

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Gastroenterologisches Labor der II. Med. Klinik & Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar, München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

Die Rolle der potentiellen Tumorstammzellmarker CD133 und cMet
im murinen Pankreaskarzinommodell

Jael A. Nisenbaum

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Priv.-Doz. Dr. J. Th. Siveke
	2. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten

Die Dissertation wurde am 30.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 09.02.2011 angenommen.

1.	Einleitung	8
1.1.	Das Tumorstammzellkonzept	8
1.2.	CD133	10
1.3.	cMet	12
1.4.	Das duktales Adenokarzinom des Pankreas	13
1.5.	Morphologie des PDAC und seiner Vorläuferläsionen	14
1.6.	Diagnostik	16
1.7.	Therapie	16
1.8.	Murine pankreatische Karzinommodelle	17
1.8.1.	Das <i>Kras</i> ^{G12D} -Modell	17
1.8.2.	Das <i>Tgfa</i> -Modell	18
1.8.3.	Das <i>p48</i> ^{+Cre} ; <i>Kras</i> ^{+G12D} ; <i>Tgfa</i> -Modell	18
1.8.4.	Das <i>p48</i> ^{+Cre} ; <i>Kras</i> ^{+G12D} ; <i>N2ko</i> -Modell	19
1.9.	Zielsetzung	19
2.	Material und Methoden	20
2.1.	Material	20
2.1.1.	Chemikalien	20
2.1.2.	Verbrauchsmaterial	20
2.1.3.	Medien und Pufferlösung	20
2.1.4.	Antikörper	21
2.1.5.	Geräte	21
2.1.6.	Software	22
2.1.7.	Mäuse und Zelllinien	22
2.2.	Methoden	23
2.2.1.	Zellkultur	23
2.2.2.	Morphologie	23
2.2.3.	Wachstumsrate	23
2.2.4.	Durchflußzytometrie	24
2.2.5.	FACS	25
2.2.6.	Subkutane Transplantation von Tumorzellen	25
2.2.7.	Orthotope Transplantation von Tumorzellen	26
2.2.8.	Luziferinmessung der orthotop transplantierten Mäuse	27
2.2.9.	Tumorpräparation	28
2.2.10.	Histologie	28
2.2.11.	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	29
2.2.12.	Immunhistochemie	29
2.2.13.	Immunfluoreszenz	30
2.2.14.	Statistische Auswertung	30
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Zelllinienanalyse	32
3.1.1.	Morphologie	32
3.1.2.	Wachstumsanalyse	33
3.1.3.	Durchflußzytometrische Analyse	34
3.2.	Charakterisierung der Ursprungstumoren	37
3.2.1.	Die Maus 944	37
3.2.2.	Die Maus 510079	38

3.3.	Subkutane Transplantation	39
3.4.	Orthotope Transplantation.....	42
3.5.	Populationsanalyse nach FACS.....	44
3.5.1.	Durchflusszytometrische Kontrolle	44
3.5.2.	Markerexpression der Zellen	45
3.5.3.	Morphologie und Wachstumsverhalten der Zellen nach FACS	46
3.6.	Subkutane Transplantation der CD133 ^{+/-} Population	47
3.7.	Orthotope Transplantation der CD133 ^{+/-} Population.....	52
3.8.	Subkutane Transplantation der cMet ^{+/-} Population	56
3.9.	Orthotope Transplantation der cMet ^{+/-} Population	58
4.	Diskussion	62
4.1.	Stabilität der Markerexpression im Versuchsverlauf	62
4.2.	Xenograft versus syngenes Transplantationsmodell	64
4.3.	Subkutanes versus orthotopes Transplantationsmodell.....	65
4.4.	Problematische Aspekte der verwendeten Marker	66
4.5.	CD133	67
4.6.	cMet.....	69
4.7.	Das TSZ-Konzept - Grundlage für revolutionäre Entwicklungen	70
4.8.	Das TSZ-Konzept - Zweifel an Existenz, Relevanz und Detektionsmethoden	71
4.9.	Ausblick.....	72
5.	Zusammenfassung	74
6.	Abstract	75
7.	Literaturverzeichnis	76
8.	Abkürzungsverzeichnis	80
9.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	82
9.1.	Abbildungsverzeichnis	82
9.2.	Tabellenverzeichnis.....	83
10.	Danksagung	84

1. Einleitung

In Deutschland erkrankten im Jahr 2008 436.500 Menschen an Krebs (230.500 Männer; 206.000 Frauen). Im gleichen Zeitraum starben 208.824 Menschen an den Folgen der malignen Erkrankungen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt insgesamt bei 57% (Batzler 2008). Obwohl kontinuierlich große Fortschritte in der Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen gemacht werden, sind diese in vielen Fällen immer noch tödlich. Aus diesem Grund wird weltweit intensiv nach neuen Strategien gesucht um die Prävention, Diagnostik und Therapie bekannter maligner Erkrankungen zu verbessern.

1.1. Das Tumorstammzellkonzept

Hoffnung hinsichtlich neuer Methoden zur Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen weckt seit einigen Jahren das sogenannte Tumorstammzellkonzept (TSZ-Konzept). Dieses Konzept besagt, dass Tumoren nach einem hierarchischen Modell aus einer Untergruppe von Tumorzellen entstehen, die sich durch einen stammzellähnlichem Charakter auszeichnen. Die Entdeckung solcher Zellen für die verschiedenen Tumorentitäten und eine darauf folgende genaue Definition würde neue Dimensionen der diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten eröffnen.

Eine Art TSZ-Konzept, die Vermutung dass Tumoren aus einer bestimmten definierbaren Zellpopulation entstehen, wurde erstmals 1858 von Virchow formuliert (Virchow 1858). Southam machte 1961 autologe Transplantationsversuche bei Tumorpatienten, auf der Suche nach einer Erklärung warum disseminierte Tumorzellen nicht immer Metastasen bilden. Dafür wurde eine Tumorzellsuspension der Patienten subkutan in deren Oberschenkel transplantiert. Die Gruppe stellte fest, dass sich nur vereinzelt Tumoren bildeten und wenn dann nur aus großen Mengen Zellen (mindestens 1 Million Zellen). Dies war vorwiegend bei Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium der Fall (Southam et al. 1961; Wahl et al. 2008). Theorien, dass Tumoren aus einzelnen mutierten Ursprungszellen entstehen, wurden in den folgenden Jahren weiter verfolgt (Nowell 1976).

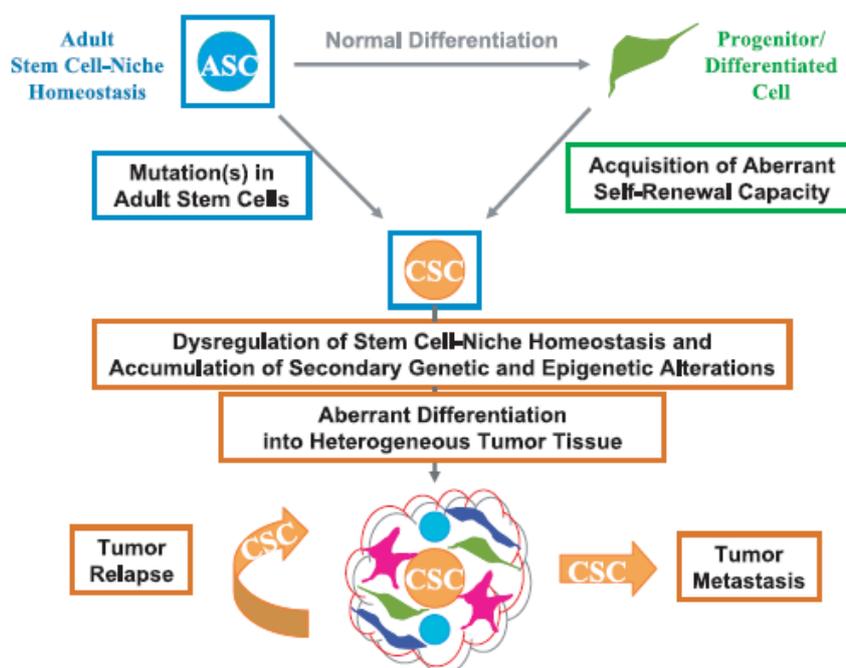
Erst nachdem erkenntnisreiche Fortschritte in der Zellbiologie gemacht worden waren, wurde die Idee wieder aufgegriffen und konnte untermauert werden. In den 90er Jahren gelang es, stammzellähnliche Zellen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) nachzuweisen. Für die humane AML wurden diese Zellen als jene charakterisiert, die die AML rekapitulieren konnten, nachdem sie in NOD/SCID Mäuse transplantiert worden waren. Diese Zellpopulation zeigte die Oberflächenmarkerkombination $CD34^+CD38^-$ (Lapidot et al. 1994).

Nach vielen weiteren Veröffentlichungen zum Thema „Tumorstammzellen“ (TSZ), ohne feste Definition des Begriffs, einigte sich die amerikanische Gemeinschaft für Krebsforschung (AACR) 2006 auf folgendes: Eine TSZ ist eine Zelle innerhalb eines Tumors, welche sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (symmetrisch und asymmetrisch) als auch zum Erzeugen und Aufrechterhalten des heterogenen Zellbilds eines Tumors hat (Clarke et al. 2006).

Nach heutigem Stand der Forschung ist weiterhin umstritten, ob TSZ durch Mutationen aus normalen Stammzellen entstehen oder ob schon ausdifferenzierte Zellen durch verschiedene Mutationen die oben genannten Stammzeleigenschaften zurückgewinnen (siehe Abbildung 1.1) (Rajasekhar et al. 2008).

Die momentane Datenlage weist darauf hin, dass nicht nur für Leukämien sondern auch für solide Tumoren TSZ existieren. Es ist essentiell Charakteristika potentieller TSZ solider Tumoren und hämatoonkologischer Erkrankungen zu differenzieren. Zudem darf nicht von den Eigenschaften potentieller TSZ eines Tumors auf die eines anderen geschlossen werden. Im Vergleich verschiedener Tumoren ist der Anteil der TSZ an der Gesamtzellzahl sehr variabel.

Abbildung 1.1: Schematische Abbildung der Tumorbildung im Sinne des TSZ-Konzepts



Es ist umstritten, ob TSZ (CSC), durch Mutation aus normalen Stammzellen (ASC) oder aus ausdifferenzierten Zellen (Differentiated cells) entstehen. Einmal zur TSZ mutiert, führt sie im ersten Schritt zur Tumorentstehung mit heterogenen Tumorzellgewebe und ist dann für die Metastasierung (Tumor Metastasis) und später auch für Rezidive (Tumor Relapse) verantwortlich (Rajasekhar et al. 2008).

Für verschiedene Tumoren wie z.B. Hirntumoren (Singh et al. 2004), Mamma- (Al-Hajj et al. 2003; Dontu et al. 2003; Ponti et al. 2005), Prostata- (Richardson et al. 2004) und Lungenkarzinome (Collins et al. 2005) konnten unterschiedliche Oberflächenmarkerkombinationen für potentielle TSZ-Populationen isoliert werden. Zu den, im Zusammenhang mit dem TSZ-Konzept häufig genannten Oberflächenmarkern zählen zum Beispiel CD133 (auch bekannt als Prominin 1), CD44, CD24, ESA, ATP-binding cassette B5 (ABCB5) und viele mehr. Als Goldstandard zur Identifikation von TSZ aller Tumorentitäten gilt heute die serielle Transplantation im Tiermodell. Dabei ist Voraussetzung, dass die TSZ-enthaltende Population

den Primärtumor in seiner phänotypischen Heterogenität reproduzieren kann und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erhalten bleibt (Clarke et al. 2006; Dalerba et al. 2007).

Da im Folgenden das Pankreaskarzinom die in dieser Arbeit untersuchte Tumorentität ist, soll nur noch auf die potentielle TSZ des Pankreaskarzinoms eingegangen werden.

Die ersten bedeutenden Erkenntnisse bezüglich der potentiellen TSZ im Pankreaskarzinom veröffentlichten Li et al. im Februar 2007. Sie isolierten eine Zellpopulation mit dem Phänotyp $CD44^+CD24^+ESA^+$. Diese machte 0,2 - 0,8% der Gesamtzellzahl der Pankreaskarzinomzellen aus. Anhand subkutaner Transplantationsversuche konnten für die $CD44^+CD24^+ESA^+$ Population ein erhöhtes Tumorigenitätspotential und stammzellcharakteristische Eigenschaften (Selbsterneuerung und Differenzierungspotential) nachgewiesen werden. Die entstandenen Tumoren waren histologisch vom Primärtumor nicht zu unterscheiden und es ließ sich eine erhöhte Expression von Sonic Hedgehog (SHH) erkennen, welches vermehrt in Vorläuferläsionen und Karzinomen im Pankreas vorkommt (Li et al. 2007).

Kurz darauf (September 2007) konnten Hermann et al. eine andere Oberflächenmarkerkombination als relevant für potentielle TSZ des Pankreaskarzinom und dessen Metastasierung benennen. Bei ihnen stellte eine $CD133^+$ Population die tumorigenitäre Zellgruppe dar.

Sie zeigten dass im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe der Anteil der $CD133^+$ Zellen im Tumorgewebe deutlich erhöht war. Dies führten sie auf eine onkogene Transformation der Zellen zurück, welche mit einer Veränderung der Oberflächenmarker einherging. Nicht einmal 10^6 $CD133^-$ Zellen aus dem humanen Pankreaskarzinom reichten aus um subkutane (s.c.-) Tumoren im Mausmodell zu erzeugen. Im Gegensatz dazu genügten 10^6 unsortierte und sogar 500 $CD133^+$ Zellen um schon nach drei Wochen sichtbare s.c.-Tumoren zu verursachen. Die $CD133^+$ Tumoren stellten histologisch eine Reproduktion des Primärtumors dar. Zusätzlich wies die Gruppe nach, dass die $CD133^+$ Zellen auch in der seriellen Transplantation ihr tumorbildendes Potential nicht verloren. Das Tumorstadium erwies sich sogar als zunehmend schnell und aggressiv (Hermann et al. 2007).

Zudem stellten Hermann et al. fest, dass $CD133^+CXCR4^+$ (ein CXC Chemokin Rezeptor) Zellen aus der Invasionsfront eines Karzinoms dessen Metastasierungspotential bestimmen. Wurden diese Zellen aus der Migrationspopulation herausgefiltert, konnte, ohne Beeinflussung des Tumors an sich, eine Metastasierung verhindert werden (Hermann et al. 2007).

Die Gruppe bezog sich des Weiteren auf die Ergebnisse von Li et al. (Li et al. 2007) und hielten fest, dass durchflusszytometrische Analysen eine Überschneidung, aber keine Deckung ihrer beiden potentiellen TSZ-Population ($CD44^+CD24^+ESA^+$ vs. $CD133^+CXCR4^+$) zeigten (Hermann et al. 2007). Einen Erklärungsversuch für die Diskrepanz der Ergebnisse der beiden Gruppen boten Hermann et al. nicht an.

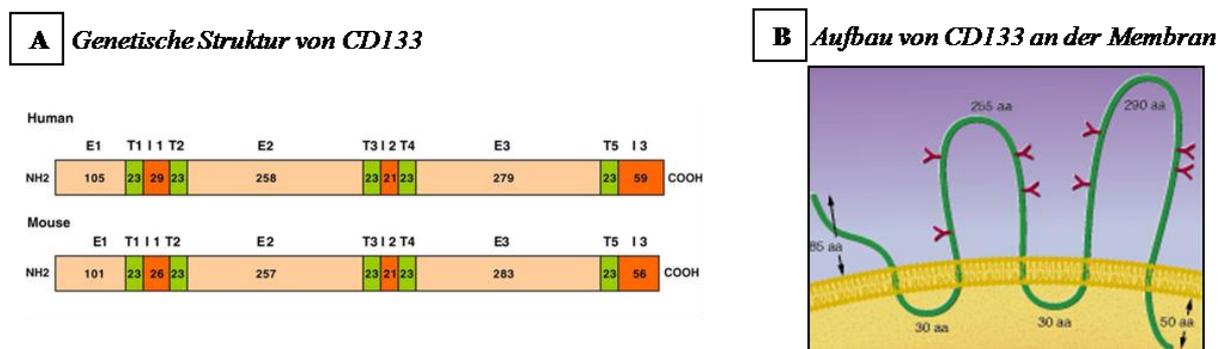
1.2. CD133

Bei dem Versuch potentielle TSZ in soliden Tumoren zu isolieren identifizierten nicht nur Hermann et al. (Hermann et al. 2007) CD133 als relevanten Oberflächenmarker. Auch von anderen Gruppen wurde

CD133 für verschiedene solide Tumoren, wie z.B. das Prostatakarzinom (Collins et al. 2005), das Kolonkarzinom (O'Brien et al. 2007) oder das hepatozelluläre Karzinom (Yin et al. 2007), als potentieller TSZ-Marker hervorgehoben.

CD133, oder auch Prominin-1, war das erste als 5-Transmembranprotein identifizierte Mitglied der Prominin-Familie. Es besteht aus 858 AS und ist ein Glykoprotein von 115 Kilodalton Größe. Es hat 5 Transmembransegmente mit einem extrazellulären N-terminalen und einem zytoplasmatischen C-terminalen Ende (siehe Abbildung 1.2). Die genaue Funktion und die Liganden von CD133 sind bis heute nicht bekannt.

Abbildung 1.2: CD133



(A) Die genetische Struktur von CD133 beim Menschen (Human) bzw. bei der Maus (Mouse). E1-E3 stellen extrazelluläre, I1-I3 intrazelluläre und T1-T5 transmembranäre Domänen dar. Anhand der Zahlen ist die Anzahl der Aminosäuren pro Abschnitt dargestellt (Shmelkov et al. 2005). (B) Vorstellung des Aufbaus von CD133 an der Zellmembran (Miraglia et al. 1997).

Im murinen Pankreas wird CD133 spezifisch apikal auf den Mikrovilli von dukталen Zellen exprimiert. Azinäre Zellen zeigen keine Expression von CD133, obwohl sie ebenfalls Mikrovilli tragen. Die CD133⁺ Population dukталer Zellen des Pankreas beinhaltet Vorläuferzellen mit hoher Proliferationskapazität. Diese sind außer durch den Marker CD133 noch durch eine spezielle Oberflächenmarkerkombination gekennzeichnet. Diese durch CD133 charakterisierten Vorläuferzellen tragen auch cMet. (Oshima et al. 2007). Zwei Studien lieferten Hinweise darauf dass CD133 im humanen Pankreas, in Kombination mit anderen Oberflächenmarkern, eine potentielle TSZ-Population charakterisieren könnte (Hermann et al. 2007; Olempska et al. 2007).

Außerdem zeigte sich, dass die Expression von CD133 mRNA in den mononukleären Zellen im peripheren Blut bei soliden Tumoren, vollkommen unabhängig von der Tumorentität, vor allem bei Patienten mit Knochenmetastasen, deutlich erhöht ist. CD133 stellt bei der Metastaseninitiation, dem Krankheitsverlauf und der Überlebenszeit einen wichtigen negativen Faktor dar (Mehra et al. 2006). Allein um die eben genannten Faktoren positiv beeinflussen zu können, wären eine Charakterisierung dieser Zellen und die Entwicklung einer gezielten Therapie gegen eben diese bedeutsam für eine bessere Prognose des Pankreaskarzinoms.

Zur Entdeckung beigetragen hatten folgende Entwicklungen:

1997 produzierten Yin et al. einen humanen monoklonalen Ak der das Antigen AC133 erkannte. AC133 ist ein glykolisiertes Epitop von CD133. Dieses Epitop wird spezifisch nur auf CD34⁺ Vorläuferzellen im adulten Blut und Knochenmark und der fetalen Leber exprimiert. Damit schien AC133 ein vielversprechendes Protein im Bezug auf die Identifikation hämopoetischer Vorläuferzellen zu sein. Interessanterweise stellte sich heraus, dass trotz der selektiven Expression von AC133, dessen mRNA weit verbreitet ist d.h. in vielen verschiedenen Zellen exprimiert wird (Yin et al. 1997).

Im gleichen Jahr erarbeiteten Weigmann et al. einen murinen monoklonalen Ak der ein Protein erkannte, welches dem AC 133 sehr ähnlich war. Sie nannten es aufgrund seiner Verteilung innerhalb der Plasmamembran „Prominin“. Der Name des Proteins stammt von dem lateinischen Wort „prominere“, was „hervorragend“ bedeutet. Es kam gehäuft in den apikalen Mikrovilli des Neuroepithels sowie in der Niere vor. In vielen Organen wie der Leber, dem Herz, dem Darm etc. konnte Prominin nicht nachgewiesen werden (Weigmann et al. 1997).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von (humanem) AC133 und (murinem) Prominin ging man davon aus dass die beiden Proteine homolog sind (Shmelkov et al. 2005). Im Folgenden soll Prominin, wie in der Literatur häufig üblich, CD133 gleichgesetzt werden.

1.3. cMet

Auf der Suche nach TSZ im Pankreaskarzinom ist auch cMet ein interessanter Marker. Aufgrund seiner Rolle in der Pankreaszelle, der Lokalisation auf Vorläufer- und Stammzellen und der sehr häufig veränderten Funktion im Karzinom wird vermutet, dass auch cMet ein möglicher Oberflächenmarker von TSZ sein könnte (Gentile et al. 2008). Zusätzlich erwies sich cMet in vorangegangenen Studien, u.a. in Kombination mit CD133, als Teil einer charakterisierenden Oberflächenmarkerkombination einer potentiellen TSZ Population des Pankreas (Oshima et al. 2007).

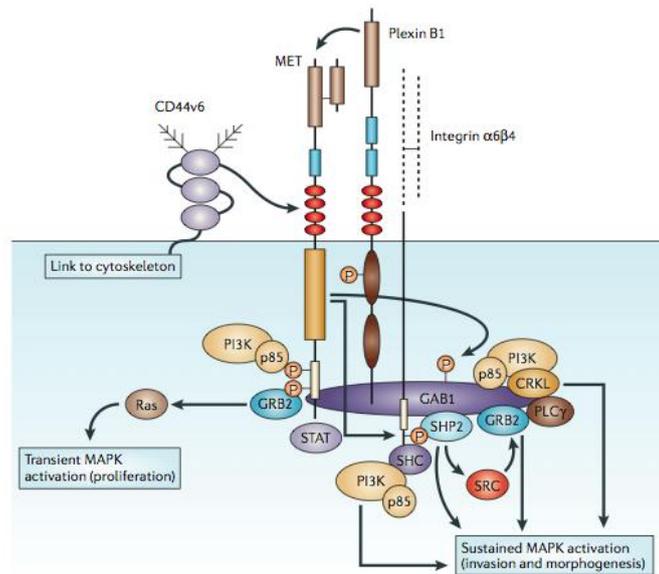
cMet, auch bekannt als Met (mesenchymal-epithelial transition factor) oder HGFR (hepatocyte growth factor receptor), ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor der physiologisch auf Epithelzellen exprimiert wird. HGF (hepatocyte growth factor) ist der einzige bekannte Ligand des Rezeptors.

Durch die Aktivierung der Tyrosinkinase und folgende Phosphorylierung des zentralen Proteins GAB1 wird ein sogenanntes „invasion growth“ Programm in Gang gesetzt. Physiologisch bewirkt dieses „Programm“, abhängig vom Zelltyp, eine biologische Antwort die zu Zellproliferation, Angiogenese, Ausbildung von Zellpolarität, Invasion und vielem mehr führt. Zudem ist cMet essentiell für die embryonale Entwicklung und die Wundheilung (siehe Abbildung 1.3) (Boccaccio et al. 2006).

Die physiologischer weise notwendigen Veränderungen, durch Aktivierung des „invasion growth“ Programm, werden der Zelle im Falle einer Mutation zum Verhängnis. In vielen humanen Tumoren ist die Regulation von cMet gestört oder der Rezeptor mutiert und spielt dann eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Karzinoms. Die der ständigen Aktivierung folgenden Abläufe fördern Tumorwachstum und Metastasierung. Außerdem werden durch die pathologische Aktivierung von cMet einige als onkogen

bekannte Signalwege wie die von RAS, PI3K, STAT3 und β -catenin initiiert (Ma et al. 2003; Gentile et al. 2008). Dadurch korreliert der Nachweis von cMet in Tumorzellen positiv mit einer schlechten Prognose der Krankheit (Birchmeier et al. 2003).

Abbildung 1.3: cMet



cMet ist ein membranständiges Protein. Durch einen Liganden aktiviert, setzt der Rezeptor, über die Phosphorylierung des zentralen Proteins GAB1, verschiedene Signalwege in Gang. Im Falle einer Mutation wird z.B. das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren durch die ständige Aktivierung onkogener Signalwege unterstützt (Boccaccio et al. 2006).

cMet wäre als Marker einer TSZ des Pankreaskarzinoms besonders interessant, da schon heute viele verschiedene Ansätze bekannt sind, um das von cMet getriggerte „invasive growth“ Programm gezielt zu unterbinden. Diese Methoden basieren auf Blockade der Tyrosinkinase, auf Inhibition des HGF und auf Antikörper gegen verschiedene beteiligte Strukturen (Gentile et al. 2008).

1.4. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Die Entdeckung und Charakterisierung einer TSZ wäre im Falle des Pankreaskarzinoms besonders bedeutsam. Jedes Jahr erkranken in Deutschland ungefähr 13.000 Menschen an einem Pankreaskarzinom. Das sind zwar nur ca. 3% aller Krebsneuerkrankungen des Landes, aber gleichzeitig ist das Pankreaskarzinom für 6% der Krebstodesfälle im Jahr verantwortlich. Dabei sind Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen. Die Krankheit tritt meist erst im höheren Lebensalter auf (Mittleres Erkrankungsalter Männer: 68 Jahre, Frauen: 75 Jahre). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur 4%. Damit hat das Pankreaskarzinom die kürzeste Lebenserwartung aller malignen Neoplasien. Dies ist wohl die Konsequenz aus der meist späten Detektion und der damit verbundenen Einschränkungen in der

Therapie sowie der frühen und aggressiven Metastasierung dieser Tumorentität. Diese Kombination schließt die Option der kurativen Resektion meist aus (Batzler 2008).

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) repräsentiert mehr als 85% aller bekannten Formen des Pankreaskarzinoms. Deswegen soll im Folgenden nur noch auf diese Form des Pankreaskarzinoms eingegangen werden.

Hohes Alter, Rauchen, chronische Pankreatitis, Übergewicht und Diabetes mellitus gelten als Risikofaktoren zur Entstehung des PDAC. Auch familiäre Häufung aufgrund von Mutationen in INK4A, BRCA2, LKB1 und MLH1 sind bekannt (Hezel et al. 2006; Batzler 2008).

Das PDAC entsteht aus den exokrinen Zellen des Pankreas. Es zeichnet sich unter anderem durch eine frühe Infiltration in die umliegenden Gewebe wie Lymphknoten, Milz und Peritoneum aus. Häufige Lokalisation der möglichen Metastasen sind die umliegenden Lymphknoten und die Leber.

Der Name „duktales Adenokarzinom“ rührt nicht vom Ursprung des Karzinoms, sondern von der histologischen Ähnlichkeit der neoplastischen Gewebe mit den duktalem Strukturen im gesunden Pankreas. Die Ursprungszellen des PDAC sind bis zum heutigen Tag nicht nachgewiesen (Maitra et al. 2008). Vermutet wird der Ursprung in Azinuszellen, duktalem Zellen oder auch den zentroazinären Zellen des Pankreas.

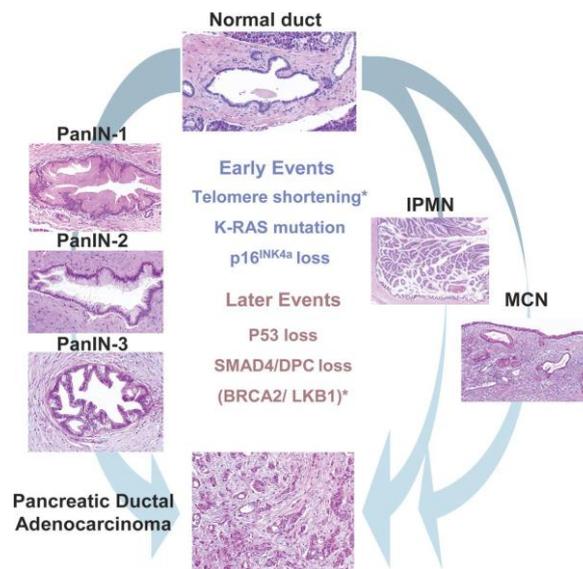
1.5. Morphologie des PDAC und seiner Vorläuferläsionen

Es sind drei verschiedene Formen von Läsionen bekannt die als Vorläufer des PDAC gelten (Hruban et al. 2000; Hruban et al. 2001; Maitra et al. 2005). Man unterscheidet muzinös zystische Neoplasien (MCN), intraduktales papillöses muzinöses Neoplasien (IPMN) und die pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). All diese können sich, abhängig von bestimmten genetischen Mutationen, im Verlauf der Tumorbildung ausbilden (siehe Abbildung 1.4) (Hezel et al. 2006).

