-9.
160. Jimenez, R.E., et al., *Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: an additive strategy for cancer control*. *Ann Surg*, 2000. **231**(5): p. 644-54.
161. Ischenko, I., *Effect of Src Kinase inhibition on metastasis and tumor angiogenesis in human pancreatic cancer*. 2007.
162. Krebs, S., M. Fischaleck, and H. Blum, *A simple and loss-free method to remove TRIzol contaminations from minute RNA samples*. *Anal Biochem*, 2009. **387**(1): p. 136-8.

163. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
164. Irizarry, R.A., et al., *Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(4): p. e15.
165. Smyth, G.K., *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments*. Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. **3**: p. Article3.
166. Yilmaz, O.H., et al., *Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 475-82.
167. Jimeno, A., et al., *A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(2): p. 310-4.
168. Kopnin, P.B., et al., *Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability*. Cancer Res, 2007. **67**(10): p. 4671-8.
169. Liu, W., et al., *Down-regulated expression of complement factor I: a potential suppressive protein for gastric cancer identified by serum proteome analysis*. Clin Chim Acta, 2007. **377**(1-2): p. 119-26.
170. Clausen, K.A., et al., *SOSTDC1 differentially modulates Smad and beta-catenin activation and is down-regulated in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2010.
171. Ju, W., et al., *Identification of genes with differential expression in chemoresistant epithelial ovarian cancer using high-density oligonucleotide microarrays*. Oncol Res, 2009. **18**(2-3): p. 47-56.
172. Shiiba, M., et al., *Down-regulated expression of SERPIN genes located on chromosome 18q21 in oral squamous cell carcinomas*. Oncol Rep, 2010. **24**(1): p. 241-9.
173. Riker, A.I., et al., *The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis*. BMC Med Genomics, 2008. **1**: p. 13.
174. Yoshitake, H., et al., *Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(6): p. 1300-6.
175. Fukumoto, S., et al., *Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(5): p. 1776-85.
176. Yan, R., et al., *Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: Implication for cancer intervention*. Int J Cancer, 2007. **121**(10): p. 2301-6.

177. Penning, T.M., *AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(5): p. 1687-90.
178. Grenier, E., et al., *Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(6): p. G1178-89.
179. Su, Z.Y., et al., *All-trans retinoic acid promotes smooth muscle cell differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. J Zhejiang Univ Sci B, 2010. **11**(7): p. 489-96.
180. Watanabe, M., et al., *Tumor cell growth inhibition and cell differentiation analysis in a canine mammary tumor cell line (MCM-B2) treated with four chemical reagents*. J Vet Med Sci, 2009. **71**(11): p. 1413-7.
181. Hadnagy, A., et al., *SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations*. Exp Cell Res, 2006. **312**(19): p. 3701-10.
182. Wulf, G.G., et al., *A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1166-73.
183. Sasajima, Y., et al., *A novel EID family member, EID-3, inhibits differentiation and forms a homodimer or heterodimer with EID-2*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(3): p. 969-75.
184. Cadenas, C., et al., *Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(3): p. R44.
185. Yoo, M.H., et al., *Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13005-8.
186. Fujino, G., et al., *Thioredoxin and protein kinases in redox signaling*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(6): p. 427-35.
187. Zhao, J.J., et al., *MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 31079-86.
188. Miller, T.E., et al., *MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29897-903.
189. Park, J.K., et al., *Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma*. Pancreas, 2009. **38**(7): p. e190-9.
190. Nakamura, T., et al., *Quantitative analysis of macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) gene expression in human prostatic tissues*. Br J Cancer, 2003. **88**(7): p. 1101-4.