MCN sind große zystische Läsionen, mit Muzin produzierendem Epithel, die meist zuerst im Pankreasschwanz auftreten. Definitionsgemäß zeigen sie ein „ovarian type“ Stroma, eine Schicht spindelförmiger Zellen direkt unterhalb des neoplastischen Epithels. MCN weisen unterschiedliche Grade von Dysplasien, Zellkernatypien und Invasion auf und reichen von gutartigen (muzinöses Zystadenom) bis zu invasiv malignen (muzinöses Zystadenokarzinom) Läsionen (Hezel et al. 2006).

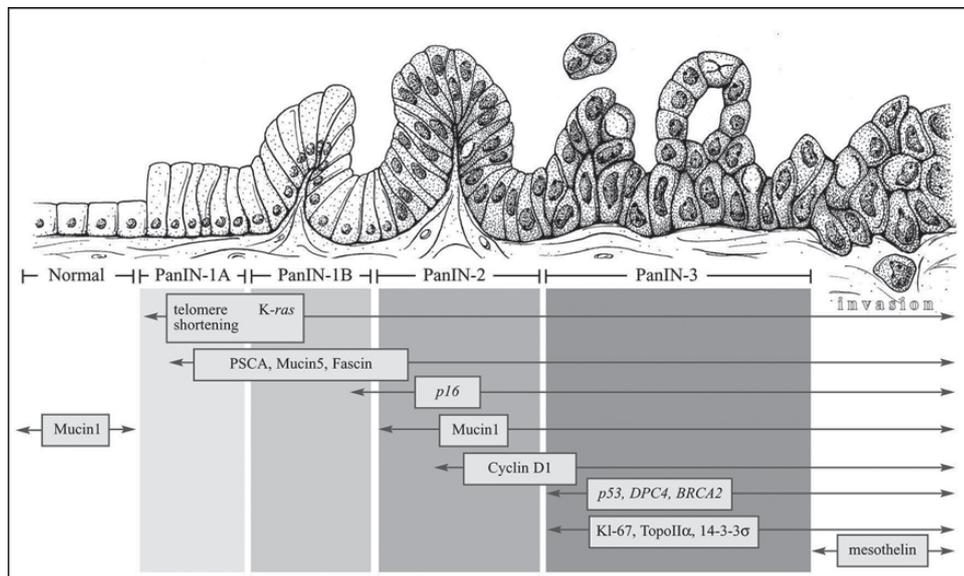
IPMN sind ebenfalls Muzin produzierende, epitheliale, papillöse Neoplasien. Sie entstehen definitionsgemäß im Haupt- bzw. einem großen Pankreasgang, meist zuerst im Pankreaskopf. Bei familiär bedingtem Pankreaskarzinom lassen sich IPMN häufiger als PanINs nachweisen (Canto et al. 2006).

Abbildung 1.4: Potentielle Entwicklungswege des PDAC



Mögliche Entstehung des PDAC aus den bekannten Vorläuferläsionen (PanIN, IPMN, MCN). Art der Vorläuferläsionen und Morphologie des Karzinoms sind abhängig von bestimmten frühen („early events“) oder späten („later events“) genetischen Mutationen in den beteiligten Zellen (Hezel et al. 2006).

Abbildung 1.5: Tumorprogressionsmodell des PDAC



Es wird heute vermutet, dass das PDAC auf der Basis unterschiedlicher Mutationen entsteht. Einige dieser Mutationen und der Zeitpunkt ihres Auftretens im Verlauf der Tumorbildung sind heute identifiziert. Es wird angenommen dass eine gewisse PanIN-Karzinom-Sequenz besteht, die zur Pankreaskarzinomentstehung durchlaufen werden muss (Koorstra et al. 2008).

Die häufigste und am besten analysierte Vorläuferläsion des PDAC sind PanIN Läsionen. Die PanIN werden abhängig von ihrer Architektur und der Zellkernatypien in Stadium I-III eingeteilt. Zum

1. Einleitung

Vergleich: Normales duktales Epithel hat kuboidale Zellen und runde, basal liegende, gleichförmige Zellkerne.

PanIN I zeichnen sich durch säulenartige Zellen aus. Die Polarität der Zellen ist erhalten. Sie weisen apikal muzinhaltiges Zytoplasma auf, basal die runden Zellkerne. Kernatypien sind keine zu finden. Die Läsionen zeigen entweder flaches (PanIN IA) oder papillöses (PanIN IB) Epithel.

PanIN II haben meist papillöses Epithel. Sie zeigen definitionsgemäß Zellkernatypien wie Veränderung des Zellkerns oder Verlust der Polarität der Zelle.

PanIN III sind durch ein papillöses Wachstum charakterisiert. Meist besteht totaler Polaritätsverlust der Zelle („goblet cells“) und es treten starke Zellkernatypien auf. Es sind viele gestörte Mitosen sichtbar. Oft findet man vom Epithel gelöste Zellkluster im Lumen der Läsion. Da die Läsionen die Basalmembran noch nicht durchbrechen, werden sie auch als „carcinoma in situ“ bezeichnet (Maitra et al. 2005; Hruban et al. 2006).

Es wird vermutet, dass beim PDAC eine Art PanIN-Karzinom-Sequenz besteht und eine PanIN III regelmäßig in ein Pankreaskarzinom übergeht (siehe Abbildung 1.5) (Hruban et al. 2006).

Ob überhaupt und wie die Läsionen untereinander zusammenhängen und welche Läsion auf welche molekularen Veränderungen zurückgeht ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Trotzdem gibt es Hinweise auf bestimmte genetische Mutationen, wie z.B. Mutationen von *Kras*, *p53*, *p16^{ink4a}*, *Smad4* und *BRCA2*, die für die verschiedenen Vorläuferläsionen bzw. deren Weiterentwicklung charakteristisch sind (siehe Abbildung 1.5) (Hruban et al. 2001).

1.6. Diagnostik

Vorläuferläsionen und Tumoren des Pankreas können mit Hilfe von Ultraschall, Endosonographie, Kernspintomographie und Computertomographie detektiert werden. Allerdings ist dies oft aufgrund der retroperitonealen Lage und der kleinen Größe der Vorläuferläsionen nur schwer möglich. Da ein Großteil der PDAC im Pankreaskopf entstehen, ist der Nachweis des Verschlusses des Gallen- oder Pankreasgangs in der ERCP oft wegweisend. Der bei PDAC häufig im Serum nachweisbare Tumormarker CA19-9 und auch das unspezifische CEA eignen sich nur zur Verlaufs- und Therapiekontrolle, nicht aber zur Diagnostik.

1.7. Therapie

Neben der einzigen kurativen Option des PDAC, der Tumorexzision im frühen Stadium, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der palliativen Therapie. Dabei bedient man sich verschiedener Verfahren wie der Radio- oder Chemotherapie, der Interventionstherapie oder auch palliativer Chirurgie.

Die sehr eingeschränkten Therapiemöglichkeiten lassen sich auf zwei grundlegende Faktoren zurückführen. Einerseits wird das PDAC meist erst in sehr späten Stadien erkannt. Neben der erschwerten Diagnostik, sind die eher unspezifischen Symptome, wie Bauchschmerzen, Appetit- und Gewichtsverlust, dafür verantwortlich. Andererseits stellt sich das PDAC als weitgehend resistent gegen alle gängigen

Formen der Radio- und Chemotherapie dar. Neue Therapiemöglichkeiten auf molekularer Ebene sind vielversprechend, haben sich allerdings noch nicht durchgesetzt.

1.8. Murine pankreatische Karzinommodelle

In den letzten Jahren wurden verstärkt verschiedene konditionale pankreasspezifische endogene murine Karzinommodelle entwickelt. Die Motivation zur Entwicklung solcher Mäuse ist es, das Wissen über die Entwicklung, verschiedene Funktionen und eventuelle pathologische Abläufe des Pankreas zu erweitern, indem Morphologie und die ablaufenden Prozesse des humanen PDAC im Tiermodell möglichst exakt nachgebildet werden. Dies gelang u.a. auf Basis der zunehmenden Kenntnisse von humaner Tumormorphologie und verschiedener relevanter Mutationen im Verlauf der Tumorbildung.

1.8.1. Das *Kras*^{G12D}-Modell

Überzeugende Erfolge, in der Entwicklung eines Mausmodells für das PDAC, konnten Hingorani et al. im Jahr 2003 für sich verzeichnen. Sie entwickelten ein Modell mit konditionaler, pankreasspezifischer Aktivierung des onkogenen *Kras*^{G12D} Allels (Hingorani et al. 2003). Da schon in PanINs und im Verlauf in über 90% der Pankreaskarzinome eine aktivierende Mutation des Protoonkogens *Kras* nachgewiesen werden kann, gilt es als eine der initiiierenden Mutationen der Pankreaskarzinomentwicklung (Aguirre et al. 2003).

Kras gehört zur Familie der kleinen G-Proteine und funktioniert in der Zelle als GTPase. Es reguliert Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Aktivierende Mutationen führen zu einem Verlust der intrinsischen katalytischen Eigenschaft von *Kras*. So bleibt das Protein ständig aktiv.

Die spezifische Aktivierung von *Kras* gelang der Forschergruppe dadurch, dass sie dem mutierten *Kras*^{G12D} zunächst ein Stopp Element, flankiert von loxP-Sequenzen (Lox-Stopp-Lox; LSL), vorschalteten. Das Stopp Element konnte nun pankreasspezifisch, mit Hilfe einer Cre-Rekombinase über den PDX1 Promoter oder als Knock-in heterozygot im p48-Lokus, ausgeschaltet werden. So entstand eine *p48*^{+Cre}; *Kras*^{+G12D} (CK) Maus (Hingorani et al. 2003).

In diesem Modell ist die Histologie und die molekulare Tumorbildung der des humanen Pankreaskarzinoms sehr ähnlich. Die Mäuse zeigen die verschiedenen Stadien der oben beschriebenen PanIN Läsionen (vgl. 1.5) bis hin zu invasiv wachsenden und metastasierenden Pankreaskarzinomen. Leider entstanden metastasierende Karzinome erst relativ spät (nach mehreren Monaten) (Hingorani et al. 2003).

Im Folgenden wurden in das neue Mausmodell zusätzlich andere gefloxt Allele eingeführt. Sowohl um den Einfluss einzelner Mutationen genauer zu analysieren als auch um ein der humanen Tumorbildung noch ähnlicheres Modell entwickeln zu können (siehe Abbildung 1.6).

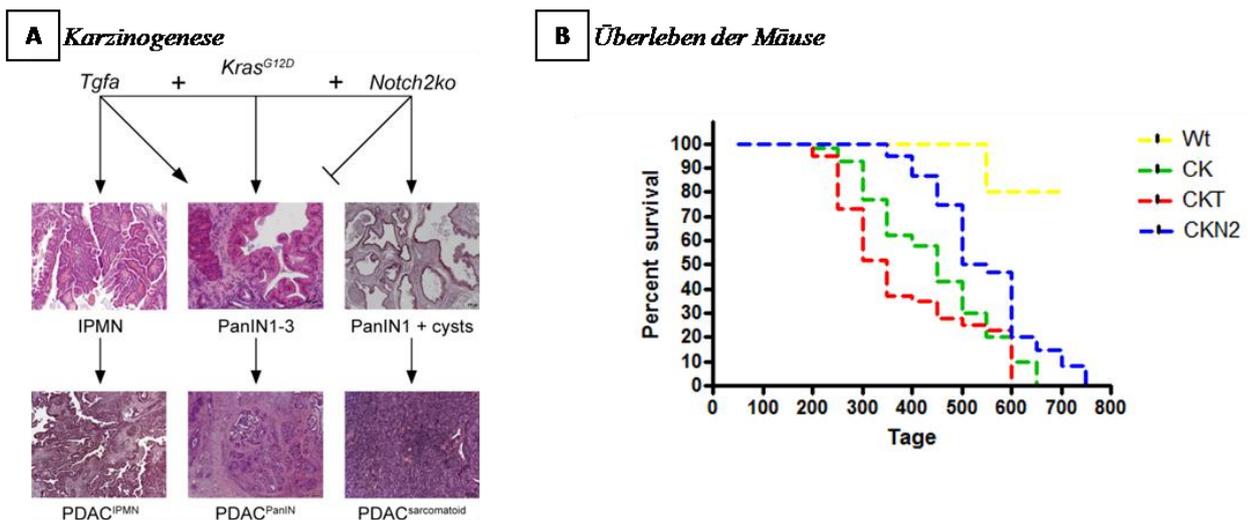
1.8.2. Das *Tgfa*-Modell

Sandgren et al. hatten schon vor der Entwicklung einer *CK*-Maus ein *Tgfa*-Mausmodell entwickelt (Sandgren et al. 1990). Sie wählten *Tgfa* aufgrund der ständigen Assoziation des Markers mit pathologischem Wachstum und der allgemein wichtigen Rolle von Wachstumsfaktoren in der Tumorbildung.

Tgfa gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und ist ein kompetitiver Aktivator am EGF Rezeptor, einer transmembranen Tyrosinkinase. Die *Tgfa* Mäuse zeigen unter der Kontrolle eines Elastase Promoters (*EL-TGF-a-hGH*) eine Überexpression von *Tgfa*. Diese vermittelt über intrazelluläre Signaltransduktion proliferative Stimuli in der Zelle. Zudem führt die Mutation zu einer übermäßigen Proliferation von Fibroblasten im Pankreas (Wagner et al. 1998).

Die *Tgfa* -Mäuse entwickeln innerhalb eines Jahres Karzinome die ihren Ursprung in den dukталen Zellen haben und in ihrer Histologie denen des Menschen sehr ähnlich sind (Sandgren et al. 1990). Allerdings zeigen sie im Verlauf keine typischen PanIN Läsionen (siehe Abbildung 1.6).

Abbildung 1.6: Relevanz des Genotypen im Bezug auf Tumorbildung und Überleben der Mäuse



(A) Tumorbildung des murinen PDAC abhängig vom Genotyp. Die *CK*-Mäuse entwickeln primär PanINs aller Stadien. Bei den *CKT*-Mäusen durchläuft die Tumorbildung die gleiche PanIN Sequenz. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von IPMNs. Im Gegensatz dazu entwickeln *CKN2*-Mäuse anaplastische Karzinome. (B) Die Überlebenszeit der Mäuse ist abhängig vom Genotyp. Im Vergleich zu den *Wt*-Tieren sterben die Mäuse mit genetischen Mutationen früher, in der Regel an den Folgen des Pankreaskarzinoms.

1.8.3. Das *p48^{+Cre}; Kras^{+G12D}; Tgfa*-Modell

Durch Kreuzung einer *Tgfa* Maus mit einer *p48^{+Cre}; Kras^{+G12D}* Maus wurde ein *p48^{+Cre}; Kras^{+G12D}; Tgfa* (*CKT*) Mausmodell gezüchtet (Siveke et al. 2007). Diese Mäuse zeigen alle Stadien von PanIN Läsionen und IPMNs. Diese Strukturen ersetzen schon nach 2-3 Monaten fast die kompletten azinären Anteile des

Pankreas und führen damit weit früher als die $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$ Mutation zu malignen Veränderungen (siehe Abbildung 1.6).

1.8.4. Das $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$ -Modell

Neben den *CK* und *CKT* Modellen, haben wir mit einer $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$ (*CKN2*) Maus (Siveke et al., Manuskript in Vorbereitung), als weiteres wichtiges Modell im Bezug auf das Pankreaskarzinom, gearbeitet. Neben der Aktivierung von *Kras* wird bei diesen Tieren das *Notch 2* Gen deaktiviert.

Notch 2 ist ein Transmembranprotein. Bei Aktivierung wird der intrazelluläre Teil des Rezeptors abgespalten und zur Modifizierung bestimmter Genexpression in den Zellkern geschleust. *Notch 2* spielt physiologischer Weise eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Pankreas, da es die Selbsterneuerung von Stammzellen fördert und die Differenzierung der exokrinen Zellen beeinflusst. Die Deaktivierung von *Notch 2* verhindert diesen Aktivierungsmechanismus der Zelle und führt zu pathologischen Veränderungen. Im *CKN2*-Mausmodell entstehen vorwiegend anaplastische Pankreaskarzinome. Parallel finden sich frühe PanIN Läsionen und Zysten. Höhergradige PanIN Läsionen werden von Mäusen mit einer Blockade von *Notch 2* nicht ausgebildet (siehe Abbildung 1.6) (Mazur et al. 2010).

1.9. Zielsetzung

Ziel ist es herauszufinden, ob CD133 und/oder cMet entscheidende Marker bei der Definition einer Oberflächenmarkerkombination im Sinne des TSZ-Konzepts im murinen Pankreaskarzinommodell darstellen. Dafür soll in den durchgeführten Versuchen vorerst untersucht werden, ob und wie CD133 und cMet in den ursprünglichen Tumoren und den generierten Tumorzelllinien exprimiert werden und ob sich die Rezeptor tragenden Zellen durch besondere Charakteristika auszeichnen.

Im Folgenden gilt es herauszufinden, welchen Einfluss die An- bzw. Abwesenheit der Marker CD133 bzw. cMet *in vitro* und *in vivo* haben. Idealerweise lässt sich mittels durchgeführter Versuche ein erhöhtes Tumorentstehungspotential, eine aggressivere Metastasierung, eine Rekapitulation des Ursprungstumors oder andere Hinweise auf stammzellähnliche Charakteristika bei einer der Populationen nachweisen. Entsprechende Veränderungen weisen auf die Relevanz einer der Marker in der Tumorbildung hin und werden ihn für weitere Versuche auf der Suche nach einer Oberflächenmarkerkombination für potentielle TSZ im murinen Pankreaskarzinommodell qualifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon)	ZPF, MRI, München
Antigen unmasking solution	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
D-Luziferin-Na #bc 218	Synchem, Felsberg/Altenburg
Ethanol 100%, 96%; 70%	Apotheke MRI, München
Ethanolische Eosinlösung 1,7% (1,7% Eosin in Ethanol 96%)	Apotheke MRI, München
Forene Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Hämatoxylin- Lösung modifiziert nach Gill III	Merck, Darmstadt
Hydrogen Peroxid 30%	Merck, Darmstadt
Isotonische Natriumchloridlösung NaCl 0,9%	Diaco, Triest, Italien
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Metacam	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
MMF (Midazolam, Medetomidin, Fentanyl)	ZPF MRI, München
N,N-Dimethylformamid	Merck Darmstadt
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Pertex Synthetisches Eindeckmittel	Medite, Burgdorf
Roti-Histol	Roth, Karlsruhe
Streptavidin/Biotin Blocking Kit	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Trypan Blue 0.5% in physiological saline	Biochrome AG, Berlin
Vectashield Hard Set Mounting Medium with DAPI	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Vectastain ABC Kit	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt

2.1.2. Verbrauchsmaterial

4-Kammer-Slides	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
50 ml Röhrchen	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
6-well Platten	Sarstedt, Nürnberg
Aufsätze für Multipipette (5,10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser # H877; 1871	Roth, Karlsruhe
Objektträger SUPERFROST PLUS	Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen (5, 10,50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nürnberg
Plastikschalen für Gewebe	Bio Optica, Milan, Italien
Röhrchen für Kryozylinder	Kartell, Italien
Spritze Omnifix-F 1ml	B.Braun, Welsungen
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B.Braun, Welsungen
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Nähmaterial Vicryl 6-0	Ethicon, Norderstedt
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ²)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.3. Medien und Pufferlösung

Donkey Normal Serum #D9663	Sigma, Rödermarkt
FBS Superior	Biochrome AG, Berlin

GIBCO DPBS 1x	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
GIBCO 0.05% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
GIBCO DMEM 1x #D9663	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
(+)Glucose 4,5g/l (+)L-Glutamin (-)Pyruvat	
GIBCO MEM NEAA 100x	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
GIBCO Penicillin- Streptomycin	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Goat Normal Serum # G9023	Sigma, Rödermarkt
Inst Amed 9.55g/l PBS Dulbecco	Biochrome AG, Berlin
Rabbit Normal Serum #R9133	Sigma, Rödermarkt

2.1.4. Antikörper

Tabelle 2.1: Antikörpertabelle

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Verwendung
Anti-Rabbit Alexa Fluor 488	Esel	1:500	Invitrogen #A21206	IF
Anti-Rabbit Alexa Fluor 555	Ziege	1:500	Invitrogen #A21429	IF, DZ, FACS
Anti-Rat Alexa Fluor 568	Ziege	1:500	Invitrogen #A110077	IF
Biotinylated Anti-Rat IgG	Hase	1:250	Vector # BA-4001	ICH
Biotinylated Anti-Mouse IgG	Ziege	1:250	Vector #BA-9200	ICH
CD133	Ratte	1:2000	eBioscience #14 133 182	IF
CD133/1 AC133 (APC)	Maus	1:50	Miltenyi #130-090-826	DZ, FACS
CD133/1 AC133 (PE)	Maus	1:50	Miltenyi #130-080-801	DZ
CD24 (FITC)	Ratte	1:100	BD Pharmingen #553261	DZ
CD44 (PE)	Ratte	1:100	BD Pharmingen #553134	DZ
CK19 (Troma III)	Ratte	1:200	Rolf Kemler, MPI, Freiburg	IF, ICH
Isotyp IgG2a (FITC)	Maus	1:100	EBioscience #11-4724	DZ, FACS
Isotyp IgG2b (APC)	Ratte	1:100	BD Pharmingen #553991	DZ, FACS
Isotyp IgG2b (PE)	Ratte	1:100	BD Pharmingen #553989	DZ, FACS
Met (C-28)	Hase	1:200	Santa Cruz #sc-161	DZ, FACS
Mucin 4 (H300)	Hase	1:200	Santa Cruz #sc-20117	FACS
PCNA (PC-10)	Maus	1:200	Santa Cruz #sc-56	ICH

Für die Immunfluoreszenz (IF), die Immunhistochemie (ICH), den FACS (fluorescence activated cell sort) und die Durchflußzytometrie (DZ) verwendeten Antikörper.

2.1.5. Geräte

Cryostat Microm HM 560
Digitalkamera DMC-FX01

Microm International, Walldorf
Panasonic, Hamburg

2. Material und Methoden

FACS Aria	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
FACScalibur	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen
Heracell 240 (37°C; 5% CO ₂)	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Göttingen
Lumat LB 9507 DL Ready	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Microliter Syringes	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Microtome # HM 355S	Microm International, Walldorf
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Laboratory Glassware, Marienfeld
Pipetten (0,5-2µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.6. Software

AxioVision 4.4	Carl Zeiss, Göttingen
Cell Quest 3.0	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Diva Version 6.1.1	BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
Weasel Version 2.3	WEHI Biotech Centre, Melbourne, Australien

2.1.7. Mäuse und Zelllinien

Es wurden eigens gezüchtete Mäuse der Genotypen $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$ (CK), $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; Tgfa$; $PCNA^{+/LSL-fluc}$ (CKT) und $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$ (CKN2) zur Gewinnung der für die Versuche nötigen Zelllinien verwendet (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Aufstellung der verwendeten Zelllinien mit entsprechendem Genotyp

Zelllinie	Genotyp	Zelllinie	Genotyp
2190	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$	510079	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; Tgfa$
9801	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$	1006	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$
9907	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$	1009	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$
17027	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$	1013	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$
944	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; Tgfa$	3113	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$
51640	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; Tgfa$	5112	$p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$

Bei Krankheitszeichen, wie schlechter Allgemeinzustand, Kachexie und Aszites wurden die Mäuse getötet und auf Karzinome und Metastasen hin untersucht. Aus diesen wurden, neben der Gewinnung von Gewebe für Paraffin- und Kryoblöcke, Zelllinien generiert. Es entstand ein großes Zelllinienkollektiv muriner Pankreaskarzinome.

Für die *in vitro* Versuche wurden alle in Tabelle 2.2 genannten Linien verwendet, für die *in vivo* Versuche ausschließlich die Linien 944 und 510079.

Für die *in vivo* Versuche wurden die Zellen subkutan und orthotop in Nacktmäuse der Linie Swiss Nu/Nu transplantiert. Die Mäuse waren jeweils zum Zeitpunkt der Transplantation ca. 8 Wochen alt.

Alle Tiere wurden in den Tierställen des Klinikum rechts der Isar München, TU München, mit einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, gehalten und betreut. Sie hatten stets freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Sie wurden von den zuständigen Pflegern täglich kontrolliert. Alle *in vivo* Versuche wurden in Übereinstimmung mit den tierexperimentellen Richtlinien des ZPF des MRI durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden in DMEM Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FBS, 1% nicht essentiellen AS und 1% Penicillin/Streptomycin (im folgenden mit „Kulturmedium“ bezeichnet) in Brutschränken bei 37°C, 6,5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in Sterilwerkbänken unter aseptischen Bedingungen. Die Zellen wurden regelmäßig, bei ungefähr 80%iger Konfluenz, passagiert. Das verwendete Kulturmedium, PBS und Trypsin-EDTA wurden vor Arbeitsbeginn im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Für das Passagieren wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von Trypsin-EDTA, in 3-5min bei 37°C im Brutschrank, vom Flaschenboden abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe des oben beschriebenen Kulturmediums gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen mit frischem Kulturmedium 1:10 verdünnt und erneut ausgesät.

Falls notwendig wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt, nachdem die lebenden Zellen mit Trypanblau angefärbt worden waren.

2.2.2. Morphologie

Zur Analyse der Morphologie wurden die Zellen, zu einem entsprechenden Zeitpunkt, mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt, um abgestorbene Zellen bzw. Zellreste zu entfernen. Nun wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer Kamera das Aussehen der Zellen bewertet und fotografisch festgehalten.

2.2.3. Wachstumsrate

Zur Bestimmung der Wachstumsrate der Zelllinien wurden pro Zelllinie, in je 3 Well von 6-Well-Platten, 10⁵ Zellen ausgesät. Diese wurden in 1ml Kulturmedium kultiviert (Kulturbedingungen vgl. 2.2.1). Nach 48h wurde die Zellzahl der lebenden Zellen pro ml bestimmt (vgl. 2.2.1) und der Wachstumsfaktor berechnet.

2.2.4. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt ein optisches Messsystem zur Analyse von Zellpopulationen dar, die vorher mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert worden sind. Mit Hilfe einer Laserlichtquelle und eines der Fluoreszenz proportionalen Lichtsignals ist sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Bewertung des markierten Merkmals möglich.

Die Durchflußzytometrie wurde zur Analyse der Expression von bestimmten membrangebundenen Oberflächenmarkern auf den Zellen, der in Tabelle 2.2 beschriebenen Zelllinien, verwendet. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte mit einem FACScalibur. Diese wurde mit dem Programm Cell Quest 3.0 ausgearbeitet. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Programms Weasel Version 2.3. ausgewertet und in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert.

Zur Vorbereitung der Durchflußzytometrie wurde die jeweilige Zelllinie bei 80%iger Konfluenz mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden mit Medium resuspendiert, und dann zwei Mal in Folge zuerst zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und dann mit PBS resuspendiert. Nach Anfärben der Zellen mit Trypanblau, wurde die Zellzahl pro ml bestimmt.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und alle Inkubationszeiten im Dunkeln durchgeführt.

Pro Zelllinie wurden sieben Eppendorfgefäße mit je 100µl PBS/2%FBS mit 5×10^5 Zellen zur Zellfärbung und der folgenden durchflußzytometrischen Analyse angesetzt.