191. Brown, D.A., et al., *MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2642-50.
192. Brown, D.A., et al., *Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine 1 combined with prostate-specific antigen improves prostate cancer diagnosis*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(1): p. 89-96.
193. Liu, T., et al., *Macrophage inhibitory cytokine 1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 5034-40.
194. Koopmann, J., et al., *Serum macrophage inhibitory cytokine 1 as a marker of pancreatic and other periampullary cancers*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2386-92.
195. Koopmann, J., et al., *Serum markers in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma: macrophage inhibitory cytokine 1 versus CA19-9*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 442-6.
196. Staff, A.C., et al., *Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **118**(3): p. 237-43.
197. Abd-Elaziz, M., et al., *Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian carcinoma: an independent prognostic factor of clinical outcome*. Cancer Sci, 2003. **94**(11): p. 980-5.
198. Khalfallah, O., et al., *Dax-1 knockdown in mouse embryonic stem cells induces loss of pluripotency and multilineage differentiation*. Stem Cells, 2009. **27**(7): p. 1529-37.
199. Kinsey, M., R. Smith, and S.L. Lessnick, *NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's sarcoma*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(11): p. 851-9.
200. Mendiola, M., et al., *The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors*. Int J Cancer, 2006. **118**(6): p. 1381-9.
201. Oda, T., et al., *Tumorigenic role of orphan nuclear receptor NR0B1 in lung adenocarcinoma*. Am J Pathol, 2009. **175**(3): p. 1235-45.
202. Seo, D.C., et al., *Gene expression profiling of cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells*. Mol Cancer, 2007. **6**: p. 75.
203. Selcuklu, S.D., M.T. Donoghue, and C. Spillane, *miR-21 as a key regulator of oncogenic processes*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 4): p. 918-25.
204. Zhu, S., et al., *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis*. Cell Res, 2008. **18**(3): p. 350-9.
205. Kuk, C., et al., *Nidogen-2: a new serum biomarker for ovarian cancer*. Clin Biochem, 2009. **43**(4-5): p. 355-61.

206. Alifano, M., et al., *Neurotensin expression and outcome of malignant pleural mesothelioma*. *Biochimie*, 2009. **92**(2): p. 164-70.
207. Evers, B.M., *Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues*. *Peptides*, 2006. **27**(10): p. 2424-33.
208. Ehlers, R.A., et al., *Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(3): p. 704-8.
209. Carraway, R.E. and A.M. Plona, *Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools*. *Peptides*, 2006. **27**(10): p. 2445-60.
210. Ishizuka, J., C.M. Townsend, Jr., and J.C. Thompson, *Neurotensin regulates growth of human pancreatic cancer*. *Ann Surg*, 1993. **217**(5): p. 439-45; discussion 446.
211. Dallol, A., et al., *RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics*. *Cancer Res*, 2004. **64**(12): p. 4112-6.
212. Iozzo, R.V., I. Eichstetter, and K.G. Danielson, *Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy*. *Cancer Res*, 1995. **55**(16): p. 3495-9.
213. Da Forno, P.D., et al., *WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(18): p. 5825-32.
214. Huang, C.L., et al., *Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(34): p. 8765-73.
215. Kurayoshi, M., et al., *Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion*. *Cancer Res*, 2006. **66**(21): p. 10439-48.
216. Ripka, S., et al., *WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(6): p. 1178-87.
217. Arumugam, T., et al., *S100P promotes pancreatic cancer growth, survival, and invasion*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(15): p. 5356-64.
218. Arumugam, T. and C.D. Logsdon, *S100P: a novel therapeutic target for cancer*. *Amino Acids*, 2010.
219. Crnogorac-Jurcevic, T., et al., *Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent*. *J Pathol*, 2003. **201**(1): p. 63-74.

220. Deng, H., et al., *Usefulness of S100P in diagnosis of adenocarcinoma of pancreas on fine-needle aspiration biopsy specimens*. Am J Clin Pathol, 2008. **129**(1): p. 81-8.
221. Gibadulinova, A., et al., *Transcriptional regulation and functional implication of S100P in cancer*. Amino Acids, 2010.
222. Ohuchida, K., et al., *S100P is an early developmental marker of pancreatic carcinogenesis*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(18): p. 5411-6.
223. Olakowski, M., et al., *NBL1 and anillin (ANLN) genes over-expression in pancreatic carcinoma*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(2): p. 249-55.
224. Desmond, J.C., et al., *The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cancer Res, 2003. **63**(2): p. 505-12.
225. Dozmorov, M.G., et al., *Elevated AKR1C3 expression promotes prostate cancer cell survival and prostate cell-mediated endothelial cell tube formation: Implications for prostate cancer progression*. BMC Cancer, 2010. **10**(1): p. 672.
226. Novotna, R., et al., *Inactivation of the anticancer drugs doxorubicin and oracin by aldo-keto reductase (AKR) 1C3*. Toxicol Lett, 2008. **181**(1): p. 1-6.
227. Fung, K.M., et al., *Increased expression of type 2 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) and its relationship with androgen receptor in prostate carcinoma*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(1): p. 169-80.
228. Saxena, A.K., et al., *New guanine deaminase inhibitors*. Pharmacol Res Commun, 1984. **16**(3): p. 243-52.
229. Kazanskaya, O., et al., *The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development*. Development, 2008. **135**(22): p. 3655-64.
230. Theodorou, V., et al., *MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer*. Nat Genet, 2007. **39**(6): p. 759-69.
231. Kim, K.A., et al., *R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2588-96.
232. Barski, O.A., S.M. Tipparaju, and A. Bhatnagar, *The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification*. Drug Metab Rev, 2008. **40**(4): p. 553-624.
233. Sandur, S.K., et al., *Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism*. Carcinogenesis, 2007. **28**(8): p. 1765-73.

234. Anand, P., et al., *Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature*. *Biochem Pharmacol*, 2008. **76**(11): p. 1590-611.
235. Dhillon, N., et al., *Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(14): p. 4491-9.
236. Muthenna, P., et al., *Inhibition of aldose reductase by dietary antioxidant curcumin: Mechanism of inhibition, specificity and significance*. *FEBS Lett*, 2009.
237. Matsunaga, T., et al., *Potent and selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by bisdemethoxycurcumin: probing the active site of the enzyme with molecular modeling and site-directed mutagenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **389**(1): p. 128-32.
238. Chearwae, W., et al., *Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter ABCG2 by the cancer chemopreventive agent curcumin*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(8): p. 1995-2006.
239. Chazotte, B., *Labeling nuclear DNA with hoechst 33342*. *Cold Spring Harb Protoc*. **2011**(1): p. pdb prot5557.
240. Christgen, M., et al., *Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line*. *Mol Cell Biochem*, 2007. **306**(1-2): p. 201-12.
241. Cao, D., S.T. Fan, and S.S. Chung, *Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(19): p. 11429-35.
242. Balendiran, G.K., et al., *Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism*. *Chem Biol Interact*, 2009. **178**(1-3): p. 134-7.
243. Martin, H.J., et al., *Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(3): p. 464-70.
244. Ma, J., et al., *Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(6): p. 3418-23.
245. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
246. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 855-62.
247. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.

248. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
249. Dillhoff, M., et al., *MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival*. J Gastrointest Surg, 2008. **12**(12): p. 2171-6.
250. Lee, E.J., et al., *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(5): p. 1046-54.
251. Bloomston, M., et al., *MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis*. JAMA, 2007. **297**(17): p. 1901-8.
252. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-33.
253. Ciafre, S.A., et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **334**(4): p. 1351-8.
254. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
255. He, H., et al., *The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19075-80.
256. Krichevsky, A.M. and G. Gabriely, *miR-21: a small multi-faceted RNA*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(1): p. 39-53.
257. du Rieu, M.C., et al., *MicroRNA-21 Is Induced Early in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Precursor Lesions*. Clin Chem, 2010.
258. Logsdon, C.D., et al., *Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2649-57.
259. Reinisch, K.M. and S.L. Wolin, *Emerging themes in non-coding RNA quality control*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(2): p. 209-14.
260. Christov, C.P., E. Trivier, and T. Krude, *Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation*. Br J Cancer, 2008. **98**(5): p. 981-8.
261. Christov, C.P., et al., *Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(18): p. 6993-7004.
262. Dieci, G., M. Preti, and B. Montanini, *Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility*. Genomics, 2009. **94**(2): p. 83-8.
263. Shmelkov, S.V., et al., *AC133/CD133/Prominin-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(4): p. 715-9.
264. Nielsen, P.J., et al., *Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice*. Blood, 1997. **89**(3): p. 1058-67.