Für die Färbung der Zellen in Eppendorfgefäß 1-7 wurde folgendes Schema entwickelt:

- keine Färbung
- Isotypkontrolle
 - APC 1µl
 - FITC 1µl
 - PE 1µl
- CD24 FITC 1µl
- CD44 PE 1µl
- CD133 APC 1µl
- CD24 FITC + CD44 PE + CD133 APC je 1µl
- CD24 FITC + cMet PE + CD133 APC je 1µl

Zuerst wurde 1µl des unmarkierten Antikörpers (Ak) cMet in die Zellsuspension in Eppendorfgefäß 7 gegeben und 15 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen. Dafür wurde der Ak-Zellsuspension 400µl PBS/2%FCS zugegeben, die Lösung zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um überschüssige, nicht gebundene Ak zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit 100µl PBS/2%FCS resuspendiert. (Im Folgenden wird dieser Vorgang als „Waschvorgang“ beschrieben).

Dann wurden je 1µl der direkt markierten Ak (CD24 FITC, CD44 PE, CD133 APC) nach oben genanntem Schema in die jeweiligen Gefäße pipettiert. Gleichzeitig wurde den mit cMet markierten Zellen 1µl des sekundären Aks, Alexa Fluor goat anti-rabbit 555, der vorher im Verhältnis 1:5 in PBS gelöst worden war, zugegeben. Alle Gefäße wurden 15 min inkubiert.

Es folgten zwei Waschvorgänge mit PBS/2%FCS. Abschließend wurde zur Fixierung der Färbung 200µl PBS/2%FCS und 200µl PBS/2%PFA in jedes Eppendorfggefäß zugegeben und die Zellen bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.5. FACS

Im Gegensatz zur Durchflußzytometrie, werden beim FACS die fluoreszenzmarkierten Zellen nicht nur abhängig von einem Merkmal analysiert, sondern nach eben diesem in eine positive und eine negative Population aufgespalten. Somit entstehen, abhängig von der Markierung, zwei Zellpopulation die sich in diesem einen Merkmal unterscheiden. Diese können dann für weitere Versuche verwendet werden.

Um die große, für das FACS und die folgenden Versuche benötigte Zellzahl (ca. 10^8 Zellen) zu erreichen, wurde die jeweilige Zelllinie, einige Tage vor dem Versuch, in mehrere 175 cm² Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden, wie für die Durchflußzytometrie beschrieben (vgl. 2.2.4), für die Färbung vorbereitet und die Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt.

Aus der Zellsuspension mit ca. 10^8 Zellen wurden drei Proben mit jeweils 5×10^5 Zellen abgenommen, die zum Einstellen des FACS-Gerätes benötigt wurden.

Folgende Arbeitsschritte wurden alle auf Eis und alle Inkubationszeiten im Dunkeln durchgeführt.

Die Eppendorfggefäße mit 5×10^5 Zellen wurden mit 100µl PBS/2%FCS resuspendiert und folgendermaßen gefärbt (je 1µl des jeweiligen Ak pro Eppendorfggefäß):

- keine Färbung
- Isotypkontrolle PE Rat Isotype Control bzw.
Mucin 2 + Alexa Fluor 555
- Ak Anti-CD133-1-PE bzw.
Met(C-28) + Alexa Fluor 555

Die restlichen ca. 10^8 Zellen wurden mit 15µl Anti-CD133-1-PE bzw. Met (C-28) + Alexa Fluor 555 gefärbt. CD133 konnte dabei in einem Schritt gefärbt werden, da der Ak direkt markiert ist. Die cMet-Färbung erfolgte in zwei Schritten, mit einem Waschvorgang (vgl. 2.2.4) zwischen den Inkubationszeiten des Primär- und Sekundär-Ak. Die Inkubationszeit pro Färbeschritt betrug 20 min. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS/2%FCS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 300µl (Eppendorfggefäße) bzw. 2ml (gesamte Restzellmenge) PBS/2%FCS resuspendiert und vereinzelt.

Der FACS der Zelllinien wurde in Kooperation mit Dr. M. Schiemann und K. Götsch durchgeführt.

Es resultierten für das jeweilige Merkmal, CD133 bzw. cMet, eine positive und eine negative Population (CD133^{+/+} bzw. cMet^{+/+}). Für die folgenden Versuche wurden die Zellen sofort nach dem FACS abgeholt und für die weitere Verwendung aufbereitet.

2.2.6. Subkutane Transplantation von Tumorzellen

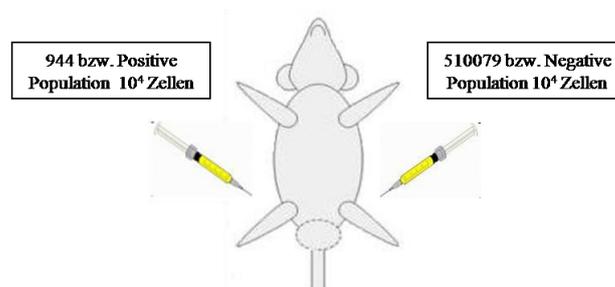
Die subkutane Transplantation (s.c.-Transplantation) stellt eine unkomplizierte Version eines *in vivo* Versuchs mit Tumorzellinjektion dar. Die subkutane Injektion (s.c.-Injektion) an verschiedenen Stellen

eines Tieres ermöglicht den Vergleich unterschiedlicher Proben im selben Milieu. Die Beobachtung, Beurteilung und Gewinnung der subkutanen Tumoren (s.c.-Tumoren) im Verlauf gestaltet sich bei dieser Methode sehr einfach.

Für die s.c.-Transplantation wurden ausschließlich die Linien 944 und 510079 verwendet. Zunächst wurden die beiden Zelllinien unsortiert injiziert. Mit der Auswertung dieser ersten Versuchsreihe entstanden Kontroll- und Vergleichsdaten für nachfolgende *in vivo* Versuche. Für diese wurden die, mit Hilfe von FACS aufgetrennten, CD133^{+/-} bzw. cMet^{+/-} Populationen verwendet.

Die zu transplantierenden Populationen wurden nach dem Passagieren bzw. nach FACS zwei Mal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die Zahl der zu injizierenden Zellen wurde auf 10⁵ Zellen/ml PBS/2% FCS eingestellt.

Abbildung 2.1: Schema s.c.-Transplantation



Bei den s.c.-Transplantationen wurde den Mäusen jeweils rechts die Linie 944 bzw. die positive Population und links die Linie 510079 bzw. die negative Population gespritzt.

Für die s.c.-Transplantation wurden die Nacktmäuse mit Isofluran narkotisiert. Die Zellsuspension wurde in 1ml Spritzen aufgezogen und 100µl (10⁴ Tumorzellen) subkutan in die jeweils linke oder rechte Flanke der Mäuse injiziert. Dabei wurde die Linie 944 jeweils in die rechte und die Linie 510079 jeweils in die linke Flanke der Mäuse gespritzt. Bei den Injektionen nach FACS-Versuch wurde stets die positive Population in die rechte und die negative in die linke Flanke gespritzt.

Die Mäuse wurden ab dem Zeitpunkt der Transplantation zwei Mal pro Woche auf Tumorwachstum oder Veränderung des Allgemeinzustandes kontrolliert.

2.2.7. Orthotope Transplantation von Tumorzellen

Die orthotope, d.h. für murine Pankreaskarzinomzellen eine intrapankreatische Transplantation, stellt im Vergleich zur s.c.-Injektion im Bezug auf Zellinjektion, Tumorkontrolle und -gewinnung ein komplizierteres Versuchsmodell dar. Ein weiterer Nachteil, im Vergleich zur s.c.-Transplantation ist, dass es nicht möglich ist, verschiedene Populationen zum direkten Vergleich in ein Tier zu transplantieren. Allerdings bietet es den injizierten Tumorzellen ein Mikromilieu, welches dem des Originaltumors sehr ähnlich ist.

Zur Kontrolle der Methode und zur Schaffung von Vergleichsdaten, wurde zunächst die Linie 510079 unsortiert transplantiert. Die im Folgenden verwendete CD133^{+/+} bzw. cMet^{+/+} Population wurde mit FACS gewonnen (vgl. 2.2.5). Die Zellzahl der Zellsuspensionen wurde für die Transplantation auf 10⁶ Zellen/ml PBS/2% FCS eingestellt. Die Zellen wurden für den Zeitraum der Vorbereitung auf Eis gelagert und kurz vor der Transplantation auf Raumtemperatur (RT) erwärmt.

Die für die Versuche verwendeten Nacktmäuse (Swiss Nu/Nu) wurden 15 min vor der orthotopen Transplantation mit 100µl eines intraperitoneal gespritzten Narkosemittelgemisches aus Midazolam, Medetomidin und Fentanyl (MMF) betäubt. Die Operationen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Zu Beginn der Operation wurde mit einer Schere links subkostal ein ca. 5 mm langer Schnitt gemacht. Unter Sicht wurde das Peritoneum stumpf mit einer Pinzette freipräpariert und im Anschluss mit einer Schere durchtrennt. Die Milz wurde dann mit einer Pinzette nach extraperitoneal luxiert. Aufgrund der anatomischen Verbindungen lag das Pankreas nun an der Oberfläche. Zur Zelltransplantation wurden, mit einer Hamilton Spritze, 10µl der jeweiligen Zellsuspension (10⁴ Tumorzellen) möglichst zentral in das Pankreas gespritzt. Als Nachweis der intrapankreatischen Injektion kam eine flüssigkeitsgefüllte Blase zum Vorschein.

Zum Abschluss wurde die Milz mit dem Pankreas vorsichtig reponiert, das Peritoneum vernäht und die Haut geklammert. Zur Analgesie und zum Ausgleich des Flüssigkeitshaushalts wurde den Mäusen 200µl von 1µg Metacam /10µl NaCl subkutan, und zur Antagonisierung der Narkose 90µl Atipamezol, Flumazenil und Naloxon (AFN) intraperitoneal gespritzt. Bis die Mäuse wieder wach waren und sich selbstständig bewegten, wurden sie auf ihren Zustand hin beobachtet und mit einer Wärmelampe das Auskühlen der Tiere verhindert.

Die Klammern wurden eine Woche nach OP, direkt vor der ersten Luziferinmessung (vgl. 2.2.8), in MMF-Narkose entfernt.

2.2.8. Luziferinmessung der orthotop transplantierten Mäuse

Das Tumorwachstum nach orthotoper Transplantation ist bei lebenden Mäusen schlecht zu beurteilen. Deswegen wurden in diesem Fall nur Zellen der Linie 510079 transplantiert. Da diese Tumorzellen aus einer Maus mit dem Genotyp *p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; Tgfa; PCNA^{+/LSL-fluc}* stammten, exprimierten diese Luziferase unter Kontrolle des Proliferationsgens PCNA (Saur et al., in Vorbereitung). Nach intraperitonealer Applikation von Luziferin kam es zu einer Luziferin-Luziferase-Reaktion. Dabei entstand, unter Verbrauch von ATP, neben Oxyluziferin auch Licht. Dieses Licht konnte mit einer „Charge-coupled Device“(CCD)-Kamera, die lichtempfindliche Sensoren enthält, gemessen werden. Somit war ein Rückschluss auf eine Tumorzellvermehrung *in vivo* möglich und der Wachstumsverlauf der orthotop induzierten Tumoren konnte in den weiterhin lebendigen Mäusen verfolgt werden.

Die orthotop transplantierten Mäuse wurden ab einer Woche nach der Transplantation regelmäßig mit der CCD-Kamera gemessen. Für die Messung wurde den Mäusen 100µl MMF mit 300µl Luziferin intraperitoneal gespritzt. 10 min nach Injektion, somit nach Beginn der Narkose und Aufnahme des

Luziferins in die Zellen, wurde das Signal der sich vermehrenden Tumorzellen aufgenommen. Nach der Messung wurde die Narkose mit 90µl AFN antagonisiert.

2.2.9. Tumorpräparation

Ab dem Zeitpunkt der subkutanen bzw. orthotopen Tumorzelltransplantation wurden die Mäuse regelmäßig bezüglich ihres gesundheitlichen Zustandes kontrolliert und das Tumorstadium mit Hilfe einer Schublehre bzw. der CCD-Kamera Aufnahmen (vgl. 2.2.8) bestimmt und dokumentiert.

Wenn die Größe der s.c.-Tumoren mehr als 1cm betrug bzw. bei gesundheitlicher Beeinträchtigung der Tiere, wurden diese mit Isofluran narkotisiert und getötet.

Die makroskopische Erscheinung der Tumoren wurde fotografiert und dokumentiert. Die Tumorstadiumgröße der s.c.-Tumoren wurde in zwei Achsen mit einer Schublehre gemessen und festgehalten. Im Fall der orthotopen Transplantation konnte die Tumorstadiumgröße aufgrund des umgebenden Restpankreas nur grob bestimmt werden.

Bei den Tieren mit s.c.-Tumoren wurde in der Regel, nach Untersuchung der Bauch- und Brustorgane auf maligne Veränderungen, nur das Tumorgewebe entnommen. Nach orthotoper Transplantation wurde neben dem intrapankreatischen Tumor auch Teile des Pankreas, der Milz, der Leber, des Darms und der Lunge gewonnen, um diese auf Tumorstadiumabsiedlungen zu untersuchen. Die Tumoren bzw. Organe wurden zur Gewinnung mit Hilfe von Pinzette und Schere präpariert.

Ein Teil des gewonnenen Gewebes wurde sofort in Tissue Tek gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um dann bei -80°C gelagert zu werden. Der andere Teil wurde in dafür gefertigte Plastikkassetten gegeben und über Nacht bei 4°C in 4%iges PFA eingelegt. Diese Kassetten wurden am nächsten Tag zur Weiterverarbeitung an die Pathologie des Klinikum rechts der Isar München, TU München übergeben und nach Entwässerung in Paraffinblöcke gegossen.

2.2.10. Histologie

Für folgende Versuche wurden 3µm dicke Paraffin-Schnitte des gewonnenen Gewebes benötigt. Diese wurden an einem Microtom angefertigt. Direkt nach dem Schneiden wurden die Schnitte kurz in ein 50°C warmes Wasserbad gegeben und aus dem Wasser auf Objektträger aufgenommen. Anschließend wurden sie bei RT getrocknet. Sowohl die Paraffin-Blöcke als auch die -Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei RT aufbewahrt.

Für die Färbung mit dem Ak CD133 wurden 4µm dicke Schnitte der in Tissue Tek Zylindern kryokonservierten Gewebestücke verwendet. Dafür wurden die Zylinder auf Metallplättchen fixiert und bei ca. -20°C am Cryostat Mikrotom Schnitte angefertigt. Diese wurden direkt auf Objektträger aufgenommen, bei RT ca. 1h getrocknet, dann mit Aceton 100% (1 min; RT) fixiert und schließlich bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.11. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Um einen Überblick über die Morphologie der Ursprungs-, der s.c.- und orthotopen Tumoren zu bekommen, wurden HE-Färbungen angefertigt.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt (Routine Pathologie, MRI):

- | | |
|---|------------|
| • HistoClear/ Xylol | 2x5 min |
| • Absteigende Alkoholreihe (100%, 96%,70%) | je 2x2 min |
| • Hämalaun nach Mayer (unverdünnt) | 7.5 min |
| • Waschen unter fließendem Leitungswasser | 10 min |
| • Ethanolisches Eosin 0.33%
(Stammlösung 1,7% 1:5 mit 96% Ethanol) | 5 min |
| • 96% Ethanol | 25 s |
| • Isopropanol | 25 s |
| • HistoClear | 1.5 min |

Im Anschluss wurde auf die abgetropften Objektträger ein Tropfen Pertex gegeben und ein Deckglas über dem Gewebestück fixiert.

2.2.12. Immunhistochemie

Zum Nachweis und zur Bestimmung der Lokalisation von Rezeptoren auf oder in der Zelle wurden immunhistochemische Färbungen verwendet. Auch für die Immunhistochemie (ICH) wurden Paraffin-Schnitte verwendet.

Die immunhistochemische Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt (verwendete Ak: vgl. Tabelle 2.1):

- Entparaffinieren der Schnitte in HistoClear und absteigender Alkoholreihe (vgl. HE-Färbung 2.2.11)
- Kochen der Schnitte in „Antigen unmasking solution“ in der Mikrowelle (10 min; 600 Watt)
- Abkühlen der Schnitte in der Lösung (20 min; RT)
- Waschen unter fließendem Leitungswasser (5 min)
- Hemmung der endogenen Peroxidase durch H₂O₂-Blockierung (30% H₂O₂ 1:10 in Aqua dest.) (10 min; RT)
- Waschen unter fließendem Leitungswasser (5 min)
- Blockieren der gewebsspezifischen Ak mit 10%iger Normalserum (NS/PBS Lösung) mit 4 Tropfen Avidin/ml (15 min; RT) (verwendetes Serum abhängig vom primären AK)
- Inkubation mit dem Primär-Ak (gelöst in 5%iger NS/PBS Lösung mit 4 Tropfen Biotin/ml; Lösungsverhältnis siehe Tabelle 2.1) (2 h; RT)
- Waschen in PBS (2x5 min)
- Inkubation mit dem entsprechenden Sekundär-Ak (1:250 in 5%iger NS/PBS Lösung) (30 min; RT);
- Vorbereitung ABC Lösung (2.5ml PBS + 1Tr. A Reagenz + 1 Tr. B Reagenz; 30 min; 4°C)
- Waschen in PBS (2x5 min)
- Inkubation mit ABC Lösung (30 min; RT)
- Waschen in PBS (2x5 min)
- Inkubation mit DAB Lösung (2.5ml H₂O + 1 Tr. Buffer stock + 1 Tr. DAB + 1 Tr. H₂O₂; 1-4 min [abh. vom Primär- Ak]; RT)
- Waschen unter fließendem Leitungswasser (5 min)
- Eintauchen der Schnitte in Hämatoxylin zur Gegenfärbung (10 s)

- Waschen unter fließendem Leitungswasser (10 min)
- Durchlaufen der aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% je 2x2 min) und HistoClear (2x5 min)
- Eindecken der Schnitte mit Pertex und einem Deckglas

2.2.13. Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz (IF) werden mit Hilfe eines Ak, in Verbindung mit einem fluoreszierenden Sekundär-Ak, bestimmte Rezeptoren markiert und damit unter dem Fluoreszenzmikroskop als leuchtende Zellbestandteile sichtbar.

Für die IF-Färbungen wurden Paraffin-Schnitte verwendet. Nur für den Ak CD133 mussten Kryo-Schnitte benutzt werden. Außerdem wurden mit Hilfe der IF-Färbung Zellen der Linie 944 und 510079 unsortiert bzw. die aufgetrennten und wieder ausgesäten Populationen nach FACS mit CD133 und cMet gefärbt.

Die Kryo-Schnitte bedurften keiner weiteren Aufbereitung für die IF-Färbung.

Die zu färbenden Paraffin-Schnitte wurden, wie für die IHC beschrieben (vgl. 2.2.12), entparaffiniert und gekocht.

Zur Vorbereitung der zu färbenden Zellen wurden, 24h vor der Färbung, je 10^3 Zellen in die Kammern von 4-Kammer-Slides ausgesät und in 1ml Kulturmedium kultiviert (vgl. 2.2.1). Direkt vor der Färbung wurden die adhären Zellen mit PBS gewaschen.

Folgendes Protokoll wurde nach entsprechender Vorbereitung für die IF-Färbung von Kryo- und Paraffin-Schnitten und Zellen verwendet (alle Inkubationszeiten und Waschvorgänge wurden im Dunkeln durchgeführt):

- Inkubation mit 10%iger NS/PBS Lösung zur Verminderung unspezifischer Hintergrundfärbung (15min)
- Auftropfen des Primär-Ak (gelöst in 5%iger NS/PBS Lösung; Lösungsverhältnis siehe Tabelle 2.1) (1 h; RT)
- Waschen in PBS (2x5 min)
- Inkubation mit dem jeweiligen Sekundär-Ak 1:500 in 5%NS/PBS (1 h; RT)
- Waschen in PBS (2x5 min)
- Auftropfen von einem Tropfen Vectashield mit DAPI und anschließende Abdeckung mit Deckglas

2.2.14. Statistische Auswertung

Korrelationen zwischen den verschiedenen Gruppen wurde mit Hilfe des studentischen T-Tests berechnet. Dafür wurde die Software Graph Pad Prism 4 verwendet. $p < 0.05$ wurde hierbei als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

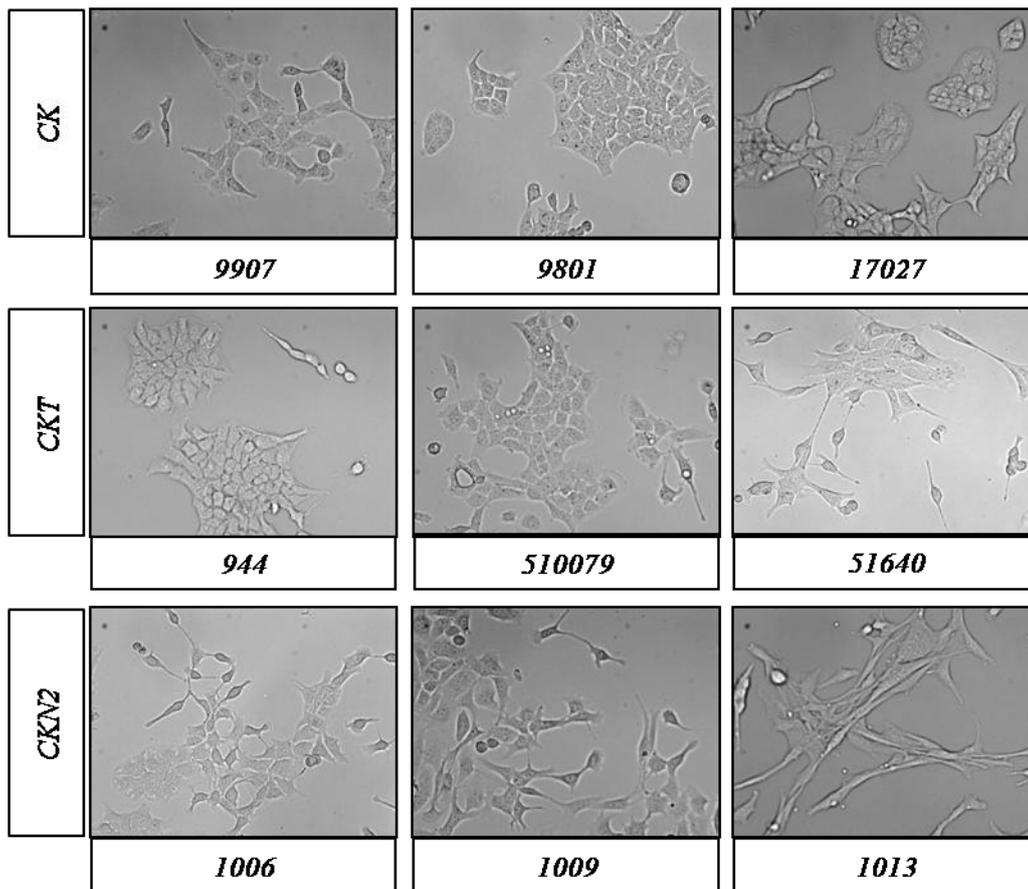
3.1. Zelllinienanalyse

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde eine Auswahl aus den zahlreich zu Verfügung stehenden murinen Tumorzelllinien getroffen. Die zwölf verwendeten Zelllinien (vgl. Tabelle 2.1Tabelle 2.2) stammen alle aus murinen Pankreaskarzinomen der Genotypen $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}$ (CK), $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; Tgfa(;$ $PCNA^{+/LSL-fluc}$) (CKT) und $p48^{+/Cre}; Kras^{+/G12D}; N2ko$ (CKN2). Berücksichtigt wurde eine gleichmäßige Verteilung der Genotypen. Um mehr über die Eigenschaften der einzelnen Linien und der verschiedenen Genotypen herauszufinden wurden die ausgewählten Linien zu Beginn hinsichtlich Morphologie (vgl. 3.1.1), Wachstumsrate (vgl. 3.1.2) und Markerexpression (vgl. 3.1.3) analysiert. Unter anderem auf der Basis dieser Ergebnisse wurde die Entscheidung getroffen welche Zelllinien für die *in vivo* Versuche verwendet werden sollten.

3.1.1. Morphologie

Zunächst wurden die Zellen morphologisch beurteilt. Elf von zwölf Linien, unabhängig vom Genotyp, zeigten, bei niedriger Dichte, sternförmig Zellen mit langgezogenen Ausstülpungen, die zur Kontaktaufnahme zwischen den Zellen dienten. Mit ansteigender Konfluenz bildeten sich die Ausstülpungen zurück, die nun rundlichen Zellen wuchsen zu zunehmend großen Inseln zusammen, bis sie letztendlich einen geschlossenen Zellrasen formten. Es zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich der Morphologie der einzelnen Linien oder bei Gegenüberstellung der verschiedenen Genotypengruppen. Die einzige Ausnahme in der morphologischen Erscheinung stellte die Zelllinie 1013 (CKN2) dar. Sie zeichnete sich durch längliche, quervernetzte Zellen aus, die auch bei hoher Konfluenz ihre gestreckte Form und ihr netzartig überlappendes Wachstum beibehielten (siehe Abbildung 3.1).

Abbildung 3.1: Morphologie einer Auswahl der verwendeten Zelllinien



Darstellung von je drei Tumorzelllinien der Genotypen CK, CKT und CKN2. Man erkennt die einzelnen sternförmigen Zellen mit länglichen Ausstülpungen, die bei höherer Konfluenz zu Inseln mit rundlichen Zellen zusammenwachsen. Einzige Ausnahme stellt die 1013 (CKN2) mit ihren netzartig verknüpften, länglichen Zellen dar, die auch bei hoher Konfluenz ihre Form behalten.

200 fache Vergrößerung

3.1.2. Wachstumsanalyse

Zusätzlich wurden die Wachstumsrate der zwölf Tumorzelllinien bestimmt. Die Linien zeigten eine 3,0-7,1 fache Vermehrung innerhalb von 48h (siehe Tabelle 3.1). Im Vergleich der Genotypengruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied der Wachstumsrate. Es ließ sich allerdings eine Tendenz dahin erkennen, dass Zelllinien mit dem Genotyp CKN2 am schnellsten gewachsen waren (Mittelwert/48h: 4,86), gefolgt von den Linien mit Genotyp CK (Mittelwert/48h: 3,9). Die Linien der CKT Mäuse vermehrten sich mit einer mittleren Wachstumsrate/48h von 3,2 am langsamsten.

Tabelle 3.1: Wachstumsrate der verwendeten Zelllinien

	Zelllinie	Wachstum/48h	Mittelwert/48h	
$Kras^{G12D}$	2190	3,0	3,9	$Kras^{G12D}$
	9801	3,5		
	9907	3,2		
	17027	6,1		
$Kras^{G12D};Tgfa$			3,2	$Kras^{G12D};Tgfa$
	944	4,4		
	51640	2,4		
	510079	2,9		
$Kras^{G12D};N2ko$	1006	5,6	4,86	$Kras^{G12D};N2ko$
	1009	5,2		
	1013	3,0		
	3113	7,1		
	5112	3,6		

Wachstumsrate der einzelnen Zelllinien pro 48h und der Mittelwert der Wachstumsrate der Genotypengruppen. Es zeigt sich eine Tendenz dahin, dass die Zellen der CKN2-Mäuse am schnellsten wachsen, gefolgt von den Zellen der CK- und schließlich der CKT-Mäuse.

3.1.3. Durchflusszytometrische Analyse

Zur Charakterisierung der Oberflächenmarkerexpression der Zelllinien, wurden diese durchflusszytometrisch analysiert. Getestet wurden Marker, welche im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom als potentielle TSZ-Marker gelten: CD24, CD44, CD133 und cMet.

CD24 und CD44 wurden in fast allen Zelllinien von nahezu 100% der Zellen exprimiert. Ausnahmen stellten sowohl die 1013 als auch die 3113 dar. Die Expression von CD24 war bei der Linie 1013 niedrig (1,3%). Bei der 3113 ließ sich keine konstante Expression von CD24 sondern im Passageverlauf ein stetiger Anstieg der für CD24 positiven Fraktion erkennen (45-99%).

Bei der Expression des Oberflächenmarkers CD133 zeigten sich im Vergleich der Zelllinien starke Unterschiede. Es gab sowohl Zelllinien, in denen CD133 sehr gering exprimiert war (z.B. 2190: keine Expression), als auch Linien die sich durch eine sehr hohe Expression des Markers auszeichneten (z.B. 510079: CD133⁺ 85%). cMet war einheitlich sehr niedrig exprimiert (0,5-7%).

Insgesamt ließ sich keine Abhängigkeit des Expressionsmusters der getesteten Marker vom Genotyp feststellen (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien

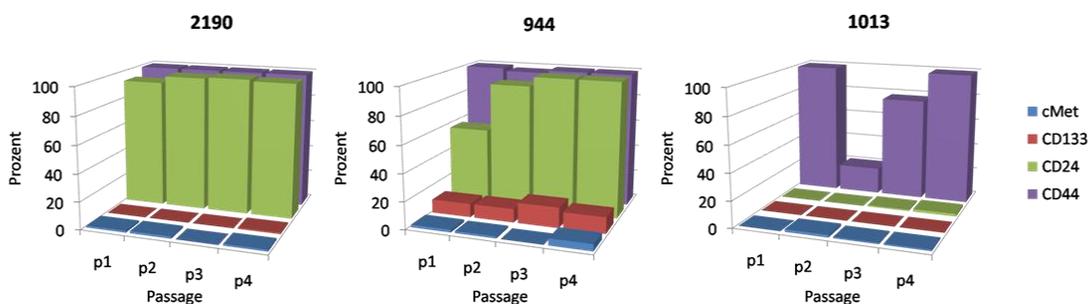
	Zelllinie	CD24	CD44	CD133	cMet	
<i>Kras^{G12D}</i>	2190	>99	96,0	0,0	1,5	<i>Kras^{G12D}</i>
	9801	>99	85,0	25,5	1,7	
	9907	>99	93,0	21,0	7,0	
	17027	>99	58,0	20,5	2,0	
<i>Kras^{G12D};Tgfa</i>	944	>99	87,0	11,8	2,5	<i>Kras^{G12D};Tgfa</i>
	51640	>99	93,0	3,7	1,2	
	510079	>99	>99	85,0	2,7	
<i>Kras^{G12D};N2ko</i>	1006	>99	98,5	0,5	1,3	<i>Kras^{G12D};N2ko</i>
	1009	>99	89,5	3,0	0,0	
	1013	1,3	92,0	0,5	1,1	
	3113	45-99	>99	22,0	3,7	
	5112	>99	98,0	13,7	2,0	

Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse der Zelllinien in Abhängigkeit der potentiellen TSZ-Marker CD24, CD44, CD133 und cMet. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Zelllinienfraktionen die jeweils für den getesteten Ak positiv sind. CD24 und CD44 werden von fast allen Zelllinien zu fast 100% exprimiert. Die Expression von CD133 unterliegt starken Schwankungen. cMet ist durchweg niedrig exprimiert.

Angaben der positiven Fraktionen in Prozent

Die Analyse der einzelnen Linien wurde im Passageverlauf mehrfach wiederholt. Die für die verschiedenen Marker positiven Fraktionen blieben innerhalb der jeweiligen Zelllinie in der Regel im Passageverlauf konstant (siehe Abbildung 3.2).

Abbildung 3.2: Markerstabilität im Passageverlauf



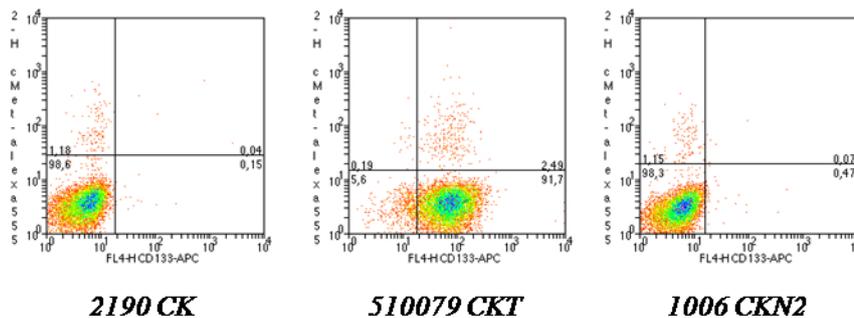
Gezeigt ist die Markerexpression von CD24, CD44, CD133 und cMet im Passageverlauf von je einer CK- (2190) einer CKT- (944) und einer CKN2- (1013) Linie. Bei diesen Linien ist die Expression der getesteten Marker im Verlauf stabil.

3. Ergebnisse

So war die Verwendung dieser Zelllinien für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche unabhängig von der jeweiligen Passage möglich.

Bei der Auswertung ergab sich außerdem, dass die cMet⁺ Zellfraktionen in der Regel kein CD133 exprimierten. Nur die cMet⁺ Population der Linie 510079 zeichnete sich dadurch aus, dass diese Zellen auch für CD133 positiv waren (siehe Abbildung 3.3).

Abbildung 3.3: Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse für CD133 und cMet



Gezeigt sind die Linien 2190 (CK), 510079 (CKT) und 1006 (CKN2) im Bezug auf die Marker cMet (vertikale Achse) und CD133 (horizontale Achse). Man kann erkennen, dass bei den Linien 2190 und 1006, als Beispiel für die Regel, die cMet⁺ Zellen für CD133 negativ sind. Im Gegensatz dazu kann man bei der Linie 510079 im rechten oberen Quadranten deutlich sehen, dass die cMet⁺ Zellen auch für CD133 positiv sind.

Aufgrund der Informationen, die durch die Zelllinienanalyse gewonnen werden konnten, wurden die Linien 944 und 510079 für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche ausgewählt.

Die Entscheidung zur Verwendung dieser beiden Linien und ihrer Kombination fiel aufgrund mehrerer Faktoren. Beide Linien stammten aus Mäusen des gleichen Genotyps CKT. Die Eigenschaften der Mäuse und der Pankreaskarzinome dieses Genotyps waren schon ausführlich beschrieben worden (Siveke et al. 2007). Des Weiteren zeigten die Linien ähnliche Charakteristika *in vitro* (vgl. Abbildung 3.1; Tabelle 3.1). Schließlich hatten beide Linien eine gleichsam niedrige Expression von cMet (944: 2,5%; 510079: 1,2%).

Die bei beiden vorhandene, aber unterschiedlich hohe Expression von CD133 (Mittelwert der durchflusszytometrischen Analyse: 944: 12%; 510079: 85%) (vgl. Tabelle 3.2) bot eventuell die Möglichkeit die Rolle von CD133 besser zu verstehen und die Auswirkungen unterschiedlich hoher Markerexpression an der Zelloberfläche aufzuzeigen.

Zusätzlich war die Expression von Luziferase der Linie 510079 ein großer Vorteil zur nicht invasiven Kontrolle des Tumorwachstums im *in vivo* Versuchsverlauf.

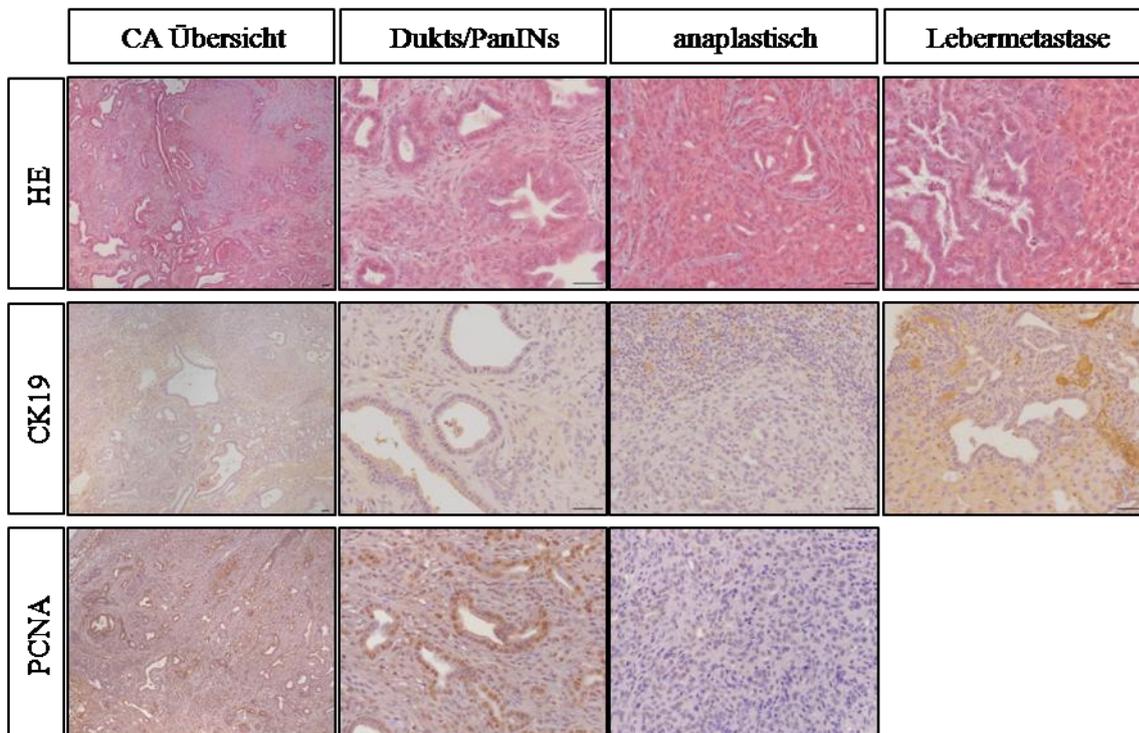
Damit stellten die Linien 944 und 510079 und deren Pankreaskarzinome gut beschriebene murine Zelllinien bzw. Tumoren für die folgenden Versuche dar, welche sowohl mit den unsortierten als auch jeweils mit der für CD133 bzw. cMet positiven und negativen Population (CD133^{+/+} bzw. cMet^{+/+}) durchgeführt werden sollten.

3.2. Charakterisierung der Ursprungstumoren

3.2.1. Die Maus 944

Die *CKT*-Maus 944 starb an den Folgen eines Pankreaskarzinoms. In der mikroskopischen Analyse ließ sich ein Tumor feststellen, der sich überwiegend durch duktale bis zystische Strukturen und PanINs aller Stadien auszeichnete. Auch anaplastische Bereiche waren zu sehen. Entgegen des meist gesehenen Phänotyps der *CKT*-Mäuse waren keine IPMNs zu finden. Normales Pankreasgewebe ließ sich, zumindest im untersuchten Bereich, nicht mehr identifizieren. In der Leber waren klar Metastasen abzugrenzen. Sie zeigten eine duktale Struktur, wie sie vergleichbar auch innerhalb des Ursprungstumors zu finden waren (siehe Abbildung 3.4 HE).

Abbildung 3.4: Ursprungstumor der Maus 944



In der HE Färbung erkennt man, neben anaplastischen Bereichen, die überwiegend duktale Tumorstruktur mit PanINs verschiedener Stadien. Die Metastase in der Leber spiegelt die duktale Struktur des Ursprungstumors wieder. Durch die membranäre Expression von CK19 werden die dukталen Bereiche des Tumors hervorgehoben. Dieses Expressionsmuster zeigt sich auch in der dargestellten Lebermetastase. Die positive nukleäre PCNA Färbung der Zellen der dukталen Strukturen weist auf eine hohe Vermehrungsrate dieser Bereiche hin.

Maßbalken 50µm

Nach Färbung mit CK19, ein Rezeptor der von Zellen der dukталen Strukturen des Pankreas exprimiert wird, konnte man, vorwiegend apikal, eine membranäre Expression des Markers auf den Zellen innerhalb dukталer Strukturen und PanINs erkennen. In den Azini wurde CK19 kaum und wenn, dann in

Zellgruppen exprimiert. Dies war möglicherweise ein Hinweis auf strukturelle Veränderungen innerhalb des neoplastischen Gewebes. In den anaplastischen Bereichen ließ sich keine Expression von CK19 erkennen. In den Lebermetastasen zeigte sich eine Expression von CK19 nach ähnlichem Muster wie für den Ursprungstumor beschrieben (siehe. Abbildung 3.4 CK19).

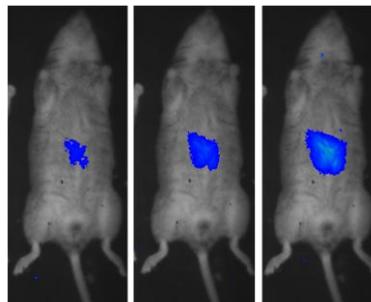
Um das Wachstum und eventuelle Wachstumsunterschiede verschiedener Bereiche bzw. im Vergleich zu anderen Karzinomen zu analysieren, wurde das Tumorgewebe mit PCNA gefärbt. PCNA ist ein nukleär exprimiertes Protein, welches in der DNA-Synthese eine wichtige Rolle spielt und damit als Marker für Zellvermehrung verwendet werden kann. Die duktaalen Bereiche des Tumors zeigten die höchste Expression von PCNA und wiesen somit auf eine erhöhte Proliferationsrate dieser Tumorstrukturen hin. Innerhalb des Tumors ergaben sich starke Differenzen in der Expression von PCNA. Eine Ursache für diese Variabilität war anhand der Verteilung der für PCNA positiven Zellen und Strukturen nicht auszumachen (siehe Abbildung 3.4 PCNA).

3.2.2. Die Maus 510079

Die *CKT*-Maus 510079 zeichnete sich zusätzlich durch ein Luziferase-Gen im PCNA Lokus aus ($p48^{+/Cre};Kras^{+/G12D};Tgfa;PCNA^{+/LSL-fluc}$) (Maus generiert und zu Verfügung gestellt von PD Dr. Saur). Im Entstehungsverlauf wurde das Wachstum des Pankreaskarzinoms mit einer CCD-Kamera nach intraperitonealer Injektion von Luziferin verfolgt (siehe Abbildung 3.5; vgl. 2.2.8). Die Maus wurde, nachdem sie durch einen schlechten Allgemeinzustand und Aszites auffällig geworden war, getötet.

Das Pankreaskarzinom der Maus 510079 bestand zum größten Teil aus IPMNs. Dies ist typisch für den *CKT*-Genotyp und steht im Gegensatz zu dem der Maus 944. Dazu ließen sich, neben normalem Pankreasgewebe, kleine Bereiche mit PanINs aller Stadien, Zysten und anaplastischen Karzinombereichen mit duktaalen Strukturen finden. Auch bei dieser Maus zeigten sich Metastasen, hier allerdings in der Lunge (siehe Abbildung 3.6 HE).

Abbildung 3.5: Progressive Pankreaskarzinomentwicklung der Maus 510079



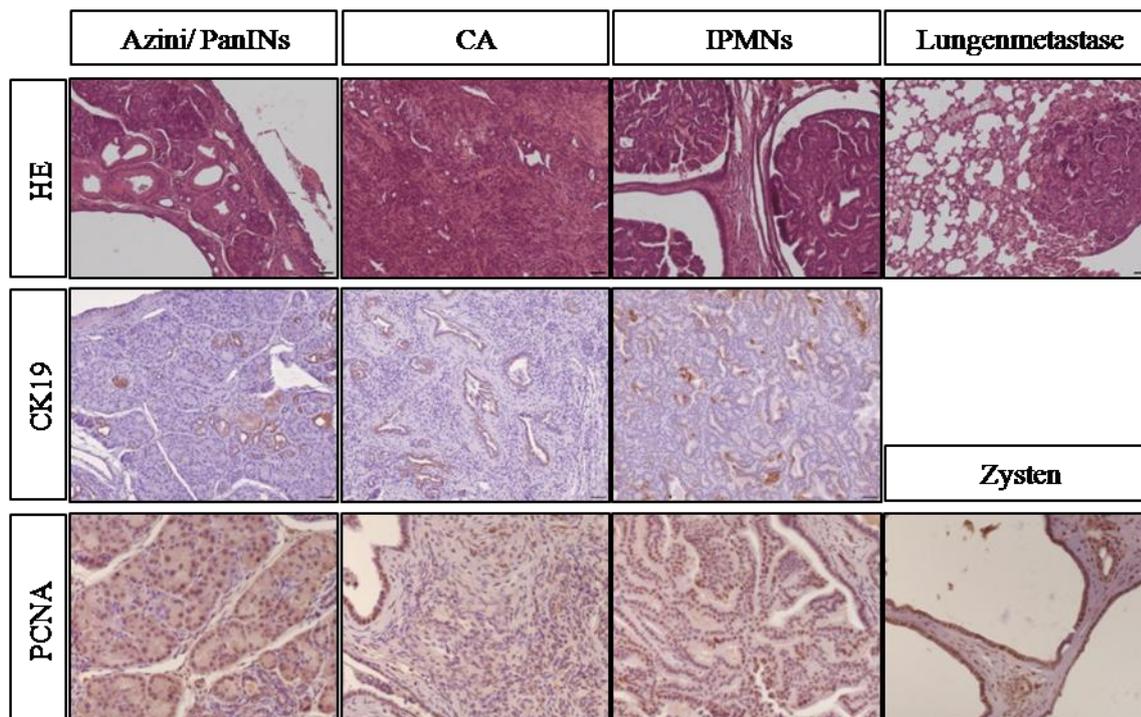
Verlaufskontrolle der Karzinomentwicklung mit Hilfe einer CCD-Kamera nach jeweiliger intraperitonealer Luziferininjektion.

In der CK19 Färbung waren IPMNs sowie Azini und anaplastische Bereiche überwiegend negativ. Einzelne azinäre Strukturen waren für CK19 positiv. Eventuell ein Hinweis auf ablaufende strukturelle

Veränderungen innerhalb des Tumors. Duktale Strukturen zeigten wie erwartet eine positive Expression des Markers (siehe Abbildung 3.6 CK19).

Zur Analyse der Zellvermehrungsrate wurde der Tumor mit PCNA gefärbt. Innerhalb der Azini und anaplastischen Bereiche zeigten sich nur einzelne positive Kerne. Im Kontrast dazu zeichneten sich die duktaalen Bereiche durch starke Expression des Markers in fast allen beteiligten Zellen aus, was auf eine gesteigerte Zellvermehrung in diesen Bereichen hinwies. Auch die IPMNs, als potentielle Vorstufe eines Karzinoms, zeigten eine erhöhte Expression des Markers (siehe Abbildung 3.6 PCNA).

Abbildung 3.6: Ursprungstumor der Maus 510079



In der HE Färbung zeigen sich die verschiedenen Bereiche des Pankreas und der malignen Veränderungen: Azini, PanINs, IPMNs, anaplastische Bereiche und Lungenmetastasen. CK19 färbt die duktaalen Strukturen des Gewebes. Eine positive, nukleäre Färbung mit PCNA zeigt sich v.a. innerhalb der duktaalen Bereich aber auch innerhalb der IPMNs.

Maßbalken entspricht 50µm

3.3. Subkutane Transplantation

Im Anschluss an die Analyse der Ursprungstumoren der Mäuse 944 und 510079 wurden deren Tumorzelllinien unsortiert in Nacktmäuse transplantiert. So konnten Referenzwerte für die späteren *in vivo* Versuche mit der für CD133 bzw cMet positiven und negativen Population nach FACS ermittelt werden.

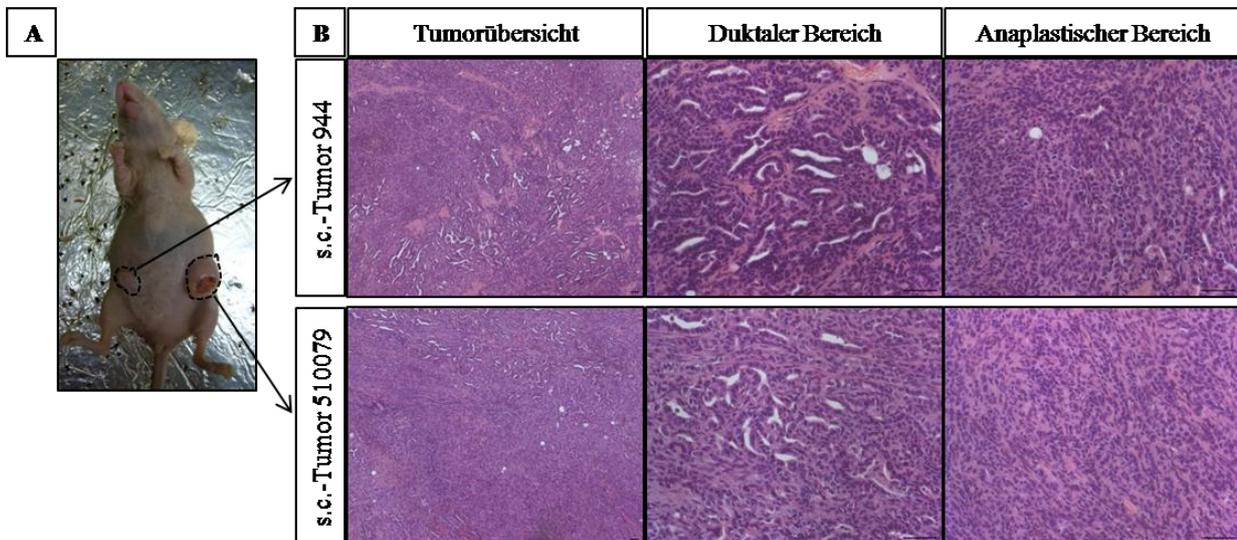
Zu Beginn wurden die Linien 944 und 510079 unsortiert subkutan in die Flanken von Nacktmäusen gespritzt (vgl. 2.2.6). Bei den regelmäßigen Kontrollen konnte man bei den Zellen der Linie 510079

erstmal nach 7 Tagen und bei denen der Linie 944 nach 14 Tagen eine subkutane Vermehrung erkennen. Die Tiere wurden im Schnitt 51 Tage nach Transplantation getötet. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tumoren der Linie 510079 im Schnitt 1 cm groß, die der Linie 944 5 mm. Im Gegensatz zur *in vitro* Wachstumsanalyse (vgl. Tabelle 3.1), wuchsen die Tumoren der Linie 510079 im s.c.-Transplantationsmodell schneller als die der Linie 944.

Makroskopisch hatten die Tumoren beider Linien eine rundliche Form und eine derbe, harte Konsistenz. Teile der Tumoren, die meist zentral gelegen waren, zeichneten sich durch eine weiche, wahrscheinlich nekrotische Beschaffenheit aus. Im Bereich der s.c.-Tumoren der Linie 510079 konnte man in der Regel Hautulzerationen erkennen (siehe Abbildung 3.7 A).

Trotz der deutlichen Unterschiede in der Morphologie der Ursprungstumoren (vgl. 3.2), hatten die s.c.-Tumoren beider Linien mikroskopisch eine ähnliche Struktur. Sie zeichneten sich beide durch ein anaplastisches Tumorzellbild mit dukталen Strukturen und nekrotischen Bereichen aus. In Korrelation mit dem Ursprungstumor zeigte sich im s.c.-Tumor der Linie 944 ein größerer Anteil dukтalen Strukturen (siehe Abbildung 3.7 B). Das Erscheinungsbild der s.c.-Tumoren ähnelte dem der Ursprungstumoren. Eine komplette Rekapitulation der allgemeinen Tumorstruktur des jeweiligen Ursprungstumors war nach s.c.-Transplantation allerdings nicht zu erkennen (vgl. Abbildung 3.4, Abbildung 3.6).

Abbildung 3.7: s.c.-Tumoren der unsortierten Linien 944 und 510079



(A) Makroskopische Abbildung der s.c.-Tumoren der unsortierten Linie 944 (rechts) und 510079 (links). (B) In der mikroskopischen Abbildung der s.c.-Tumoren der Linien 944 und 510079 sieht man jeweils einen homogenen anaplastischen Tumor mit dukталen Tumorabschnitten und nekrotische Bereiche.

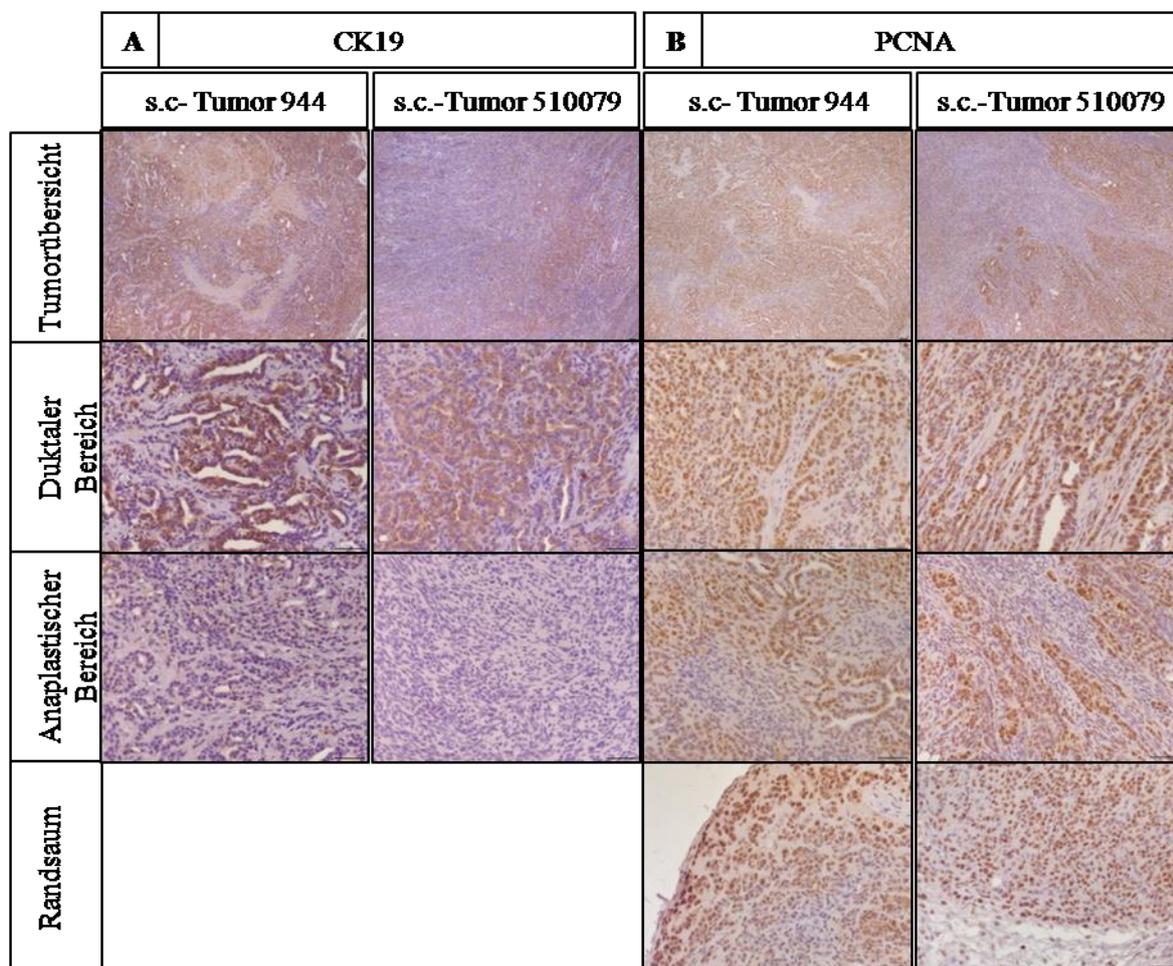
Maßbalken entspricht 50µm

Zur genaueren morphologischen Beurteilung wurden die s.c.-Tumoren mit CK19 gefärbt. Dukтale Strukturen zeigten eine starke, anaplastische Bereiche keine Expression des Markers. In der Tumorübersicht kam nun deutlich die Dominanz der dukтalen Strukturen in den Tumoren der Linie 944,

im Gegensatz zu einer mehr anaplastischen Struktur der 510079 Tumoren, zum Ausdruck (siehe Abbildung 3.8A Tumorübersicht). Die Expression von PCNA war in Zellen duktaler Strukturen besonders stark ausgeprägt. Folglich zeigte sich auch in den Tumoren der Linie 944, entgegen der Tumorwachstumsgeschwindigkeit, ein größerer Anteil der für PCNA positiven Nuklei. In den anaplastischen Abschnitten traten kaum positive Zellen auf (siehe Abbildung 3.8 B).

Bei den s.c.-Tumoren beider Linien ließ sich ein gewisser Randsaum mit aufgelockerter Zellstruktur erkennen. Diese Zellen zeigten eine sehr hohe Rate (ca. 90%) von für PCNA positiven Nuklei.

Abbildung 3.8: CK19 und PCNA Expression der s.c.-Tumoren von 944 und 510079



In der CK19 Färbung zeigt sich eine membranäre Expression innerhalb der dukталen Strukturen. Die nukleäre Expression von PCNA erkennt man ebenfalls v.a. innerhalb dieser Bereiche. Basierend auf den größeren dukталen Anteil der Tumoren der Linie 944, werden beide Marker in diesen Tumoren häufiger und stärker exprimiert. Zusätzlich zeigt sich eine starke Expression von PCNA im Randsaum der Tumoren beider Linien.