265. Chappel, M.S., et al., *Cross-linking the murine heat-stable antigen induces apoptosis in B cell precursors and suppresses the anti-CD40-induced proliferation of mature resting B lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1639-49.
266. Liu, Y. and P. Zheng, *CD24: a genetic checkpoint in T cell homeostasis and autoimmune diseases*. Trends Immunol, 2007. **28**(7): p. 315-20.
267. Aigner, S., et al., *Heat stable antigen (mouse CD24) supports myeloid cell binding to endothelial and platelet P-selectin*. Int Immunol, 1995. **7**(10): p. 1557-65.
268. McEver, R.P., *GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium*. J Cell Biochem, 1991. **45**(2): p. 156-61.
269. Lim, S.C., *CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects*. Biomed Pharmacother, 2005. **59 Suppl 2**: p. S351-4.
270. Alt, R., et al., *ABCG2 expression is correlated neither to side population nor to hematopoietic progenitor function in human umbilical cord blood*. Exp Hematol, 2009. **37**(2): p. 294-301.
271. Behbod, F., et al., *Transcriptional profiling of mammary gland side population cells*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 1065-74.
272. Shmelkov, S.V., et al., *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2111-20.
273. Dittfeld, C., et al., *CD133 expression is not selective for tumor-initiating or radioresistant cell populations in the CRC cell line HCT-116*. Radiother Oncol, 2010. **94**(3): p. 375-83.
274. Chen, R., et al., *A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma*. Cancer Cell, 2010. **17**(4): p. 362-75.
275. Meng, X., et al., *Both CD133+ and CD133- subpopulations of A549 and H446 cells contain cancer-initiating cells*. Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1040-6.
276. Santisteban, M., *ABC Transporters as Molecular Effectors of Pancreatic Oncogenic Pathways: The Hedgehog-GLI Model*. J Gastrointest Cancer, 2010.
277. Dean, M., *ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2009. **14**(1): p. 3-9.
278. Rudin, D., *Gemcitabine Cytotoxicity: Interaction of Efflux and Deamination*. Drug Metabolism and Toxicology, 2011. **2**(1).
279. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Mol Pharm, 2007. **4**(6): p. 807-18.

280. Gupta, N.K. and V.K. Dixit, *Bioavailability enhancement of curcumin by complexation with phosphatidyl choline*. J Pharm Sci, 2010. **100**(5): p. 1987-95.
281. Sasaki, H., et al., *Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability*. Biol Pharm Bull, 2011. **34**(5): p. 660-5.
282. Zhang, F., et al., *A novel solubility-enhanced curcumin formulation showing stability and maintenance of anticancer activity*. J Pharm Sci, 2011. **100**(7): p. 2778-89.
283. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors*. Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
284. Murtaugh, L.C. and D. Kopinke, *Pancreatic stem cells*. 2008.
285. Zhou, Q., et al., *A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 103-14.
286. Dor, Y., et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 41-6.
287. Desai, B.M., et al., *Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 971-7.
288. Yanger, K. and B.Z. Stanger, *Facultative stem cells in liver and pancreas: Fact and fancy*. Dev Dyn, 2011. **240**(3): p. 521-9.
289. Xu, X., et al., *Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas*. Cell, 2008. **132**(2): p. 197-207.
290. Thorel, F., et al., *Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss*. Nature, 2010. **464**(7292): p. 1149-54.
291. Jensen, J.N., et al., *Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration*. Gastroenterology, 2005. **128**(3): p. 728-41.
292. Rovira, M., et al., *Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 75-80.
293. Fetsch, P.A., et al., *Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues*. Cancer Lett, 2006. **235**(1): p. 84-92.
294. Poliakova, L., et al., *Presence of nonhematopoietic side population cells in the adult human and nonhuman primate pancreas*. Transplant Proc, 2004. **36**(4): p. 1166-8.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
5-FdUMP	5-Fluorodesoxyuridin-Monophosphat
5-FdUTP	5-Fluorodesoxyuridin-Triphosphat
5-FU	5-Fluoruracil
5-FU _{res}	5-FU-resistent
5-FUTP	5-Fluorouridin-Triphosphat
A	Amper
ABC	ATP-binding cassette
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member2
ADH	Alcohol Dehydrogenase
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
ca	Circa
Cyclo	Cyclopamin
dCK	Deoxycytidinkinase
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dFdC	2',2'-Difluorodesoxycytidin
dFdCDP	Gemcitabindiphosphat
dFdCMP	Gemcitabinmonophosphat
dFdCTP	Gemcitabintriphosphat