Maßbalken entspricht 50µm

3.4. Orthotope Transplantation

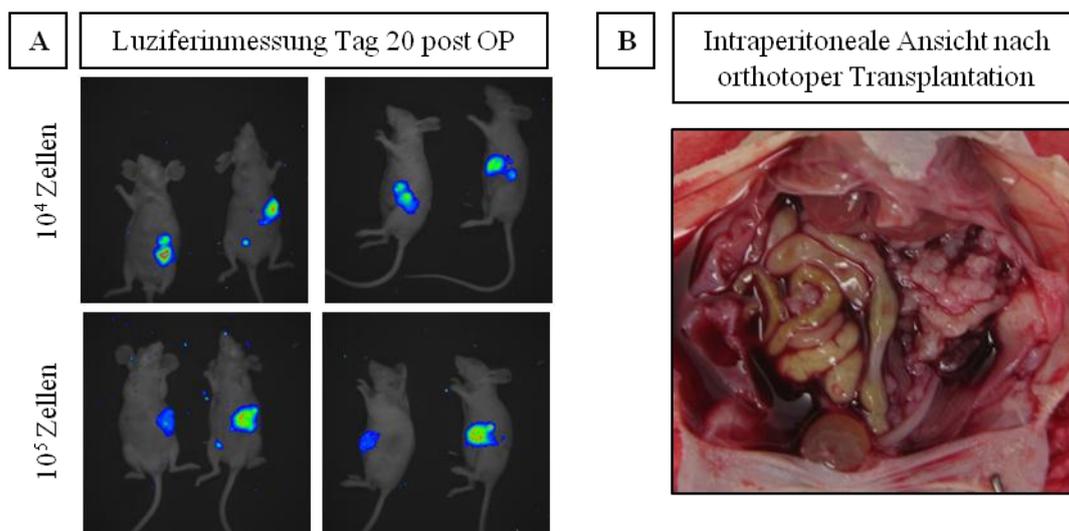
Um das Verhalten der Zellen der Linie 510079 *in vivo* auch in einem dem Ursprungstumor möglichst ähnlichem Milieu überprüfen zu können, wurden diese orthotop in Nacktmäuse transplantiert. Es wurden sowohl 10^4 als auch 10^5 Zellen orthotop transplantiert, um zu evaluieren welche Zellzahl nötig war um einen Tumor zu initiieren und um festzustellen ob die Zellzahl einen Einfluss auf das Tumorwachstum bzw. auf die Tumorwachstumsgeschwindigkeit hatte.

Mit einer CCD-Kamera konnte nach Luziferininjektion im Schnitt nach 20 Tagen (10-40 Tage) ein erstes Signal im Bereich des Pankreas nachgewiesen werden. Bei regelmäßigen Kontrollen im Tumorwachstumsverlauf wurde das Signal der Tumorzellen jeweils nach dem ersten Auftreten zunehmend stärker. Dabei zeigte sich im Vergleich der beiden Zellzahlgruppen (10^4 bzw. 10^5 transplantierte Zellen) kein Unterschied (siehe Abbildung 3.9 A).

Da die Tumorgröße als Tötungskriterium nach orthotoper Transplantation nicht eindeutig zu beurteilen war, wurden die Mäuse bei Verschlechterung des Allgemeinzustands oder bei sichtbarem Auftreten von Aszites getötet. Dies war im Schnitt 53 Tage (40-79 Tage) nach der Transplantation der Fall (vgl. Abbildung 3.20).

Bei der Präparation bestand das Pankreas bei allen Tieren zum einen aus unverändert erscheinenden Pankreasrestgewebe, zum anderen aus blasig-zystischen Tumoranteilen mit derben, knotigen Abschnitten. Es waren mehrfach Metastasen in Milz und Leber zu erkennen. Bei mehreren Mäusen ließ sich eine Peritonealkarzinose und Aszites dokumentieren (siehe Abbildung 3.9 B).

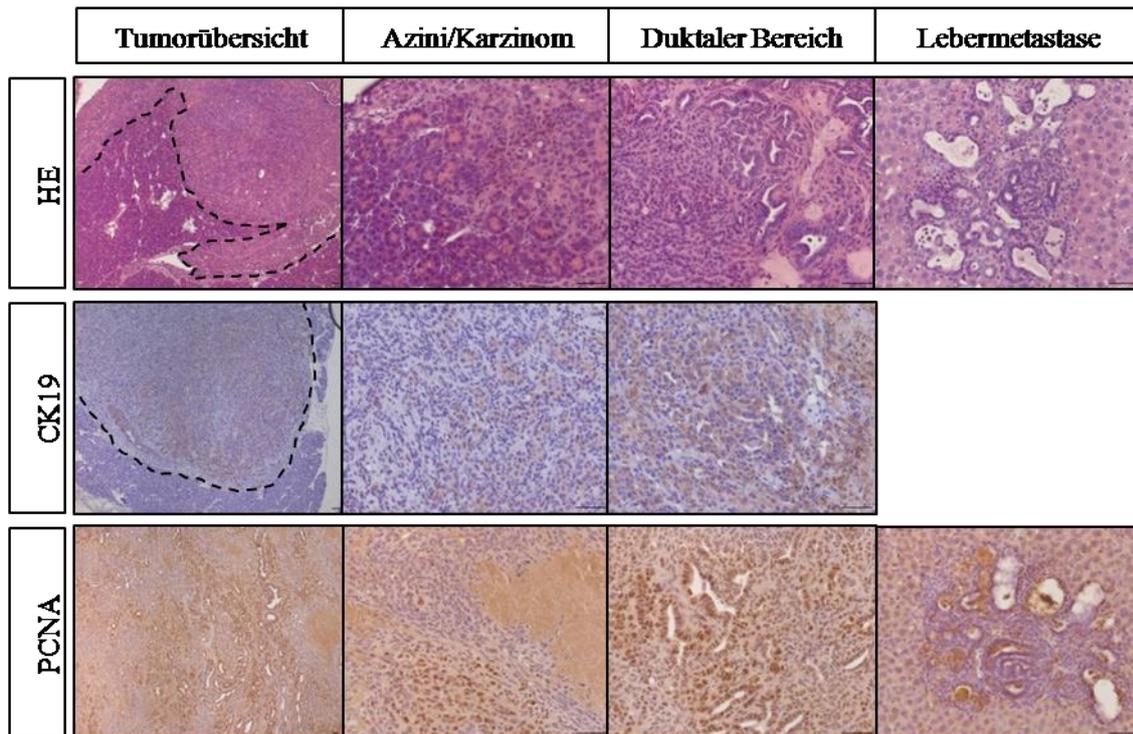
Abbildung 3.9: Orthotope Transplantation der Zellen der Linie 510079



(A) Luziferinmessung 20 Tage nach orthotoper Transplantation bei je zwei Mäusen in Rücken- bzw. Seitenlage nach Transplantation von 10^4 bzw. 10^5 Zellen. Im Wachstumsverlauf ist zwischen den Mäusen nach Injektion unterschiedlicher Zellzahlen keine Signaldifferenz zu erkennen. (B) Zystisch-blasiges Pankreas und blutiger Aszites bei Präparation einer Maus 51 Tage nach orthotoper Transplantation.

In der mikroskopischen Analyse zeigte sich ein deutlich gegen das gesunde Pankreasgewebe abgrenzbarer Tumor. Man konnte unveränderte Azini, Inseln und duktale Strukturen erkennen. Direkt anschließend, aber klar abgrenzbar, zeigten sich anaplastische Tumoren mit dukталen Abschnitten, vergleichbar mit der Struktur der Tumoren nach s.c.-Transplantation (vgl. Abbildung 3.7).

Abbildung 3.10: Mikroskopische Analyse der orthotopen 510079 Tumoren



In der HE Färbung kann man, deutlich abgegrenzt gegenüber dem gesunden Restgewebe, den anaplastischen Tumor mit dukталen Bereichen erkennen (Tumorübersicht; ---). Die Metastase hebt sich, mit der zystisch-dukталen Struktur, deutlich gegen das Lebergewebe ab. Mit Hilfe der CK19 Färbung werden die dukталen Abschnitte der Tumoren hervorgehoben (CK19). Die nukleäre PCNA Färbung weist auf eine starke Zellvermehrung besonders innerhalb der dukталen Strukturen hin. Innerhalb der anaplastischen Bereiche zeigt sich eine hohe Variabilität der PCNA Expression.

Maßbalken entspricht 50µm.

Die Tumoren wuchsen damit überwiegend verdrängend und nicht infiltrativ. Die orthotopen Tumoren zeigten insgesamt, trotz des vergleichbaren Milieus, keine Rekapitulation der Morphologie des Ursprungstumors, welcher neben kleinen anaplastischen Tumorabschnitten hauptsächlich aus IPMNs bestanden hatte (vgl. Abbildung 3.6). Die duktal bis zystische Struktur der Lebermetastase entsprach der Metastasenstruktur des Ursprungstumors (siehe Abbildung 3.10 HE; vgl. Abbildung 3.6).

Nach Färbung mit CK19 ließ sich eine starke und weit verbreitete Expression des Markers in den dukталen Bereichen sowohl des Tumors als auch des gesunden Pankreasgewebes erkennen. Die gesunden Azini exprimierten kein CK19 (siehe Abbildung 3.10 CK19).

Nach Färbung mit PCNA, wiesen die vielen positiven Nuklei innerhalb der duktaalen Strukturen, auf eine sehr starke Vermehrung der Zellen dieser Formationen hin. Innerhalb der anaplastischen Bereiche war die Expression abschnittsweise stark variabel (siehe Abbildung 3.10 PCNA).

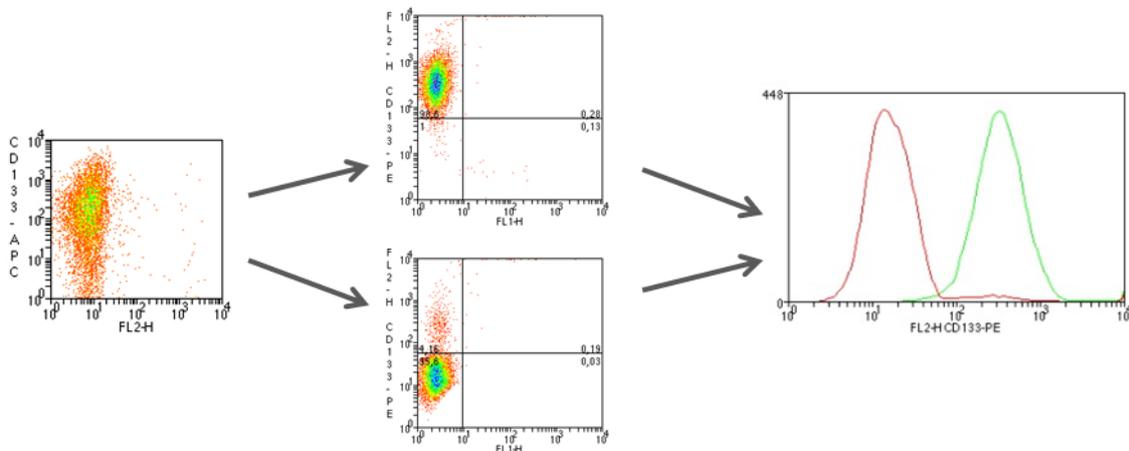
3.5. Populationsanalyse nach FACS

Um nun speziell die Rolle der Oberflächenmarker CD133 und cMet zu analysieren, wurden die Zelllinien 944 und 510079 mittels FACS in Abhängigkeit der Marker CD133 bzw. cMet jeweils in eine positive und eine negative Population aufgeteilt (CD133⁺/⁻ bzw. cMet⁺/⁻). Als Grundlage für die *in vivo* Versuche wurden die Populationen genauer untersucht.

3.5.1. Durchflusszytometrische Kontrolle

Nach dem FACS wurden die Populationen durchflusszytometrisch kontrolliert. In den Auswertungen dieser Kontrollanalysen ließ sich deutlich die Auftrennung in die klar gegeneinander abgrenzbaren positiven und negativen Populationen erkennen (siehe Abbildung 3.11; Tabelle 3.3).

Abbildung 3.11: Durchflusszytometrische Analyse vor und nach FACS



Durchflusszytometrische Kontrolle des FACS mit CD133 am Beispiel der Linie 510079. Die Linie 510079 wurde vor und nach FACS durchflusszytometrisch analysiert. Man kann die klare Auftrennung in eine CD133⁺ und eine CD133⁻ Population erkennen. Anhand der zwei getrennten Kurven im Histogramm (rot: negative Population; grün: positive Population) lässt sich die hohe Reinheit der Auftrennung ablesen.

Tabelle 3.3: Reinheit der FACS-sortierten Populationen

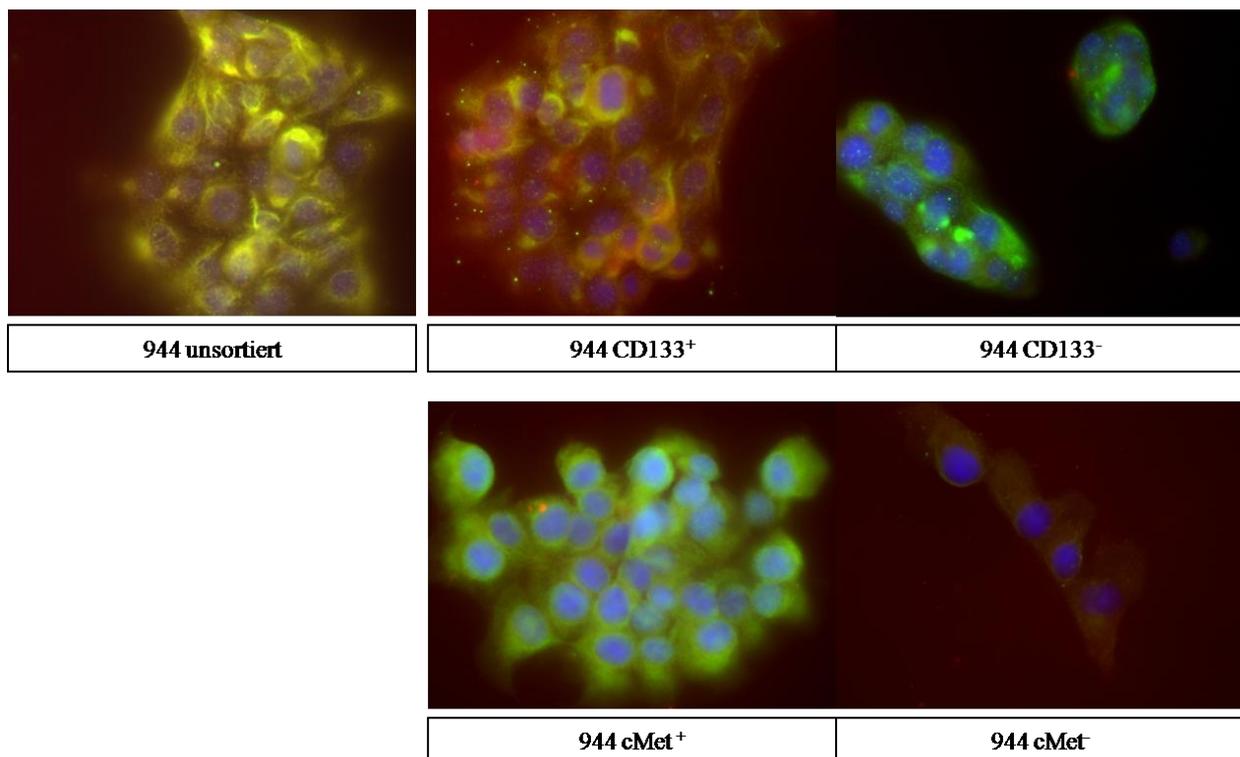
	CD133		cMet	
	+	-	+	-
Reinheit der FACS-sortierten Populationen	95,80%	93,30%	99,20%	99,50%

Beim FACS schwankte die Reinheit der Auftrennung für CD133 zwischen 90%-98%. Bei den Versuchen mit cMet konnte stets eine sehr hohe Reinheit erzielt werden. Gezeigt sind die Mittelwerte aller FACS-Versuche in Prozent.

3.5.2. Markerexpression der Zellen

Wie in den durchflusszytometrischen Kontrollen, konnte man auch in der Immunfluoreszenz deutlich die Steigerung bzw. Verringerung der Expression der Oberflächenmarker cMet und CD133 nach Auftrennung mittels FACS erkennen.

Abbildung 3.12: IF-Färbung der Linien 944 unsortiert und nach FACS



In der IF-Färbung der Zellen, 24h nach FACS, zeigt die unsortierte Population der Linie 944 eine überwiegend zytoplasmatische Expression von CD133 (rot) und cMet (grün) (gelbe Färbung durch Überlagerung). Die aufgetrennten Populationen zeichnen sich, wie schon durchflusszytometrisch bestätigt (vgl. Abbildung 3.11), durch Steigerung bzw. Abnahme des jeweiligen Markers aus.

Vergrößerung 400x

Als Beispiel: Bei der IF-Färbung der unsortierten Linie 944 konnte man erkennen, dass sowohl CD133 (rot) als auch cMet (grün) exprimiert wurden. Äquivalent zu den FACS Ergebnissen (CD133: 11,75%;

cMet: 2,5%) (vgl. Tabelle 3.2) spiegelte sich in der IF-Färbung die niedrige membranäre Expression der beiden Marker wieder, die allerdings beide eine starke zytoplasmatische Expression zeigten. CD133 war dabei homogen im Zytoplasma verteilt, cMet hauptsächlich paranukleär akkumuliert.

In der CD133⁺ Population war eine deutlich verstärkte und in der CD133⁻ Population praktisch keine Expression von CD133 zu sehen, weder membranär noch zytoplasmatisch.

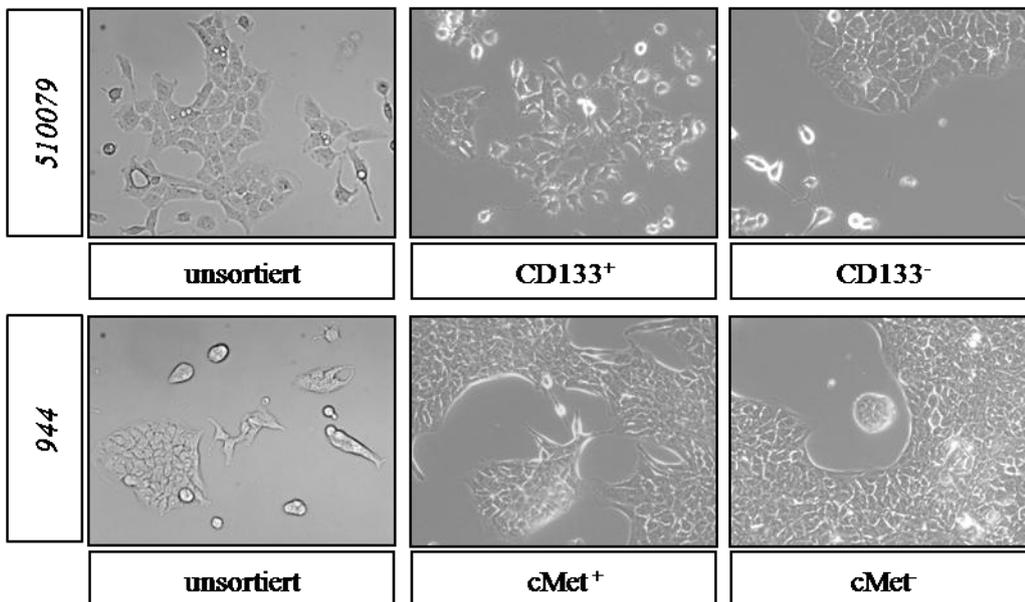
In der cMet⁺ Population war cMet homogen stark exprimiert. In der cMet⁻ Population war eine membranäre Färbung durch cMet nicht zu erkennen, die zytoplasmatische Expression erschien schwächer. Eine Veränderung der Expression von CD133 in den beiden Populationen ließ sich nicht feststellen (siehe Abbildung 3.12).

Nach IF-Färbung bei gleichem Versuchsaufbau der Zellen der Linie 510079 (Abbildung nicht gezeigt) zeigte sich äquivalent, eine der Durchflußzytometrie entsprechenden Verteilung der Marker in den Zellen. Die Ergebnisse der IF, bei Färbung 24h nach FACS, bestätigten die in der Durchflußzytometrie gewonnenen Ergebnisse (vgl. Abbildung 3.11).

3.5.3. Morphologie und Wachstumsverhalten der Zellen nach FACS

Die CD133^{+/-} bzw. cMet^{+/-} Population wurde nach dem FACS getrennt wieder in Kultur genommen und über mehrere Passagen beobachtet.

Abbildung 3.13: Morphologie der Zellen nach FACS



Vergleich der Morphologie der unsortierten Zelllinien mit den positiven und negativen Populationen 3 Tage nach FACS. Unabhängig von der Zelllinie (944 bzw. 510079) oder dem Marker (CD133 bzw. cMet) zeigen sich keine Veränderungen der Zellmorphologie.

Vergrößerung 200x

Die sortierten Populationen erschienen, wie auch im unsortierten Zustand, als sternförmig bis rundlich. Sie hatten bei niedriger Konfluenz lange Ausstülpungen, die sich bei höherer Konfluenz, mit Zusammenschluss der Zellen zu Inseln, zurückbildeten. Auch bei Gegenüberstellung der nach CD133 mit denen nach cMet sortierten Zellen ließ sich kein Unterschiede erkennen (siehe Abbildung 3.13).

Parallel konnten, auch nach mehreren Passagen, keine Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit oder des Wachstumsverhaltens beobachtet werden.

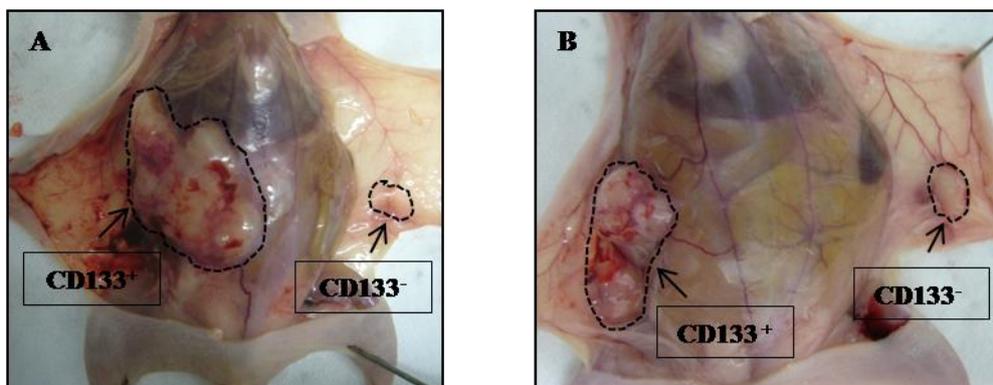
Anschließend wurde jeweils die CD133^{+/-} bzw. die cMet^{+/-} Population für weiterführende *in vivo* Versuche verwendet. Es sollten Unterschiede in Morphologie, Wachstum, Markerexpression, Aggressivität und Invasivität im Tumorwachstum sowie Metastasierung untersucht werden um die Rolle des Markers und die eventuelle Relevanz für eine potentielle TSZ-Population in diesem Modell zu evaluieren.

3.6. Subkutane Transplantation der CD133^{+/-} Population

In der ersten Versuchsreihe wurde die mittels FACS aufgetrennte CD133^{+/-} Population der Linien 944 und 510079 jeweils subkutan in Nacktmäuse transplantiert.

Bei den regelmäßigen Kontrollen konnte man bei allen Mäusen (abgesehen von einer Ausnahme), im Schnitt ab 14 Tagen nach Injektion, erste Knoten als Zeichen einer s.c.-Tumorzellvermehrung erkennen. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede, abhängig davon ob die injizierten Zellen aus der CD133⁺ bzw. der CD133⁻ Population oder aus welcher Zelllinie (944 bzw. 510079) sie stammten. Im Wachstumsverlauf zeichneten sich die s.c.-Tumoren der CD133⁺ Population durch ein deutlich schnelleres Wachstum aus. Im Vergleich zu den s.c.-Tumoren der unsortierten Linien 944 und 510079 wuchsen die Tumoren der sortierten Populationen insgesamt etwas langsamer.

Abbildung 3.14: S.c.-Tumoren nach Injektion von CD133^{+/-} Zellen



Makroskopische Abbildung der s.c.-Tumoren (---), 72 Tage nach der Injektion von CD133⁺ Zellen in die rechte und CD133⁻ Zellen in die linke Flanke von zwei Nacktmäusen (A und B). Bei beiden Tieren sieht man auf der CD133⁺ Seite einen deutlich größeren Tumor, verglichen zur Gegenseite, wo die CD133⁻ Zellen gespritzt worden waren.

3. Ergebnisse

Im Verlauf wurden die Mäuse entweder aufgrund der Größe der Tumoren (>1cm) oder in Folge einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes nach 44-72 Tagen getötet (siehe Tabelle 3.4).

Die Tumoren wurden abschließend vermessen, fotografiert und makroskopisch beurteilt. Äquivalent zum Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeit stellten sich die CD133⁺ Tumoren zum Tötungszeitpunkt signifikant größer dar als die der Gegenseite (siehe Abbildung 3.14; Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Tumorgößen und Überlebenszeit nach s.c.-Transplantation von CD133^{+/-} Zellen

Maus-Nr.	Tumorgöße in cm		Überleben in d
	CD133 ⁺	CD133 ⁻	
27	2,0	0,8	46
28	2,0	1,0	49
29	1,5	1,0	49
30	1,0	0,2	44
31	1,5	0,3	44
32	0,8	0,3	44
42	1,2	0,8	57
43	1,5	1,3	57
44	1,5	1,0	57
45	1,5	1,2	72
46	3,0	0,0	72
47	1,5	0,8	72
\bar{x}	1,6	0,7	55,25

In der Tabelle sind die Größen der Tumoren der einzelnen Tiere zum Zeitpunkt der Tötung aufgelistet. Im Schnitt sind die CD133⁺ Tumoren, mit 1,6 cm, signifikant größer als die der negativen Gegenseite, mit im Schnitt 0,7cm Größe. In der rechten Spalte sind die Überlebenszeiten der Mäuse in Tagen nach s.c.-Transplantation gezeigt.

Tabelle 3.5: Vergleich der CD33^{+/-} s.c.-Tumoren in Abhängigkeit der injizierte Zelllinie

Zelllinie	Tumorgöße in cm		Überleben in d
	CD133 ⁺	CD133 ⁻	
944	1,6	1,0	52,5
510079	1,6	0,5	58
\bar{x}	1,6	0,7	55,25

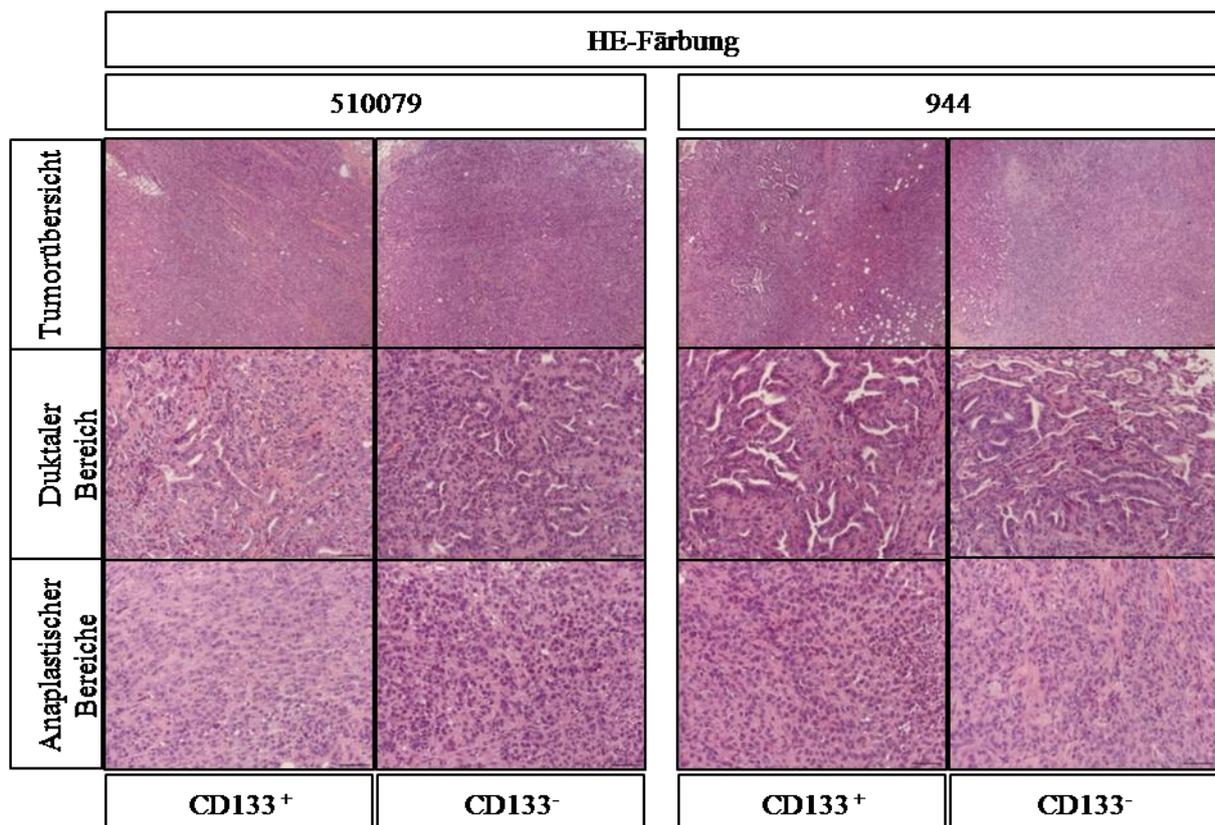
Bei Gegenüberstellung der beiden subkutan transplantierten Linien 944 und 510079, zeigen sich weder im Bezug auf die Tumorgöße noch im Bezug auf die Überlebenszeit signifikante Unterschiede.

Dieser Wachstumsunterschied der CD133[±] Population war sowohl bei den Zellen der Linien 944 als auch bei denen der Linie 510079 zu erkennen. Die Tumoren beider Linien wurden im Schnitt im selben Zeitraum ungefähr gleich groß (siehe

Tabelle 3.5).

Bei der mikroskopischen Analyse der s.c.-Tumoren ließen sich, trotz den signifikanten Unterschiede im Wachstum, keine bemerkenswerten strukturellen Differenzen nachweisen. Vollkommen unabhängig von der gespritzten Population, wiesen alle s.c.-Tumoren in der HE-Färbung ein primär anaplastisches Tumorzellbild auf. Dazu beinhalteten sie verschieden große und unterschiedlich stark differenzierte duktale Abschnitte. Zentral traten immer wieder nekrotische Bereiche auf. IPMNs und PanINs, sowie normales Pankreasgewebe, konnten im s.c.-Tumorgewebe nicht identifiziert werden. Ein paar Mal ließ sich eine Infiltration des umliegenden Muskelgewebes oder des Peritoneums erkennen, Fernmetastasen traten keine auf (siehe Abbildung 3.15).

Abbildung 3.15: HE-Färbung der CD133[±] s.c.-Tumoren



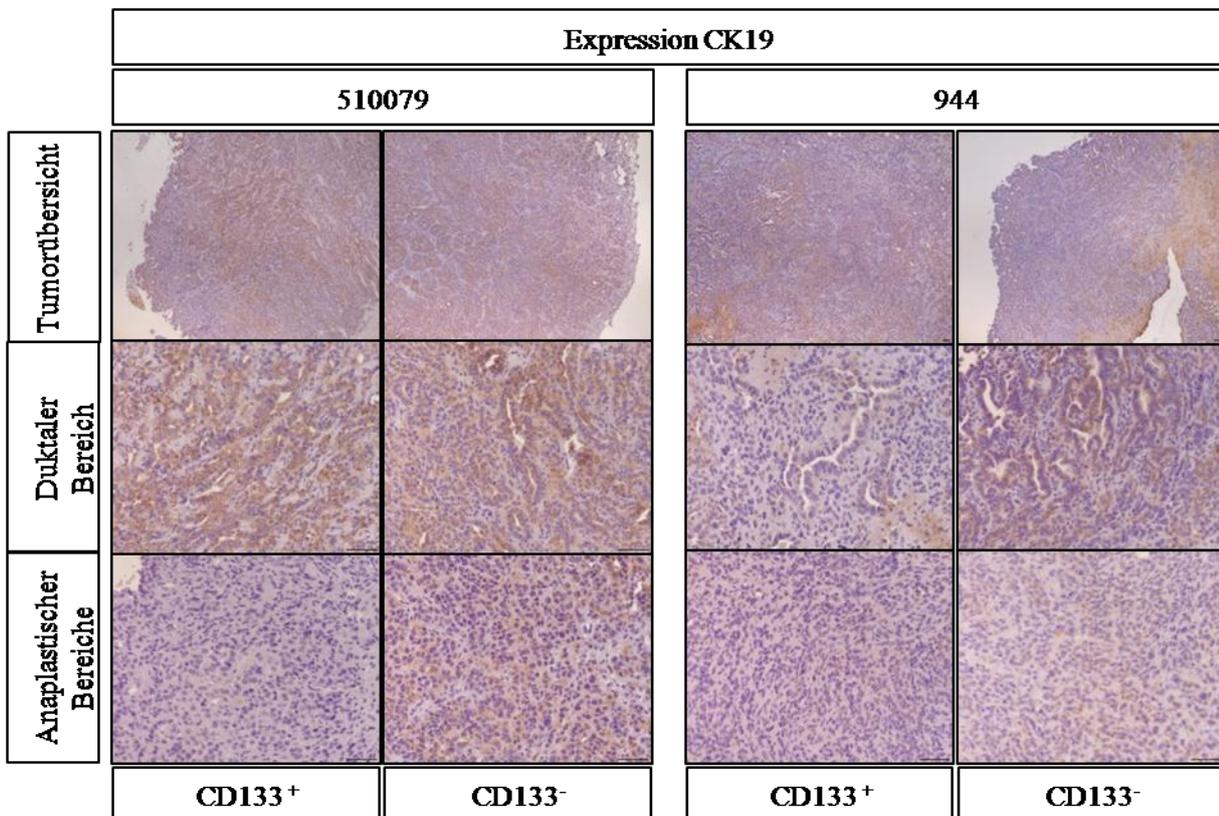
Gezeigt sind, jeweils im Vergleich, s.c.-Tumoren nach Injektion von CD133[±] Zellen der Linien 944 und 510079. Morphologisch zeichnen sich alle Tumoren durch eine anaplastische Tumorstruktur mit dukталen Bereichen und nekrotischen Abschnitten aus. Unterschiede sind weder bei Gegenüberstellung der CD133[±] Population noch der beiden Linien 944 und 510079 zu erkennen.

Maßbalken entspricht 50µm

Insgesamt glichen die s.c.-Tumoren der CD133^{+/-} Population denen der unsortierten Linien in Struktur und Morphologie (vgl. Abbildung 3.7). Im Bezug auf die Ursprungstumoren 944 und 510079 ließ sich keine Rekapitulation der Tumorstruktur nachweisen (vgl. Abbildung 3.4; Abbildung 3.6).

Da in der allgemeinen Morphologie der s.c.-Tumoren kein Hinweis auf eine Ursache der Wachstumsunterschiede zu finden war, sollte die Struktur und Markerexpression genauer untersucht werden. Dafür wurden die Tumoren zuerst mit dem Marker CK19 gefärbt. Die Zellen duktaler Strukturen zeigten eine starke, die anaplastischen Teile des Tumors keine membranäre Färbung mit CK19. Auch mit Hilfe von CK19 ließen sich keine auffälligen Differenzen zwischen den CD133^{+/-} s.c.-Tumoren oder im Vergleich der beiden Linien identifizieren (siehe Abbildung 3.16).

Abbildung 3.16: Expression von CK19 der CD133^{+/-} s.c.-Tumoren



Bei Färbung der Tumoren mit CK19 zeigt sich eine starke membranäre Färbung. Innerhalb der anaplastischen Bereiche zeigt sich keine Färbung mit CK19.

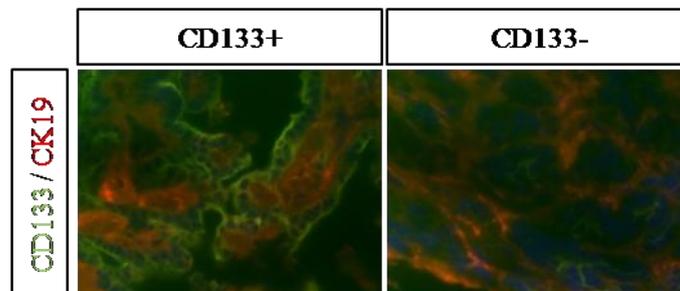
Maßbalken entspricht 50µm

Im Anschluss wurden die s.c.-Tumoren mit dem Marker CD133 gefärbt. So ließ sich überprüfen ob der Größenunterschied der Tumoren u.a. auf die unterschiedliche Expression des Oberflächenmarkers CD133 zurückzuführen sein könnte. Zusätzlich konnte beurteilt werden, ob die Zellen der positiven und negativen Population nach FACS und Transplantation das ursprüngliche Expressionsmuster des Markers zurückgewonnen hatten.

Es zeigte sich ein starker Unterschied in der Expression des Markers CD133 im Vergleich der CD133[±]- Tumoren (siehe Abbildung 3.17). In den Tumoren der CD133⁺ Zellen wurde CD133 (grün) stärker und ubiquitär exprimiert. Im Gegensatz dazu erschien CD133 in den CD133⁻ Tumoren nur schwach und begrenzt auf einzelne Zellgruppen. Zusätzlich wurden die Tumoren mit CK 19 (rot) gefärbt, um die Lokalisation der CD133 Expression besser beurteilen zu können. So konnte man erkennen, dass CD133 hauptsächlich von Zellen exprimiert wurde die Teil duktaler Strukturen waren. Überwiegend zeigte sich die Expression von CD133 an der apikalen Zellmembran.

Aufgrund dieser deutlichen Unterschiede in der Expression des Markers in der IF im Vergleich der CD133[±] s.c.-Tumoren lag die Vermutung nahe, dass der Wachstumsunterschied auf die Expression des Markers zurückzuführen war. Offensichtlich hatte dieser deutliche Unterschied keinen Einfluss auf die Morphologie der Tumoren (vgl. Abbildung 3.15).

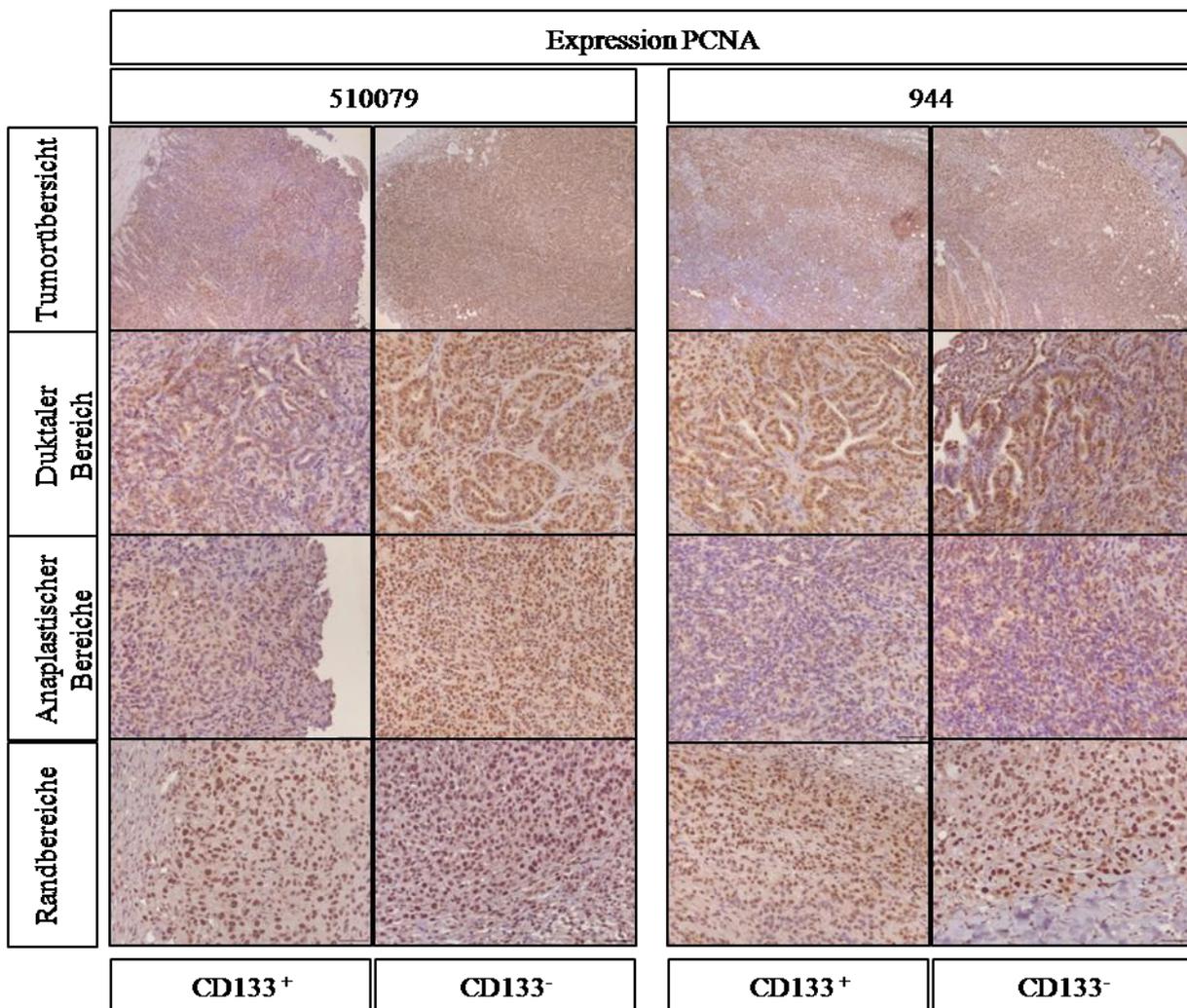
Abbildung 3.17: IF-Färbung der CD133[±] Tumoren



Expression von CD133 (grün) und CK19 (rot) in einem der CD133[±] s.c.-Tumoren. CD133 wird überwiegend apikal von den Zellen duktaler Strukturen exprimiert. Dabei zeigen die Zellen der CD133⁺ Tumoren eine viel stärkere und ubiquitäre Expression, als ihr negatives Äquivalent.

Vergrößerung 400x; Kerne mit DAPI blau gefärbt

Letztlich sollte anhand der Expression von PCNA verifiziert werden, ob der Größenunterschied der Tumoren auf die verstärkte Proliferation bestimmter Zellen oder Zellgruppen zurückzuführen war. Unabhängig von der transplantierten Population konnte man in allen Tumoren eine starke Färbung der dukталen Strukturen und eine variable Expression in den anaplastischen Bereichen erkennen. Auffällig war, wie bei den s.c.-Tumoren der unsortierten Linien (vgl. Abbildung 3.8), eine Art Randsaum mit aufgelockerter Zellstruktur dessen Zellen stark positiv für PCNA waren (siehe Abbildung 3.18). Obwohl sich die CD133⁺ s.c.-Tumoren durch ein deutlich schnelleres Wachstum auszeichneten, zeigten sich bei der Expression von PCNA keine Unterschiede im Vergleich der CD133[±] s.c.-Tumoren.

Abbildung 3.18: Expression von PCNA der CD133^{+/-} s.c.-Tumoren

Es zeigt sich kein Unterschied der PCNA-Expression im Vergleich der CD133^{+/-} s.c.-Tumoren. Die Expression innerhalb duktaler Strukturen ist sehr stark, innerhalb anaplastischer Bereiche sehr variabel. Obwohl sich auch der Randsaum durch eine anaplastisches Zellbild auszeichnet, sind hier alle Zellen für PCNA positiv.

Maßbalken entspricht 50µm

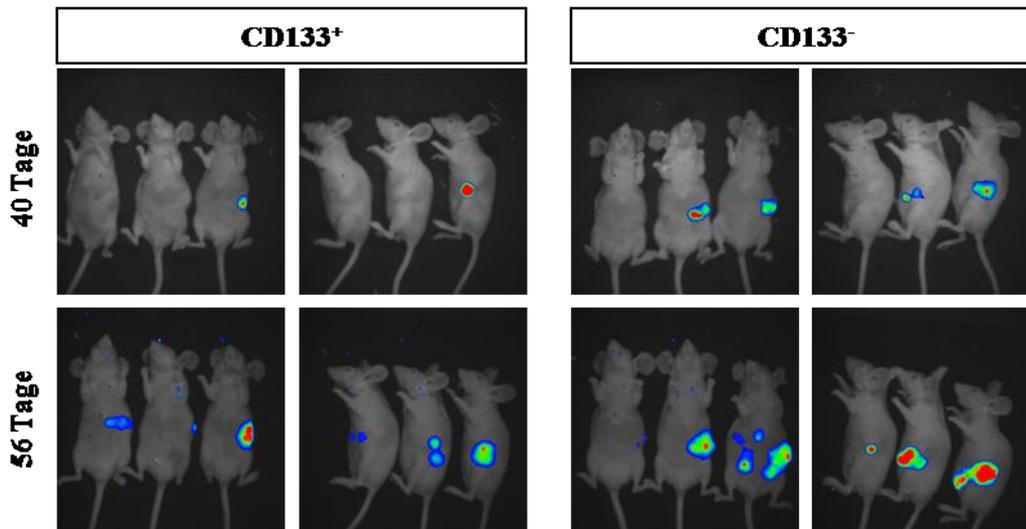
3.7. Orthotope Transplantation der CD133^{+/-} Population

Mit dem Wissen über die signifikanten Unterschiede im Wachstum der CD133^{+/-} Tumoren im einfachen s.c.-Transplantationsmodell, wurden nun, in einer zweiten Versuchsreihe, CD133^{+/-} Zellen orthotop in Nacktmäuse transplantiert. Für das orthotope Transplantationsmodell wurden, aufgrund der Expression von Luziferase, nur die Populationen der Linie 510079 verwendet.

Mit der CCD-Kamera konnte erstmals nach 10-30 Tagen eine vermutlich intrapankreatische Vermehrung von Tumorzellen nachgewiesen werden, unabhängig davon ob die positive oder negative Zellpopulation transplantiert worden war. Somit konnte bezüglich des Zeitpunktes der Tumorinitiation kein Unterschied zwischen den beiden Populationen festgestellt werden.

Das Tumorwachstum wurde mit regelmäßigen Messungen verfolgt. Es zeigte sich bei allen Tieren ab Auftreten der ersten Signale eine progressive Verstärkung dieser, was auf ein fortschreitendes Tumorwachstum hinwies. Anhand der Luziferinmessungen ließ sich auch im Wachstumsverlauf kein Unterschied zwischen der injizierten CD133^{+/-} Population erkennen (siehe Abbildung 3.19).

Abbildung 3.19: Aufnahmen orthotoper CD133^{+/-} Tumoren im Wachstumsverlauf



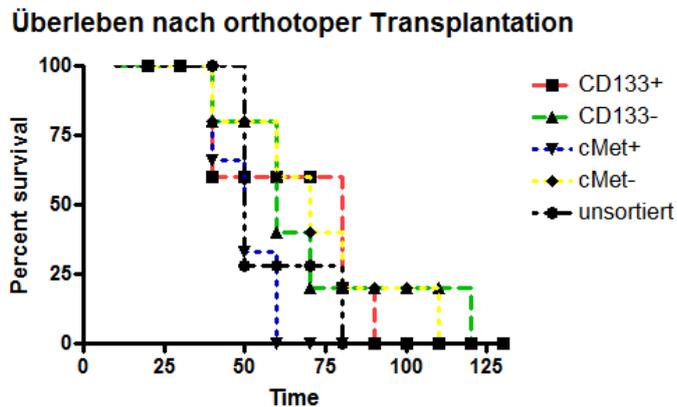
Nach Luziferininjektion lässt sich mit Hilfe einer CCD Kamera ein vermutlich intrapankreatisches Signal der orthotop transplantierten Tumorzellen darstellen. Gezeigt sind je drei Mäuse nach orthotoper Transplantation von CD133⁺ Zellen (A) bzw. CD133⁻ Zellen (B) im Verlauf (vgl. 40 Tage vs. 56 Tage). Weder bezüglich der Tumorinitiation, noch im Wachstumsverlauf lassen sich Unterschiede zwischen den beiden Populationen erkennen.

Die Mäuse wurden bei Verschlechterung des Allgemeinzustands bzw. sichtbarem Auftreten von Aszites getötet. Dies war bei den Mäusen denen CD133⁺ Zellen transplantiert worden waren im Mittel nach 60 Tagen (36-70 Tage) der Fall, bei denen nach Transplantation von CD133⁻ Zellen im Mittel nach 64 Tagen (36-111 Tage). Somit zeigte sich bei dem hier entscheidendem Kriterium, der Überlebenszeit, im Vergleich der CD133^{+/-} Population kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 3.20).

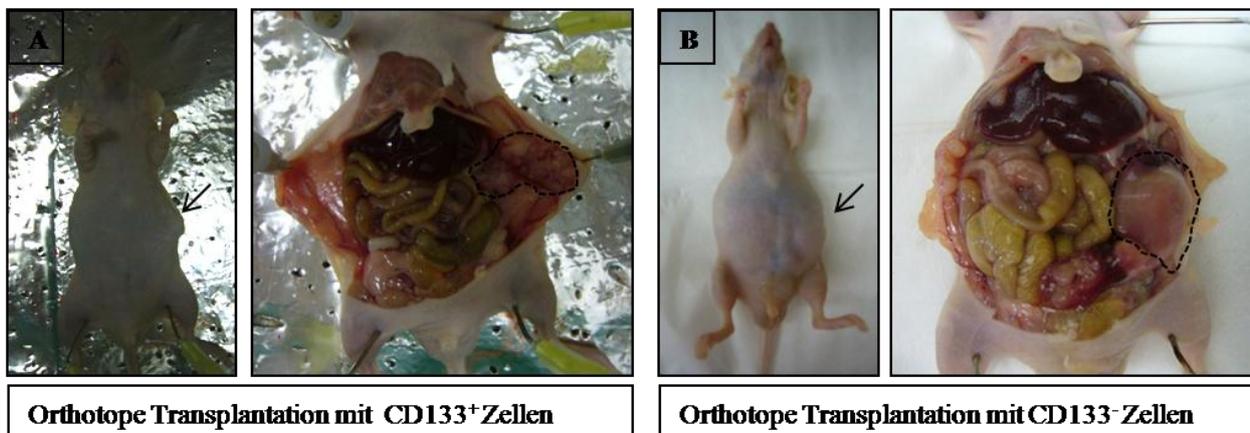
Bei der Präparation der Tiere wurden, neben der Beurteilung des Pankreas, auch die anderen intraabdominellen und die intrathorakalen Organe untersucht. Makroskopisch war es nicht möglich die Tumoren entweder der positiven oder der negativen CD133 Population zuzuordnen. Alle Tiere wiesen ein verändertes Pankreas auf. Die induzierten Tumoren variierten von solide bis zystisch-kleinblasig. Sie wuchsen in der Regel relativ isoliert zu einem Rest unverändert erscheinendem Pankreasgewebe.

Ebenfalls unabhängig von der transplantierten Population traten bei einigen Tieren Metastasen in der Leber, in der Milz und am Peritoneum auf (siehe Abbildung 3.21).

Abbildung 3.20: Überleben der Mäuse nach orthotoper Transplantation

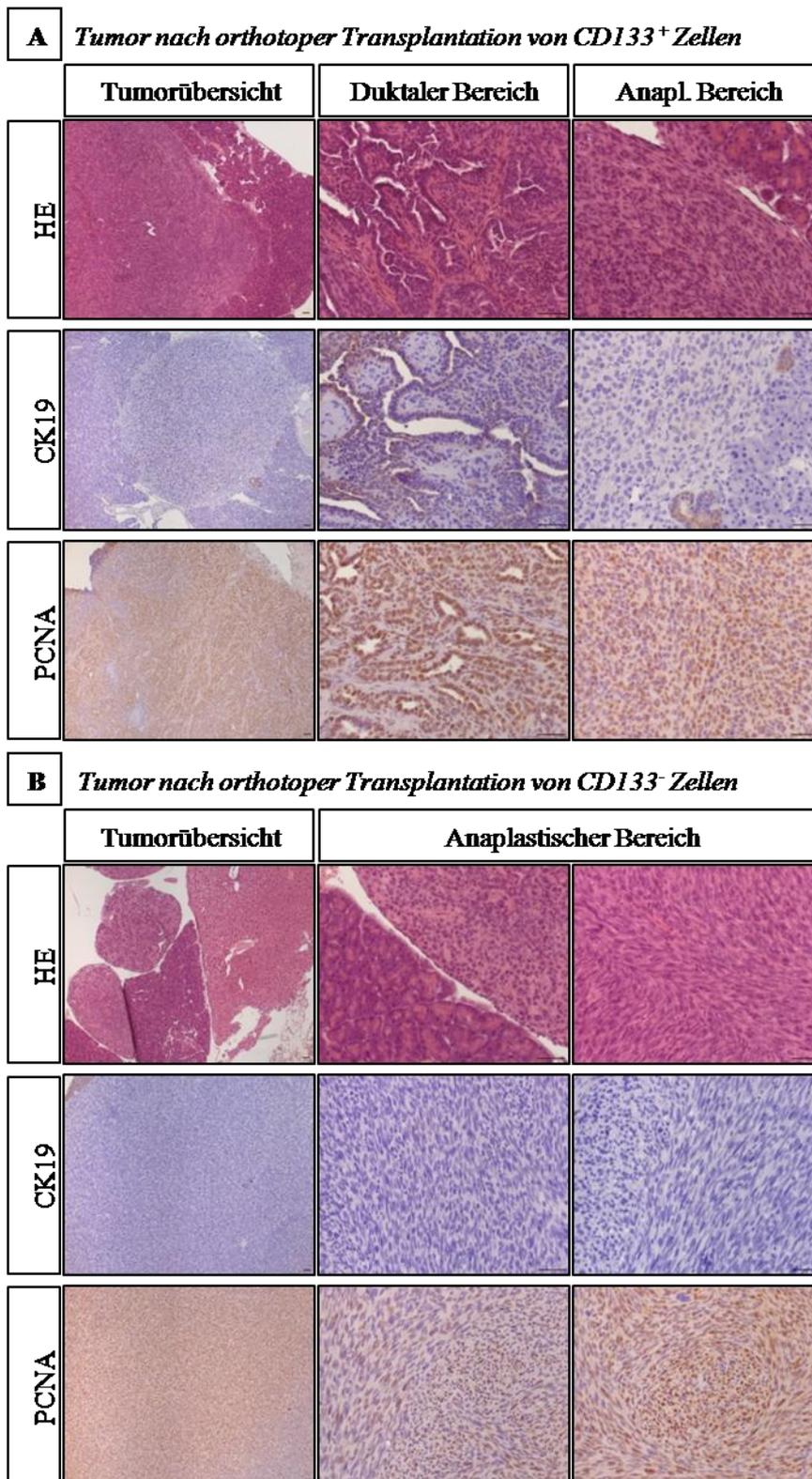


Die Kaplan-Meier Kurve zeigt die Überlebenszeit (in Tagen) der Mäuse nach orthotoper Transplantation der unsortierten, $CD133^{+/-}$ und $cMet^{+/-}$ Population. Das Überleben der Tiere nach Transplantation der unsortierten Zellen ist, mit im Schnitt 53 Tagen (vgl. 3.4), ein Orientierungswert für die Transplantationsversuche nach FACS. Im Vergleich der Tiere nach Transplantation der $CD133^{+/-}$ Population zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Überleben. Dahingegen lässt sich bei Transplantation mit $cMet^{+/-}$ Zellen eine Tendenz dahingehend erkennen, dass die Tiere mit $cMet$ Tumoren länger überleben (vgl. 3.9).

Abbildung 3.21: Tumoren nach orthotoper Transplantation von $CD133^{+/-}$ Zellen

Beispiel der makroskopischen Erscheinung der Tumoren nach orthotoper Transplantation mit (A) $CD133^+$ Zellen, hier resultierend in einem kleinblasig bis derbe wachsenden Tumor und mit (B) $CD133^-$ Zellen, hier resultierend in einem rundlichen soliden Tumor.