DMC	Demethoxycurcumin
DMEM	<i>Dulbecco`s modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Dinukleotidtriphosphate
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
g	Schwerebeschleunigung (9,81 m/s ²)
G _{res}	Gemcitabinresistent
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
hCNT-1	<i>Human concentrative nucleoside transporter-1</i>
hENT-1	<i>Human equilibrative nucleoside transporter-1</i>
Hoechst	BisBenzimide H 33342 Trihydrochlorid
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSA	<i>Heat-stable-antigen</i>
HTCR	<i>Human tissue and cell research</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
l	Liter
LOH	<i>Loss of heterogeneity</i>
Lsg	Lösung
M	Mol
MDR1	<i>Multidrug resistance gene 1</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRP1	<i>Multidrug resistance associated protein1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid

NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ncRNA	<i>Non coding RNA</i>
NEAA	<i>Non essential amino acids</i>
NG	Normalgewebe
NSP	Non-Side-Population
P	Passage
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PanIN	<i>Pancreatic intraepithelial lesions</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PROM 1	Prominin 1
PS	Penicillin Streptomycin
Pten	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RALDH	Retinaldehyd Dehydrogenase
Rapa	Rapamycin
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RR	Ribonukleotidreduktase
rRNA	Ribosomal RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
scRNA	<i>Small cytoplasmic RNA</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>
SP	Side-Population
T-ALL	<i>T cell acute lymphoblastic leukemia</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TG	Tumorgewebe
TMP	Thyminmonophosphat
Tris	Tris (hydroxymethyl) -aminomethan
TS	Thyridylat-Synthase
TTP	Thymintriphosphat
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	Versus
W	Watt
Wnt	<i>Wingless-Int</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das pankreatische interepitheliale Läsions-Modell (nach Hruban et al. ^[22]).....	5
Abbildung 2: Metabolismus von 5-Fluorouracil (nach Parker und Cheng ^[48] , modifiziert).....	7
Abbildung 3: Intrazellulärer Wirkungsmechanismus von Gemcitabin (nach Lehmann et al. ^[63])	8
Abbildung 4: Zur Resistenz beitragende Aberrationen im 5-FU Metabolismus (nach Pinedo und Peters) ^[67]	9
Abbildung 5: Heterogenitätsmodell bei soliden Tumoren (nach Reya et al. ^[82]).....	11
Abbildung 6: Therapiekonzept basierend auf dem hierarchischen Modell (nach Ischenko et al. ^[83]).....	12
Abbildung 7: Ursprungsmodell einer Krebsstammzelle (nach Pardal et al. ^[84]).....	13
Abbildung 8: Gemeinsame Signalwege von Stammzellen und Krebsstammzellen (nach Lobo et al. ^[76]).....	14
Abbildung 9: Krebsmedikamente, welche mittels des ABCG2 Transporters aus der Zelle ausgeschleust werden (nach Doyle et al. ^[116]).....	17
Abbildung 10: <i>In vivo</i> Selektion von hoch metastatischen, humanen Pankreaskarzinomzelllinien (nach Bruns et al. ^[142]).....	29
Abbildung 11: Orthotope Tumorzellinjektion (entnommen aus der Dissertation von I. Ischenko ^[161]).....	44
Abbildung 12: Side-Population-Gehalt in den Zelllinien L3.6pl und AsPC-1.....	48
Abbildung 13: Reanalyse von SP- und NSP-Fractionen der Zelllinien L3.6pl und.....	50
Abbildung 14: Tumolvolumen von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von SP-, NSP- und unsortierten Zellen der Zelllinie L3.6pl.....	51
Abbildung 15: Darstellung der von der Zelllinie L3.6pl abstammenden Tumore nach Opferung der Tiere.....	52
Abbildung 16: Mausegewicht und Tumorgewicht von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von NSP-, SP- und unsortierten Zellen der Zelllinie L3.6pl.....	53
Abbildung 17: Immunhistologische Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten der Tumore und Leber des Tierversuchs mit Zellen der Linie L3.6pl.....	54
Abbildung 18: Immunhistologische Ki 67 Färbung von Paraffinschnitten der Tumore des Tierversuchs mit Zellen der Linie L3.6pl.....	55
Abbildung 19: Tumolvolumen von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von NSP-, SP- und unsortierten Zellen der Zelllinie AsPC-1.....	56
Abbildung 20: Darstellung der von der Zelllinie AsPC-1 abstammenden Tumore nach Opferung der Tiere.....	56