Im Folgenden wurden die Organe mikroskopisch beurteilt. Alle Tumoren wuchsen klar abgrenzbar zu gesundem Pankreasrestgewebe. Sonst zeigten die Tumoren der orthotop transplantierten $CD133^{+/-}$ Populationen im mikroskopischen Vergleich deutliche Unterschiede. Die $CD133^+$ Tumoren, wie auch die orthotopen Tumoren der unsortierten Linie 510079 (vgl. Abbildung 3.10), waren durch gleichmäßig verteilte anaplastische, duktale und nekrotische Abschnitte charakterisiert. Dagegen zeigten die $CD133^-$ Tumoren ein fast ausschließlich anaplastisches Tumorbild.

Abbildung 3.22: Mikroskopische Analyse der orthotopen CD133^{+/-} Tumoren

Während die CD133⁺ Tumoren sich durch eine duktale Struktur mit anaplastischen Abschnitten auszeichnen, weisen die CD133⁻ Tumoren ein anaplastisches, fischschwarmähnliches Zellmuster auf (HE). Dieser Unterschied wird durch die Expression des dukталen Markers CK19 verdeutlicht, der von fischschwarmähnlich angeordneten Zellen der CD133⁺ Tumoren nicht exprimiert wird (CK19).

In den CD133⁺ Tumoren wird PCNA von den duktalem Strukturen stark, in den anaplastischen Bereichen nur von einigen Zellen exprimiert. Die anaplastischen Zellen der CD133⁻ Tumoren exprimieren PCNA zu ca. 30%-90%.

Maßbalken entspricht 50µm

Die Zellen lagen sehr dicht beieinander und waren nach einem fischschwarmartigen Muster angeordnet. Nur ganz vereinzelt waren duktalem Strukturen zu erkennen (siehe Abbildung 3.22 HE).

Unabhängig von der gespritzten Population, konnte man bei manchen Tieren in Leber und Milz Metastasen finden. Diese waren von den Metastasen des Ursprungstumors morphologisch nicht zu unterscheiden (Abbildung nicht gezeigt).

Anhand der CK19 Expression verdeutlichten sich die morphologischen Unterschiede der Tumoren. Die CD133⁺ Tumoren zeigten v.a. an der apikalen Membran der duktalem Strukturen eine starke Expression von CK19. Die an den anaplastischen, fischschwarmähnlichen Zellen der CD133⁻ Tumoren, sowie die anaplastischen Bereiche der CD133⁺ Tumoren zeigten keine Expression des Markers (siehe Abbildung 3.22 CK19).

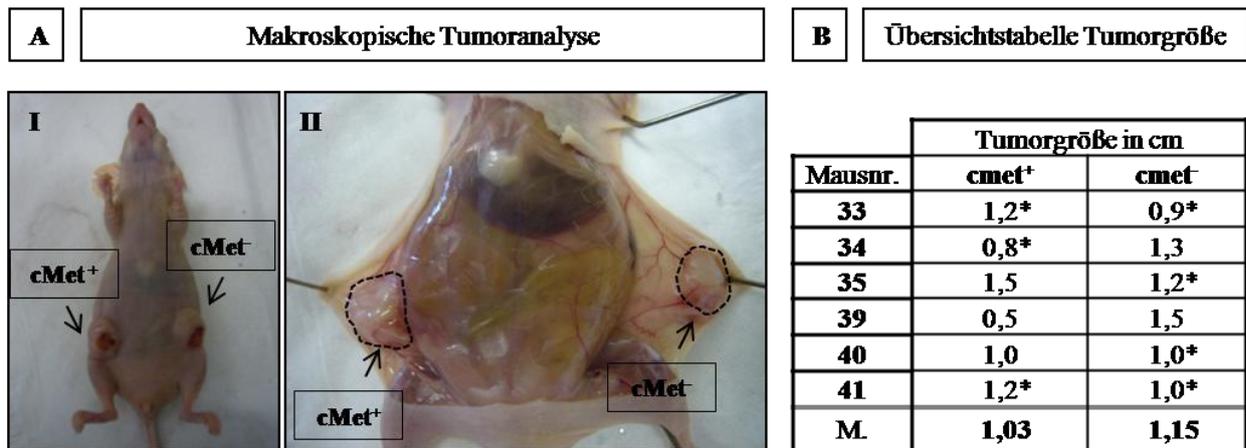
Nach einer Färbung der CD133⁺ Tumoren mit PCNA zeigte sich eine starke nukleäre Expression des Markers in Zellen duktalem Strukturen. In den anaplastischen Bereichen exprimierten ca. 30% der Zellen PCNA nukleär. Erstaunlicherweise waren fast alle Zellen der CD133⁻ Tumoren für PCNA positiv. Somit erklärte sich das ähnlich schnelle Wachstum der Tumoren, obwohl in den CD133⁻ Tumoren keine duktalem Strukturen, sondern ein komplett anaplastisches Tumorbild, zu finden war (siehe Abbildung 3.22 PCNA).

3.8. Subkutane Transplantation der cMet^{+/-} Population

Äquivalent zu den Versuchen mit CD133 wurde nun auch die Relevanz von cMet für Tumorentstehung und -wachstum getestet.

Die Linie 944 wurde im FACS, diesmal mit dem Marker cMet, in eine positive und eine negative Population aufgeteilt und diese jeweils in die rechte (cMet⁺) und linke (cMet⁻) Flanke von Nacktmäusen gespritzt. Im Schnitt war erstmals nach 14 Tagen eine sichtbare s.c.-Tumorzellvermehrung zu erkennen. Die Tumoren wuchsen, im Vergleich der positiven und negativen Population, im Bezug auf Tumorinitiation, -größe und -erscheinung gleichmäßig. Nach 42-46 Tagen, bei einer Tumorgöße von ca. 1cm wurden die Tiere getötet (siehe Abbildung 3.23A).

Zuerst wurden die Tumoren makroskopisch beurteilt. Alle Tumoren hatten eine Größe um 1cm. Bei mehreren Tumoren, unabhängig von der injizierten Population, zeigten sich Hautulzera im Bereich der s.c.-Tumoren (cMet⁺: 3/6; cMet⁻: 4/6) (siehe Abbildung 3.23B).

Abbildung 3.23: Tumoren nach s.c.-Transplantation von cMet^{+/-} Zellen

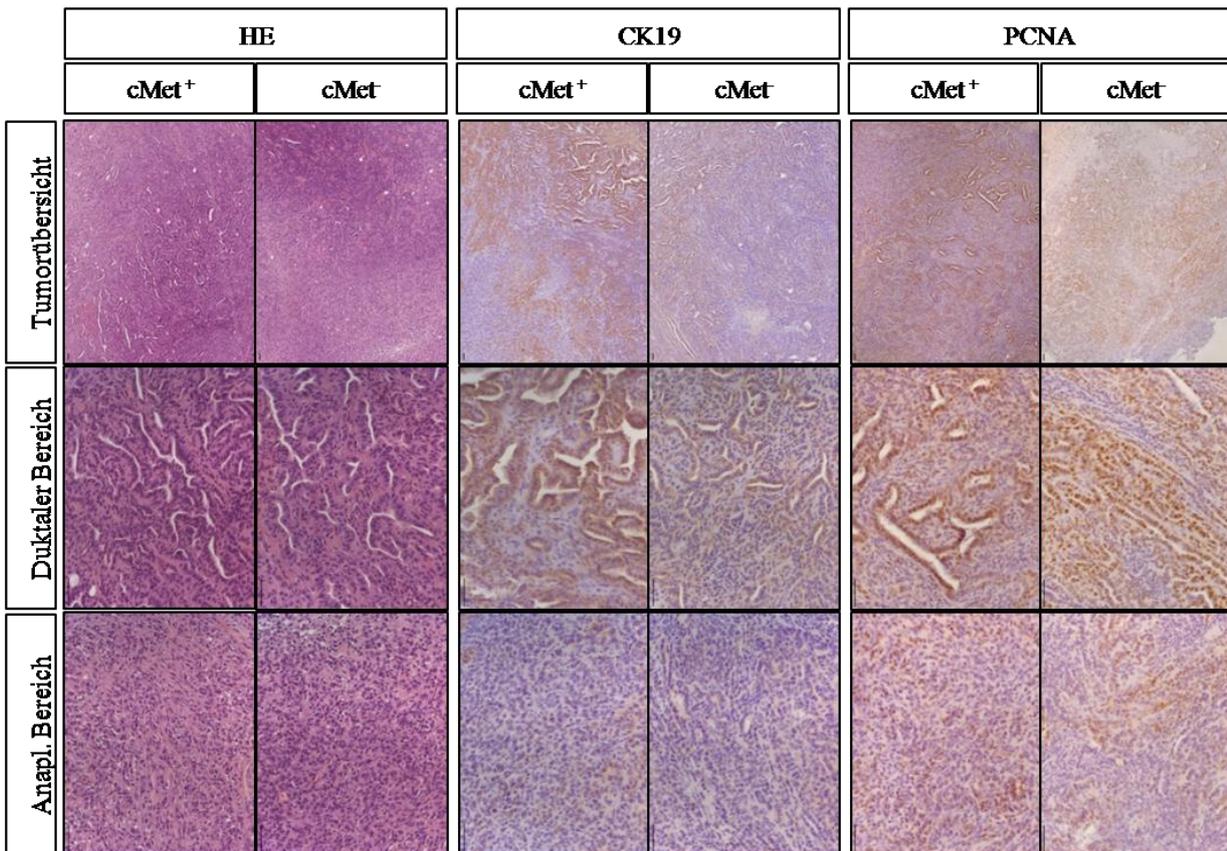
Die s.c.-Tumoren sind zum Tötungszeitpunkt makroskopisch weder durch die äußere Erscheinung (AI), noch durch die Größe (AII, B) zu unterscheiden. Zum Tötungszeitpunkt sind sie im Schnitt 1 cm groß. Ulzera treten, unabhängig von der transplantierten Population, gleichmäßig verteilt auf (B, Tumoren mit Ulzerationen *).

Bei der mikroskopischen Analyse konnte der Eindruck, dass cMet keinen direkten Einfluss auf Wachstum und Morphologie der s.c.-Tumoren hat, bestärkt werden. In der HE Färbung zeigten sich strukturell identische Tumoren. Sie zeichneten sich durch einen etwa gleichen Anteil an anaplastischen und dukталen Bereichen aus (siehe Abbildung 3.24 HE).

Bei Betrachtung des Expressionsmusters von CK19 ließ sich die starke duktale Expression von CK19 gut erkennen. Die anaplastischen Bereiche waren negativ. Auch das Expressionsmuster von CK19 offenbarte keine morphologischen Unterschiede zwischen den cMet^{+/-} s.c.-Tumoren (siehe Abbildung 3.24 CK19).

Parallel zur vergleichbaren Wachstumsgeschwindigkeit und zur Größe der Tumoren zum Tötungszeitpunkt der cMet^{+/-} Tumoren, zeigte auch die Färbung mit PCNA keine Unterschiede zwischen den beiden transplantierten Populationen (siehe Abbildung 3.24 PCNA).

Abbildung 3.24: HE-Färbung und Expression von CK19 und PCNA der $cMet^{+/-}$ s.c.-Tumoren

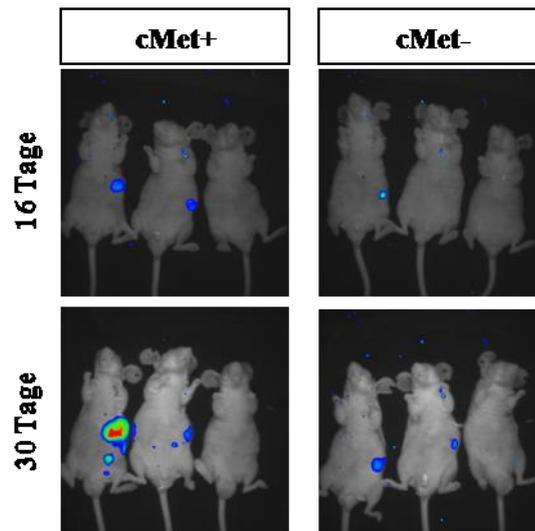


In der HE-Färbung kann man die identische Morphologie der Tumoren erkennen. Anhand der CK19 Färbung lassen sich die gleichmäßig verteilten duktales Abschnitte, mit starker Expression, und die anaplastischen Bereiche, mit schwacher Expression, gut differenzieren. Mit der homogenen Verteilung der Expression von PCNA bestätigt sich das gleichförmige Wachstumsverhalten der $cMet^{+/-}$ Tumoren.

Maßbalken entspricht 50µm

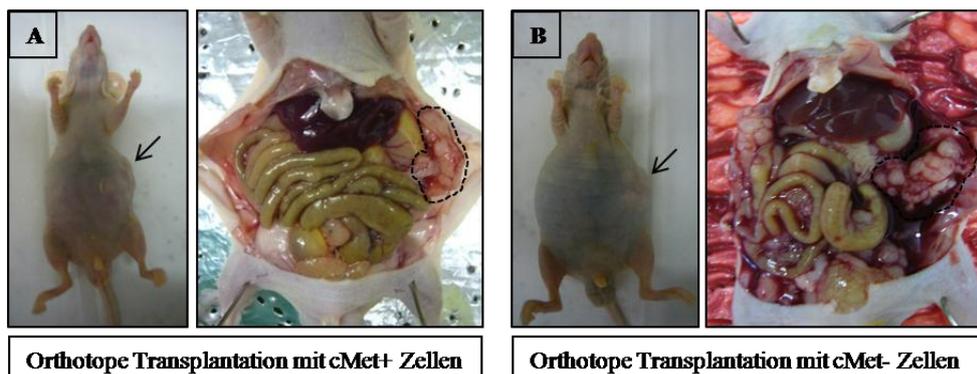
3.9. Orthotope Transplantation der $cMet^{+/-}$ Population

Die $cMet^{+/-}$ Population wurden in einer weiteren Versuchsreihe orthotop transplantiert. Nach im Schnitt 19 Tagen (16-20 Tage) nach Transplantation konnten bei allen Tieren mit einer CCD-Kamera erste Tumorzellsignale nachgewiesen werden (vgl. 2.2.8). Somit war kein Unterschied beim Zeitpunkt der Tumorinitiation im Vergleich der $cMet^{+/-}$ Population zu erkennen. Im Verlauf zeigte sich, ebenfalls unabhängig von der injizierten Population, eine gleichmäßige Verstärkung des intrapankreatischen Signals. Allenfalls zeigte sich eine Tendenz zu schnellerem Wachstum der $cMet^{+}$ Tumoren (siehe Abbildung 3.25).

Abbildung 3.25: Aufnahmen der orthotop transplantierten cMet^{+/-} Tumorzellen im Wachstumsverlauf

Aufnahmen mit einer CCD-Kamera des intrapankreatischen Signals von orthotop transplantierten cMet⁺ bzw. cMet⁻ Tumorzellen. Gezeigt sind je drei Nacktmäuse im Verlauf ab Transplantation (vgl. 16 Tage vs. 30 Tage). Beim Zeitpunkt der Tumorinitiation und im Wachstumsverlauf lassen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Populationen erkennen.

Nach im Schnitt 57 Tagen (33-101 Tage) wurden die Tiere aufgrund einer Verschlechterung ihres Allgemeinzustandes oder erkennbarem Aszites getötet. Dabei zeigte sich, dass die Tiere nach Transplantation von cMet⁻ Zellen erst deutlich später Symptome zeigten (Lebenszeit nach Transplantation: cMet⁺: im Mittel 44 Tage vs. cMet⁻: im Mittel 65 Tage) (vgl. Abbildung 3.20). Bei der niedrigen Versuchszahl war dieses Ergebnis nicht signifikant.

Abbildung 3.26: Tumoren nach orthotoper Transplantation der cMet^{+/-} Population

Beispiel der makroskopischen Erscheinung der Tumoren (→ ;---) nach orthotoper Transplantation mit cMet⁺ Zellen (A) und cMet⁻ Zellen (B). Unterschiede in der makroskopischen Erscheinung lassen sich nicht ausmachen. Beide injizierte Populationen bilden kleinblasig-zystisch wachsende Tumoren mit derbknotigen Anteilen. Bei dem Tumor nach Injektion von cMet⁻ Zellen (B) lässt sich hier noch der blutige Aszites und die massive Peritonealkarzinose erkennen.

Anhand des makroskopischen Bildes bei Präparation wiesen die Tumoren der beiden transplantierten Populationen im Vergleich keine Unterschiede auf. Die, an normales Pankreasgewebe anschließenden,

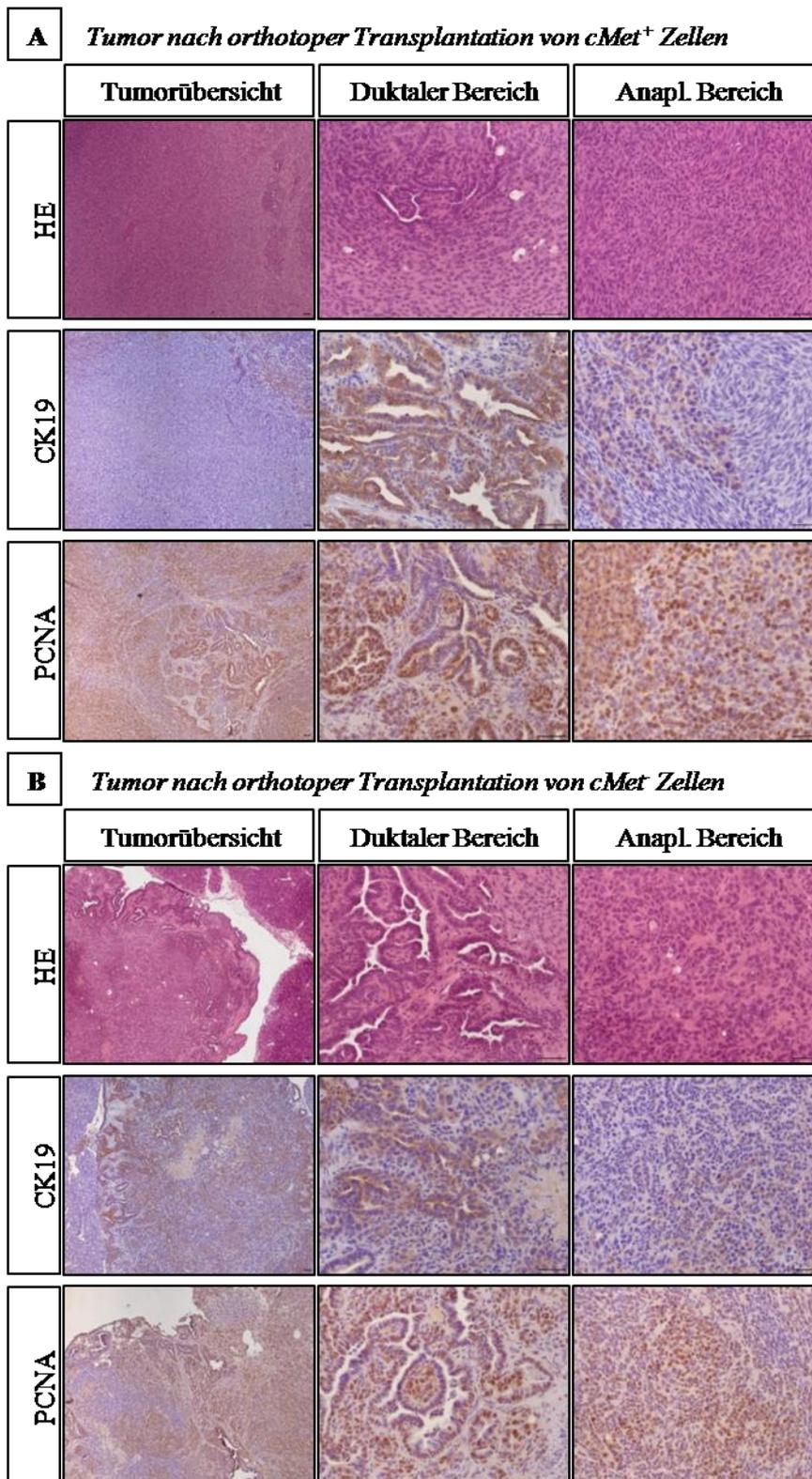
induzierten Tumoren waren durch massive Veränderungen in Form von zystisch-blasigen bis derb-knotigen Neubildungen charakterisiert. Bei drei von acht Tieren war eine Peritonealkarzinose erkennbar. Andere Absiedlungen, z.B. in Leber oder Milz, der injizierten Tumorzellen waren makroskopisch nicht auszumachen (siehe Abbildung 3.26).

In der folgenden mikroskopischen Analyse zeigten sich deutliche Unterschiede in der Tumormorphologie. Die cMet⁺ Tumoren waren durch ein überwiegend anaplastisches, fischschwarmartig angeordnetes Tumorzellbild charakterisiert. Zusätzlich wiesen sie kleine Abschnitte mit duktalem Strukturen auf. Insgesamt war die Struktur mit der der Tumoren nach orthotoper Transplantation der CD133⁺ Population vergleichbar (siehe Abbildung 3.27 A HE, vgl. Abbildung 3.3; Abbildung 3.22 B).

Die cMet⁻ Tumoren zeichneten sich mikroskopisch eher durch überwiegend duktalem Strukturen aus. Sie zeigten auch anaplastische Tumoranteile, deren Zellen allerdings nicht in einer fischschwarmähnlichen Struktur angeordnet waren (siehe Abbildung 3.27 B HE).

Die vorliegende Struktur der Tumoren wurde durch die Färbung mit CK19 unterstrichen. Die cMet⁺ Tumoren zeigten insgesamt nur eine geringe CK19 Expression. Im Gegensatz dazu waren die großen Anteile der duktalem Strukturen der cMet⁻ Tumoren, mit einer starken membranären CK19 Expression, in der Tumorübersicht deutlich erkennbar (siehe Abbildung 3.27 A, B CK19).

Bei der Expression von PCNA ließen sich, parallel zum Tumorwachstum, keine deutlichen Unterschiede im Vergleich der cMet^{+/-} Tumoren erkennen. In den fischschwarmähnlichen Bereichen der cMet⁺ Tumoren war die Expression sehr variabel (siehe Abbildung 3.27A PCNA). Bei den cMet⁻ Tumoren exprimierten nur ein kleiner Teil der Nuklei der duktalem Strukturen PCNA. Die anaplastischen Bereiche zeigten stark positive und komplett negative Abschnitte (siehe Abbildung 3.27B PCNA). Das Wachstum der orthotopen cMet^{+/-} Tumoren schien ungefähr gleichwertig von den duktalem und den anaplastischen Tumorabschnitten auszugehen.

Abbildung 3.27: Mikroskopische Analyse der orthotopen cMet^{+/-} Tumoren

Während sich die cMet⁺ Tumoren v.a. durch eine fischschwarmähnliche anaplastische Struktur auszeichnen, weisen die cMet⁻ Tumoren ein von duktalem Strukturen dominiertes Tumorbild auf (HE A, B). Durch die CK19 Färbung werden diese strukturellen Unterschiede verdeutlicht (CK19 A, B). Die ähnliche Expression von PCNA aller Tumorabschnitte beider Tumorgruppen (duktalem und anaplastisch: hohe Variabilität) weist auf eine gleichmäßig erhöhte Zellteilungsrate hin.

Maßbalken entspricht 50µm

4. Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt, aufgrund des aggressiven Wachstums, der frühen Metastasierung, der meist späten Detektion und der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten, den soliden Tumor mit der höchsten Mortalitätsrate dar. Die aus der Detektion einer TSZ dieser Tumorentität resultierenden Möglichkeiten zur Entwicklung von erfolgreicheren Detektionsmethoden und gezielteren Therapien wären besonders wichtig für die Behandlung dieser zu fast 100% tödlichen Krankheit.

In der Arbeit sollte ermittelt werden ob die Marker CD133 und/oder cMet, im Sinne des TSZ-Konzepts, als potentielle TSZ-Marker im murinen Pankreaskarzinommodell eine Rolle spielen.

4.1. Stabilität der Markerexpression im Versuchsverlauf

Bei der Detektion von TSZ in soliden Tumoren, steht die Erforschung spezifischer Oberflächenmarker, vielmehr die Etablierung von charakteristischen Oberflächenmarkerkombinationen im Mittelpunkt (Visvader et al. 2008). Voraussetzung für diesen Ansatz ist, dass die Marker im Versuchsmodell eine gewisse Stabilität zeigen.

Bei der phänotypischen Analyse der verschiedenen Tumorzelllinien im Versuchsverlauf ließ sich ableiten, dass diese nach Isolation aus dem Ursprungstumor und Aufbereitung für die Zellkultur, über eine Vielzahl von Passagen keine Veränderungen offenbarten. Größe, Form und Zellveränderungen bei zunehmender Konfluenz blieben im Verlauf stets konstant (vgl. 3.1.1). Auch die Wachstumsrate der einzelnen Zelllinien blieb über mehrere Passagen hinweg gleich (vgl. 3.1.2).

Da das phänotypische Erscheinungsbild der Tumorzellen nur ein Hinweis auf die Veränderung von Oberflächenmarkerexpression sein konnte, wurden die Linien durchflusszytometrisch in Hinblick auf die Expression bestimmter Marker (CD24, CD44, CD133 und cMet) analysiert. Es wurde im Passageverlauf wiederholt eine ähnlich große positive bzw. negative Fraktion für die jeweiligen Marker nachgewiesen. Damit konnte eine deutliche Stabilität der Markerexpression im verwendeten *in vitro* Modell belegt werden (vgl. 3.1.3). Auch bei den später für die Transplantationsversuche mit FACS sortierten Populationen zeigten sich wiederholt vergleichbare Fraktionen für die jeweiligen Zelllinien und Marker. Zuletzt konnte in den nach FACS durchgeführten IF-Färbungen diese Stabilität bestätigt werden (vgl. 3.5.2; Abbildung 3.12).

Allerdings zeigten die IF-Färbung auch eine deutliche Expression der Marker CD133 und cMet im Zytoplasma (vgl. Abbildung 3.12). Damit ist potentiell eine zelluläre Verschiebung der Rezeptoren möglich. Da die Rolle der beiden verwendeten Marker CD133 und cMet sowie die regulierenden Faktoren ihrer Expression nicht hinreichend erforscht sind (vgl. 4.4), ließ sich nicht sagen welche Rolle die zytoplasmatische Expression der Marker spielte bzw. welchen Aktivierungsmechanismen sie unterlagen.

Insgesamt waren die phänotypischen, durchflusszytometrischen und FACS-Ergebnisse der Zelllinienanalyse ohne große Abweichungen und unabhängig von der Anzahl der Passagen, der Dichte der Zellen oder anderen variablen Faktoren für die jeweilige Zelllinie mehrfach reproduzierbar. Dies ließ auf eine hohe Stabilität der verwendeten Marker CD24, CD44, CD133 und cMet im *in vitro* Versuchsmodell schließen.

Stabilität der Marker CD133 und cMet ließ sich auch im *in vivo* Modell nachweisen. Zum Tötungszeitpunkt konnte man nach s.c.-Transplantation der CD133^{+/−} Population eine erhaltene und im Bezug auf die *in vivo* Versuche vergleichbar hohe (CD133⁺ Tumoren) bzw. niedrige Expression (CD133[−] Tumoren) des Markers in den Tumoren erkennen (vgl. Abbildung 3.17).

Für die verwendeten Marker und durchgeführten Versuche lässt sich insgesamt von einer hohen Stabilität der Marker und eine Konstanz im Verlauf dieser ausgehen.

Allerdings sind Oberflächenrezeptoren keinesfalls grundsätzlich konstante Merkmale potentieller TSZ. Die Marker werden oft nur aufgrund von bestimmten Zuständen innerhalb der Zelle oder durch Interaktion mit umliegenden Gewebe an der Oberfläche exprimiert und bei Veränderungen des Milieus verschoben. Bei der Lösung der Zellen aus dem soliden Zellverband, später bei deren Aufbereitung und im Verlauf in der Zellkultur, wirken viele Stressoren, welche besonders auf die an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren wirken. Es lässt sich nach Gewinnung der Zellen aus dem Tumorgewebe schon bei der erstmöglichen Methode der Zellanalyse nur noch vermuten wie die Oberflächenstruktur der Zelle *in vivo* aussah. Nur auf Basis dieser Erkenntnis können die später gewonnenen Ergebnisse ausgewertet werden. Der Versuch TSZ nur anhand ihrer Oberflächenstruktur zu charakterisieren und zu isolieren stellt damit grundsätzlich ein instabiles Modell dar. So konnte die Gruppe um Roesch Veränderungen der Markerexpression, anhand des Markers JARID1B, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, nachweisen. Aus sortierten Populationen oder sogar einzelnen Zellen entwickelten sich in ihren Versuchen wieder heterogene Populationen. Das Wiedererlangen der Heterogenität einer Population war abhängig davon in welchem Medium die Zellen kultiviert wurden. So spielt das Milieu eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Charakteristika der Zellen (Roesch et al. 2010).