Abbildung 21: Mausgewicht und Tumorgewicht von Tumoren im orthotopen Pankreastumormodell nach Injektion von NSP-, SP- und unsortierten Zellen der Zelllinie AsPC-1	57
Abbildung 22: Immunhistologische Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffinschnitten der Tumore des Tierversuchs mit Zellen der Linie AsPC-1	58
Abbildung 23: Behandlung der Zelllinie L3.6pl mittels Stammzellpathway-Inhibitoren zur Reduktion der Side-Population	59
Abbildung 24: Volcanoblot der Affymetrix Microarray Analyse.....	64
Abbildung 25: Westernblot zum Nachweis der AKR1B10 Expression in den Zelllinien AsPC-1 und L3.6pl	64
Abbildung 26: Westernblot zum Nachweis der CD133-, AKR1B10- und ABCG2-Expression von der L3.6pl SP- und NSP-Fraktion und Hoechstkontrolle	65
Abbildung 27: Darstellung der sensitiven, Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl	66
Abbildung 28: Wachstumsverhalten der sensitiven, Gemcitabin- und 5-FU-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl.....	67
Abbildung 29: Westernblot zum Nachweis der Resistenzmechanismen in den Chemotherapie-resistenten Varianten L3.6pl _{G res} und L3.6pl _{5-FU res}	68
Abbildung 30: IC ₅₀ der Chemotherapie-resistenten Zelllinien in Korrelation zum Anteil an ABCG2 positiven Zellen	69
Abbildung 31: Side-Population-Gehalt in den Chemotherapie-resistenten Varianten der Zelllinie L3.6pl	70
Abbildung 32: Gehalt der potentiellen Krebsstammzellmarker CD133 und CD24 in der sensitiven Zelllinie L3.6pl und ihren Chemotherapie-resistenten Varianten ...	71
Abbildung 33: Protein-Expressionsanalyse von CD133, AKR1B10 und ABCG2 in der sensitiven Zelllinie L3.6pl und ihren Chemotherapie-resistenten Varianten ...	72
Abbildung 34: AKR1B10 Protein-Expression in Side- und Non-Side-Population Zellen der sensitiven und Gemcitabin-resistenten Variante der Zelllinie L3.6pl.....	72
Abbildung 35: Westernblot zum Nachweis der AKR1B10-Expression in Patientengewebe ..	73
Abbildung 36: Side-Population-Gehalt in der Zelllinie L3.6plG res nach Behandlung mit Curcumin.....	75
Abbildung 37: Anteil an ABCG2- und CD24 positiven Zellen nach Behandlung der Zelllinie L3.6plG res mit Curcumin	76
Abbildung 38: Westernblot zum Nachweis des Einflusses von Curcumin auf die Expression der Aldoketoreduktase 1B10.....	77
Abbildung 39: Kladogramm humaner AKRs (nach Barski et al. ^[232]).....	83

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Solide Krebsstammzellmarker verschiedener Tumore (nach Hermann et al. ^[90] , modifiziert).....	16
Tabelle 6.1: Inzidenzrate von Leber- und Lymphknotenmetastasen der Tiere nach orthotoper Injektion von L3.6pl Zellen	53
Tabelle 6.2: Inzidenzrate von Leber- und Lymphknotenmetastasen der Tiere nach orthotoper Injektion von AsPC-1 Zellen.....	58
Tabelle 6.3: In der SP-Fraktion herunterregulierte Gene	61
Tabelle 6.4: In der SP-Fraktion überexprimierte Gene.....	62

9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich während der Dissertation auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Schnieke, für die Übernahme der externen Betreuung der Arbeit bedanken.

Mein Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Adamski und Herrn Prof. Dr. Bauer für ihre Bereitschaft zur Beurteilung meiner Promotionsarbeit und Durchführung der Promotionsprüfung.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Jauch von der Chirurgie der LMU Grosshadern, für die Möglichkeit die Dissertation in seiner Abteilung, der chirurgischen Forschung, anfertigen zu können.

Frau Prof. Dr. Bruns, von der chirurgischen Forschung Grosshadern, möchte ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, sowie die Themenstellung und Betreuung während der experimentellen Arbeit und der schriftlichen Anfertigung der Thesis danken. Sie gewährte mir die Freiräume meine Arbeit eigenständig zu gestalten, zu planen und auf Kongressen zu präsentieren, was meine Motivation und Interesse an der Wissenschaft noch mehr förderte. Sie stand mir mit ihrem fundierten Wissen und konstruktiver Kritik zur Seite und trug so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Ischenko für die Fortbildung „orthotope Pankreasinjektion bei Mäusen“ und seinem Einsatz bei den Tierversuchen danken.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Ellwart vom Helmholtz Zentrum für seine unermüdliche Hilfe beim Zellensortieren und an Herrn Dr. Mysliwietz für seine Hilfe am LSR. Währenddessen ergaben sich interessante wissenschaftliche sowie unterhaltsame Gespräche und Diskussionen.

Vielen Dank an Herrn Dr. Blum, Herrn Dr. Krebs und Frau Fischalek vom Genzentrum. Ohne sie wäre die komplikationsfreie Durchführung und Analyse des Affymetrix Microarrays nicht möglich gewesen.

Der HTCR möchte ich für die Bereitstellung der Patienten-Proteinlösungen danken.

Ein herzlicher Dank geht an alle meine Kollegen aus der Arbeitsgruppe und Abteilung für Ihre Hilfsbereitschaft und emotionale Unterstützung. Insbesondere an Berry und Nina Se. für ihre Unterstützung im Labor und aufbauenden Gespräche, an Natasja und Nina Sch. die mir alle Fragen bzgl. des FACS-Caliburs beantwortet haben und an Babsi die sehr oft mit dem Mittagessen auf mich gewartet hat. Es war eine schöne Zeit mit Euch.

Des Weiteren möchte ich meinen Freunden danken, insbesondere Dany, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, für die zahlreichen Telefongespräche und ihre emotionale Unterstützung.

Mein größter Dank gebührt meinem Mann und meiner Familie für ihre grenzenlose Geduld, fürs Zuhören und ihre liebevolle Unterstützung, die mir sehr wichtig war und es mir ermöglicht hat, alles aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an all diejenigen welche einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben und nicht namentlich erwähnt sind.

Vielen Dank!