Auch in der Arbeit zeigte sich in den Tumoren der sortierten Linien wieder eine heterogene Expression der Marker (vgl. Abbildung 3.17). Zusätzlich wurden aus den subkutanen und orthotopen Tumoren neue Tumorzelllinien generiert. Der Versuch die Linien mittels Durchflußzytometrie auf die relevanten Marker und Veränderung ihrer Expression zu testen ist mehrfach nicht gelungen.

Zusätzlich sollte bedacht werden, dass eine potentielle TSZ-Population vielleicht gar nicht durch eine Oberflächenmarkerkombination definierbar ist, sondern aus phänotypisch stark unterschiedlichen Zellen besteht (Hill 2006; Hill et al. 2007).

4.2. Xenograft versus syngenes Transplantationsmodell

Die in der Arbeit verwendete *in vivo* s.c.-und orthotope Transplantationsmodelle sind gängige Methoden zur Detektion potentieller TSZ-Populationen. Sowohl im Bezug auf den Ursprung der verwendeten Tumorzellen (human/ murin) als auch auf die Art der Transplantation (subkutan/ orthotop) sind diese Methoden allerdings oft Ziel der Kritiker des Tumorstammzellkonzepts.

Häufig angewandt wird das sogenannte Xenograft-Modell (in der Arbeit nicht verwendet). Es beruht darauf, humane Tumorzellen in z.B. murine Versuchstiere zu transplantieren um anhand der Ergebnisse Rückschlüsse auf die humanen Ursprungstumoren ziehen zu können. In diesem Modell gibt es speziesspezifischen Unterschieden zwischen Mensch und Tier, z.B. im Bezug auf Liganden und Faktoren. Wobei nachgewiesen ist dass einige wichtige Stimuli für Tumorzellen vom Empfänger (z.B. Wachstumsfaktoren) auch auf humane Zellen wirken. Um ein dem humanen Tumormilieu gerechteres Umfeld zu schaffen werden z.B. humane Fibroblasten mit den Tumorzellen injiziert. Neben der primären Annahme, dass das Zellwachstum von humanen Zellen im Versuchstier verlangsamt bzw. unterdrückt wird, wird u.a. spekuliert ob dadurch nicht sogar die Selektion von TSZ, durch die besonderen Charakteristika dieser Zellen, unterstützt würde. Quintana und seine Gruppe konnten zeigen, dass schon aus einer leichten Veränderung des für Transplantationsversuche verwendeten Maus-Modells (eine stärkere Unterdrückung des Immunsystems) ein deutlicher Unterschied bei der Tumorbildung zu erkennen war. In diesen zusätzlich immunsupremierten Mäusen entstanden aus kleineren Zellkollektiven früher und mehr Tumoren, als in der häufig verwendeten NOD/SCID-Mäusen. Die Gruppe folgerte dass der Anteil der tumorbildenden Zellen bzw. potentieller Stammzellen für die meisten Krebsformen weit höher sein könnte als bisher angenommen. Zudem könnte die Tumorbildung in Maus und Mensch evtl. sogar von ganz verschiedenen Populationen ausgehen (Quintana et al. 2008). Eine Weiterentwicklung des Xenograft Modells wäre wünschenswert, um es gezielt zur spezifischen TSZ-Suche einsetzen zu können. Demgegenüber steht das syngene Transplantationsmodell (in der Arbeit verwendet). Für die Transplantationsversuche in der Maus wurden Tumorzellen mit murinem Ursprung verwendet. Dieses Modell bot die Möglichkeit die Transplantationsversuche in einem dem murinen Ursprungstumor sehr ähnlichem Milieu durchzuführen und damit Störfaktoren, basierend auf speziesspezifischen Unterschieden, auszuschalten. Zudem konnten die Versuche mit einem definierten Zellkollektiv durchgeführt werden. Die Ursprungstumoren konnten schon im Wachstumsverlauf beobachtet werden (vgl. Abbildung 3.5), die jeweiligen Mutationen der Ursprungsmäuse und somit die der später verwendeten Tumorzellen waren bekannt (vgl. 1.8; 2.1.7; 3.2) und die Materialgewinnung zu jedem beliebigen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf war möglich. Dies waren deutliche Vorteile im Vergleich zur Verwendung von humanem Tumormaterial. Die Ergebnisse der syngenen Transplantationsmodelle allerdings sind möglicherweise, im Vergleich zum Xenograft Modell, weniger leicht auf den Menschen übertragbar (Visvader et al. 2008). Aufgrund der aufgeführten Vorteile stellte das syngene Transplantationsmodell für die durchgeführten Versuche die Methode der Wahl dar.

4.3. Subkutanes versus orthotopes Transplantationsmodell

Neben dem Ursprung der Zellen, ist das Milieu in welches die Tumorzellen transplantiert werden essentiell. In verschiedenen Studien haben sich deutliche Unterschiede gezeigt, abhängig davon ob die Zellen subkutan oder orthotop transplantiert worden waren (Galli et al. 2004; Li et al. 2007). Dies bestätigte sich in der Arbeit durch deutliche Differenzen bei der Auswertung der verschiedenen Transplantationsversuche.

Bei den s.c.-Tumoren ergaben sich Unterschiede bei Wachstumsgeschwindigkeit und Größe, während die Tumoren morphologisch keine Differenzen aufwiesen (vgl. 3.6; 3.8). Nach den orthotopen Transplantationen fielen zwar keine signifikanten Differenzen in der Überlebenszeit oder im Tumorwachstum, aber deutliche zellmorphologische Unterschiede im Tumorzellverband auf (vgl. 3.7; 3.9). Da Stroma, Blutgefäße, erhaltenes Restgewebe des jeweiligen Organs etc. Charakteristika und Zellbild eines Tumors entscheidend mitbestimmen, ergaben sich die deutlich unterschiedlichen Ergebnisse wohl auf Grundlage der verschiedenen Transplantationsmethoden.

Im Rahmen der *in vivo* Versuche konnte zwar ein heterogenes Tumorbild reproduziert werden, eine komplette Rekapitulation der Tumorstruktur konnte allerdings nicht erreicht werden. Mit Hilfe der verwendeten Transplantationsmodelle ist es nicht möglich das Milieu des Ursprungstumors exakt nachzubilden. Die Interaktion zwischen Stroma und transplantierten Tumorzellen ist in keinem Modell der natürlichen Interaktion gleich. Da das Stroma einen so wichtigen Faktor in der Tumorbildung darstellt, fehlen im Modell möglicherweise diverse Faktoren zur natürlichen Tumorausbildung. Dadurch resultiert im *in vivo* Versuch eine leicht veränderte Tumorstrukturen.

Das orthotope Transplantationsmodell stellt momentan das dem ursprünglichen Verhältnissen ähnlichste Modell dar. So wurde in Studien mehrfach gezeigt dass bei orthotoper Transplantation weniger Zellen zur Tumorinitiation benötigt wurden als bei der subkutaner, da in dem natürlichen Milieu mehr Zellen überleben oder zum Wachstum angeregt werden und schließlich zu einer Tumorinitiation führen können (Galli et al. 2004; Li et al. 2007). In Abhängigkeit von der Zellzahl vergleichende Versuche der Transplantationsmethoden wurden in der Arbeit nicht durchgeführt. Es konnten sowohl bei den s.c.-Transplantationen als auch bei den orthotopen Transplantationsversuchen mit 10^4 Tumorzellen zeitnah eine Tumorentwicklung nachgewiesen werden (s.c.-Tumoren im Schnitt nach 14 Tagen vgl. 3.6; 3.7; orthotope Tumoren im Schnitt nach 30 Tagen vgl. Abbildung 3.19; Abbildung 3.25).

Da beide Methoden zwar kein ideales Modell darstellen und jeweils verschiedene Vor- und Nachteile aufweisen wurden in der Arbeit beide Transplantationen verwendet. Auch in der Annahme die Ergebnisse der einen Versuchsreihe mit der anderen bestätigen zu können.

Zu berücksichtigen ist im Rahmen der Transplantationsversuche auch, dass ausschließlich immunodefiziente Nacktmäuse verwendet wurden. Bei Transplantationsversuchen mit diesen Mäusen waren die Ergebnisse bezüglich Überleben und Vermehrungsfähigkeit der Zellen dadurch beeinflusst, dass Zellen, welche normalerweise aufgrund des funktionierenden Immunsystems des Tieres potentiell

zerstört werden, bestehen blieben. Es konnten Zellen überleben und Tumoren entstehen die in einem immunkompetenten Umfeld, wie auch im humanen Milieu, evtl. keine Entwicklungschancen gehabt hätten. Die weiterführenden Versuche in Wildtyp-Mäusen stehen zur Analyse einer potentiellen Tumorstammzellpopulation aus. Wt-Mäuse sind im Sinne der Interaktion der Tumorzellen mit den Zellen des Immunsystems ein realistischeres Versuchsmodell.

4.4. Problematische Aspekte der verwendeten Marker

Im Rahmen der aktuellen TSZ-Forschung werden überwiegend eine kleine Auswahl von Markern verwendet, welche aufgrund vorangegangener Forschungsergebnisse als potentielle TSZ-Marker gelten, wie z.B. CD24, CD44 und CD133. Über viele dieser regelmäßig verwendeten Marker ist noch nicht einmal bekannt, wie diese genau aufgebaut sind, welche ihre Liganden sind oder welche Rolle sie bei physiologischen aber auch pathologischen Abläufen in der Zelle in der Zell-Zell-Interaktion spielen. Damit wird die Forschung, die Analyse der Ergebnisse und die Definition der Rolle des Markers als potentieller TSZ-Marker möglicherweise eingeschränkt.

Zudem waren die momentan für gewöhnlich verwendeten Marker für TSZ solider Tumoren in keinem Fall spezifisch. Meist waren diese auch physiologisch stark verbreitet (Visvader et al. 2008). Shmelkov und seine Gruppe zeigten z.B. anhand eines genetischen Modells, anstatt der Immunhistochemie, dass CD133 keineswegs nur auf einzelnen Zellen, sondern auf den meisten differenzierten epithelialen Zellen von Hohlorganen exprimiert wird. So folgerten sie, dass CD133 nur als Marker für differenzierte, luminal Epithelzellen, auf keinen Fall aber als spezifischer TSZ-Marker, fungieren kann (Shmelkov et al. 2008; Visvader et al. 2008). So waren in den, anhand potentieller TSZ-Marker, aufgetrennten Population überwiegend Zellen enthalten die keine Stammzellcharakteristika zeigten und deren Einfluss auf das Wachstum der potentiell enthaltenen TSZ bzw. des Tumors im Transplantationsmodell nicht abzuschätzen war (Hill et al. 2007).

Trotzdem unterstreichen mehrere vorangegangene Studien die wichtige Rolle der Marker CD24, CD44, CD133 und cMet (vgl. 1.2; 1.3) für eine potentielle TSZ-Population im murinen Pankreaskarzinom. Diese vorbekannten Ergebnisse waren die Grundlage zur Auswahl der verwendeten Marker.

Unter dem Gesichtspunkt der eben diskutierten Ansätze (vgl. 4.1 - 4.4) können die heute verwendeten Methoden nur als erster Schritt zur Erforschung einer potentiellen TSZ-Population angesehen werden. Aufgrund definitiver Hinweise auf die Bedeutung einzelner Marker im Sinne des TSZ-Konzepts müssten weiterführende Versuche wie z.B. serielle Transplantationen oder sphere formation assays durchgeführt werden.

4.5. CD133

CD133 wird als sehr vielversprechend auf dem Gebiet der TSZ-Forschung betrachtet, da es sich in vielen vorangegangenen Studien als Oberflächenmarker einer potentiellen TSZ-Population ausgezeichnet hat (Collins et al. 2005; Hermann et al. 2007; O'Brien et al. 2007; Yin et al. 2007).

Bei Betrachtung vorbekannter Ergebnisse war jedoch wichtig zu berücksichtigen, dass „CD133“ in der Forschung, als Bezeichnung für den Rezeptor an der Zellmembran, meist synonym für den humanen Antikörper AC133, den murinen Ak Prominin-1 und manchmal sogar für andere Mitglieder der Prominin-Familie verwendet wurde. So kam es in der Vergangenheit gehäuft zu vermeintlicher Übereinstimmung von Versuchsabläufen und falscher Interpretation von Ergebnissen (vgl. 1.2). Der humane Ak AC133 markiert nur ein glykolisiertes Epitop von CD133 und repräsentiert somit nicht die gesamte Verbreitung des Rezeptors im Gewebe. Da AC133 der in Studien meist verwendete Ak ist, sollte wohl das glykolisierte Epitop des Rezeptors CD133, nicht der Rezeptor an sich, in den Fokus der TSZ-Forschung gerückt werden.

Vom murinen Prominin-1 sind schon heute mehrere Splice-Varianten bekannt, welche sich durch unterschiedliche Expression in verschiedenen Organen auszeichnen. Anfangs wurden die beiden Proteine AC133 und Prominin-1 als homolog angesehen (Shmelkov et al. 2005). Heute hat man davon Abstand genommen die Rezeptoren gleich zu setzen, da sich im Verlauf der weiteren Erforschung der Rezeptoren gezeigt hat, dass sie sich stark anhand ihres Expressionsmuster und Verteilung in den Organen unterscheiden (Fargeas et al. 2003).

So mussten die Ergebnisse zu CD133 aus verschiedenen Studien abhängig von der inkonstanten Nomenklatur differenzierter betrachtet werden. Deutliche Differenzen der Ergebnisse in vorausgegangenen Studien waren durch die Verwendung verschiedener Ak und die nicht einheitliche Nomenklatur im Nachhinein leicht zu erklären. Eine allgemeine Aussage bezüglich CD133 im Vergleich von Mensch und Maus ist besonders nach Revision der Homologie des humanen und murinen Rezeptors schwer möglich. Es müsste eine genaue Nomenklatur und Differenzierung definiert werden um weiterer Verwirrung vorzubeugen (Mizrak et al. 2008). Einen wichtigen Schritt in diese Richtung machten Fargeas et al. mit dem Versuch eine solche für die unter „CD133“ bekannten Rezeptoren zu formulieren (Fargeas et al. 2003; Fargeas et al. 2007).

Außerdem wiesen Shmelkov et al. besonders auf die weite Verbreitung von CD133 auf allen differenzierten epithelialen Zellen von Hohlorganen hin, und folgerten daraus die relative Untauglichkeit von CD133 als spezifischen Marker, besonders hinsichtlich einer im Verhältnis zur Zellmasse wahrscheinlich sehr kleinen TSZ-Population (Shmelkov et al. 2008).

Trotz dieser diskrepanten Ergebnisse, haben sich der Rezeptor CD133 bzw. Teile des Rezeptors als potentiell wichtiger Bestandteile einer Oberflächenmarkerkombination einer TSZ-Population wiederholt bestätigt (vgl. 1.2). Aufgrund dieser Vorergebnisse wurde CD133 auch hier auf der Suche nach Hinweisen auf TSZ-Charakteristika im murinen Pankreaskarzinommodell verwendet. Eine differenzierte Betrachtung der Vorergebnisse wurde berücksichtigt.

In den *in vivo* Versuchen mit CD133 zeigten sich, abhängig von der Methode, unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich der Versuche mit der CD133^{+/-} Population. Primär ein Hinweis darauf dass CD133 eine Rolle bei der Tumorbildung im verwendeten Versuchsmodell spielt.

Bei den s.c.-Tumoren ergaben sich signifikante Wachstumsunterschiede im Vergleich der CD133^{+/-} Populationen (vgl. Abbildung 3.14; Tabelle 3.4). Die Tumoren nach Injektion der CD133⁺ Zellen wuchsen deutlich schneller und wurden signifikant größer. In der Immunfluoreszenz nach Tumorgewinnung war die Unterscheidung der gespritzten CD133^{+/-} Populationen anhand der Expression des Markers noch deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 3.17). Die erhaltene starke und ubiquitäre Expression von CD133 in den CD133⁺ Tumoren und dieser Faktor als einziger offensichtlicher Unterschied zwischen den Populationen zum Zeitpunkt der s.c.-Transplantation wies darauf hin, dass die membranäre Expression von CD133 unterstützend auf Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren wirkte. Damit stellt CD133 in diesem Modell einen bedeutenden positiven Faktor für die Tumorbildung dar.

Anhand der Expression von PCNA, ein Proliferationsmarker, waren die Wachstumsunterschiede nicht sichtbar (vgl. Abbildung 3.18). Allerdings wurden die ICH-Färbungen nicht quantifiziert. In allen Tumoren war eine überwiegend duktales Expression von PCNA zu erkennen. Zudem waren die Tumoren von einem Randsaum mit aufgelockerten Zellen umgeben, die fast zu 100% PCNA exprimierten. Es zeigte sich kein Hinweis auf Zellgruppen oder bestimmte Tumorstrukturen, welche überwiegend für das Größenwachstum der Tumoren verantwortlich waren. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen der Tumorgöße und der mikroskopischen Momentaufnahme der PCNA Expression zum Zeitpunkt der Tumorpräparation könnte gewesen sein, dass die Größenunterschiede auf Differenzen in der Zellvermehrung in einem früheren Tumorstadium zurückzuführen waren. So wäre auch bei prozentual gleicher Verteilung der PCNA Expression ein schnelleres Wachstum der schon zu Beginn größeren CD133⁺ s.c.-Tumoren im Verlauf zu erklären. Vergleichende PCNA Analysen zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf des Tumorwachstums wurden nicht durchgeführt.

Der offensichtliche Wachstumsunterschied der CD133^{+/-} Tumoren im s.c.-Modell konnte im orthotopen Transplantationsmodell nicht reproduziert werden. Bei diesem Versuchsmodell ergab sich, im Vergleich der beiden transplantierten Populationen (CD133^{+/-}), kein signifikanter Unterschied der Überlebenszeit, dem in diesem Fall relevanten Kriterium (vgl. 3.7). Bei der mikroskopischen Analyse zeigten sich aber deutliche Unterschiede der Morphologie (vgl. Abbildung 3.22). In den CD133⁻ Tumoren ersetzten fischschwarmähnliche Formationen das anaplastisch-duktales Tumorzellbild der CD133⁺ Tumoren (vgl. Abbildung 3.22). Die außergewöhnliche Morphologie der CD133⁻ Tumoren ließ sich eventuell auf das Zusammenspiel von Zellen ohne CD133 Expression und dem orthotopen Milieu zurückführen. So stellte die An- bzw. Abwesenheit von CD133 auch im orthotopen Versuchsmodell einen relevanten Faktor in der Entwicklung des Tumors dar.

In den meisten Studien mit CD133, als wichtiger Marker einer potentiellen TSZ-Population, wurde meist nur das Vorhandensein von CD133 als wichtiger Faktor untersucht. Auch Shmelkov et al. stellten zwar

einen Zusammenhang zwischen der Expression von CD133 und früher Tumorentstehung im Transplantationsversuch fest, während CD133⁻ Zellen hauptsächlich das Stroma und die Entzündungszellen ausmachten. Sie zeigten aber gleichzeitig, dass in Metastasen CD133⁻ Zellen, genauso wie CD133⁺ Zellen, tumorentstehende Zellen repräsentierten. In diesem Fall stellten sogar die CD133⁻ Zellen die aggressivere Population dar. Die Gruppe stellte damit die einseitige Betrachtung der Expression von CD133 in Frage. Sie betonten aber weiterhin die Relevanz zur weiteren Erforschung des Markers, sowohl im Sinne seiner Charakteristika als auch im Sinne des TSZ-Konzepts (Shmelkov et al. 2008). Auch im orthotopen Transplantationsmodell in der Arbeit zeigt sich die Abwesenheit von CD133 als bedeutender Faktor der Veränderung. Somit sollte nicht nur die Anwesenheit sondern auch die Abwesenheit von CD133 als potentiell relevanter Faktor für die Tumorbildung Teil der weiteren Forschung sein.

Im *in vivo* Versuchsaufbau mit der CD133^{+/-} Population, zeigten sich deutliche Veränderungen in Abhängigkeit von An- und Abwesenheit von CD133. So bestätigt sich auch hier, in verschiedener Ausprägung, der bedeutende Einfluss von CD133 auf die Tumorbildung, und sollte auch in diesem Modell weiter Gegenstand der TSZ-Forschung sein. Eine genaue Rolle konnte CD133 in diesem Versuchsmodell noch nicht zugewiesen werden.

4.6. cMet

Auch cMet wurde mit Hilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Versuche auf seine Relevanz als Oberflächenmarker im Sinne des TSZ-Konzepts untersucht.

Bei der *in vitro* Charakterisierung der Zelllinien fiel bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten auf, dass sich die Linie 510079 dadurch auszeichnete dass die für cMet positiven Zellen auch für CD133 positiv waren (CD133⁺cMet⁺) (vgl. Abbildung 3.3). So wurde bei der Auswertung der *in vivo* Versuche mit cMet⁺ Zellen, im Bezug auf die Daten der Versuche mit CD133, auch berücksichtigt, dass die Ergebnisse auch auf die An- bzw. Abwesenheit von CD133 zurückzuführen sein könnten.

Bei den s.c.-Transplantationsversuchen mit cMet^{+/-} Zellen zeigte sich bei den untersuchten Faktoren (Wachstumsgeschwindigkeit, Größe, Morphologie) keine Unterschiede zwischen den Tumoren der beiden injizierten Populationen. Die s.c.-Tumoren wuchsen ähnlich schnell, wurden etwa gleich groß, hatten dieselbe makroskopische Erscheinung und ließen sich auch mikroskopisch nach HE-Färbung oder anhand der Expressionsmuster von CK19 und PCNA nicht unterscheiden (vgl. Abbildung 3.23, Abbildung 3.24). Folglich hatte die Expression von cMet im s.c.-Transplantationsmodell keinen Einfluss auf die Initiation, das Wachstum oder die Morphologie der Tumoren und spielt somit im verwendeten Modell augenscheinlich keine bedeutende Rolle in der Tumorbildung.

Auch im orthotopen Versuchsmodell mit der Linie 510079 zeigten sich vorerst, bei Auswertung von Größe und Metastasierungspotential, im Vergleich der transplantierten cMet^{+/-} Population keine Unterschiede. Es war eine Tendenz dahin zu erkennen dass die Mäuse mit cMet⁺ Tumoren eine kürzere Überlebenszeit hatten. In der mikroskopischen Analyse waren deutliche Unterschiede zwischen den

cMet^{+/-} Tumoren zu erkennen. Bei cMet⁺ Tumoren waren dieselben fischschwarmähnlichen Zellformationen zu sehen, wie sie bei den orthotopen CD133⁻ Tumoren aufgefallen waren. Da die cMet⁺ Population auch für CD133 positiv gewesen waren, ließ sich die Abwesenheit von CD133 als Ursache für die fischschwarmähnliche Veränderung hier nicht bestätigen. So scheint im orthotopen Transplantationsmodell cMet eine Rolle in der Tumorbildung zu spielen. In diesem Fall mit Einfluss auf das Überleben der Mäuse und auf die Morphologie des Tumors.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse mit cMet im s.c. Versuchsmodell keine, im orthotopen Modell verschiedene Einflüsse auf die Tumorbildung. Damit spielte cMet zumindest in Interaktion mit einem bestimmten Milieu eine Rolle in der Tumorbildung dieses Versuchsmodells und könnte weiterhin als Teil einer Oberflächenmarkerkombination einer potentiellen TSZ-Population in Betracht gezogen werden.

4.7. Das TSZ-Konzept - Grundlage für revolutionäre Entwicklungen

Nach den ersten eindeutigen Hinweisen auf TSZ als Ursprungszellen zur Entstehung von Leukämien, war die Hoffnung groß auch für solide Tumoren TSZ zu finden (Lapidot et al. 1994). Der Nachweis potentieller TSZ wäre die Grundlage für neue Therapieansätze für solide Tumoren (vgl. 1.1). Anstatt aufgrund von ersten Symptomen die Diagnostik zu beginnen, könnten mit Tumor-Screenings, durch gezielte Suche nach spezifischen TSZ, schon einzelne mutierte Zellen entdeckt werden. Die Zellen könnten im Rahmen der Diagnostik markiert und mit der auch heute schon gängigen Bildgebung visualisiert werden (Visvader et al. 2008).

Zudem könnte die genaue Charakterisierung einer TSZ die Therapiemöglichkeiten revolutionieren. TSZ gelten als resistent gegen die gängigen Karzinomtherapien, wie Chemo- und Strahlentherapie, dadurch dass sie sich nur langsam teilen oder sich in einem der G₀-Phase vergleichbaren Zustand befinden. TSZ könnten gezielt und sicher mit einer auf die jeweiligen Zellen abgestimmten Therapie vernichtet werden. Die übrige Zellmasse eines Tumors könnte, wie heute schon üblich chirurgisch oder auch durch Strahlen- oder Chemotherapie entfernt werden (Dalerba et al. 2007; Eyler et al. 2008). Wichtig dabei wäre, normale Stammzellen mit dieser gezielten Therapie nicht zu beschädigen oder gar zu zerstören (Visvader et al. 2008).

Sollte sich das TSZ-Konzept bewahrheiten, könnte es auch ein Erklärungsmodell zur Entstehung von Metastasen darstellen. Die oftmalige Übereinstimmung von Tumor- und Metastasenstruktur könnte durch die Auswanderung einer multipotenten Kopie der ursprünglichen TSZ begründet werden (Dalerba et al. 2007). Parallel zur gezielten Vernichtung von den Ursprungstumoren könnten, auch Metastasen gezielt und endgültig therapiert werden.

Der Nachweis von TSZ könnte auch ein Erklärungsansatz für die Entstehung von Rezidiven, auch nach langjährigen Rezidiv freien Intervallen bieten. Die lange Jahre in einem Ruhezustand verharrenden TSZ könnten durch bestimmte Trigger aktiviert werden und erneut einen Tumorentstehung verursachen, vollkommen unabhängig von einem vorhergehenden Therapieerfolg und ohne definierbaren Zeitraum. Mit Rezidiven müsste, nach gezielter Zerstörung aller TSZ, nicht mehr gerechnet werden.

Diese Aussichten und der neue Ansatz einer Tumorentstehungstherapie bilden, trotz vieler Kritiker, die Grundlage für die weiterhin intensive Suche nach TSZ in verschiedenen Gebieten der Onkologie.

4.8. Das TSZ-Konzept - Zweifel an Existenz, Relevanz und Detektionsmethoden

Neben denen die an die Existenz von TSZ und an die damit verbundenen Möglichkeiten glauben, gibt es auch jene, welche das TSZ-Konzept im allgemeinen anzweifeln bzw. den Nutzen einer detaillierten Charakterisierung einer TSZ, bei den heute gegebenen wissenschaftlichen und therapeutischen Möglichkeiten, in Frage stellen.

Einen ganz allgemeinen Ansatz der Kritik zeigten Kern et al. auf (Kern et al. 2007). Sie stellten, auf der Basis der bis zu diesem Zeitpunkt zum TSZ-Konzept veröffentlichten Daten, einfache mathematische Berechnungen im Bezug auf die Existenz und Verteilung von TSZ an. Sie folgerten, dass auf dem heutigen Stand der Forschung eine sinnvolle Isolation, von den vermutlich im Verhältnis zur Tumorzellzahl sehr kleinen TSZ-Populationen, nicht möglich wäre. Die gängigen verwendeten Methoden wie Durchflußzytometrie und FACS hätten eine zu große Fehlerquote um die wenigen Prozent an spezifischen Zellen suffizient zu isolieren. Zusätzlich wiesen sie darauf hin, dass auch nach genauer Identifikation einer TSZ-Population, bei den heute gegebenen Möglichkeiten, keine relevanten Fortschritte im Bereich der Therapie möglich wären und damit die Charakterisierung von TSZ keine klinische Relevanz hätte (Kern et al. 2007).

Dieses Argument gegen die Erforschung von TSZ, ließe sich allerdings dadurch relativieren, dass eben durch die genaue Charakterisierung potentiellen TSZ gezieltere Detektionsmethoden und im Zusammenhang damit auch effizientere Therapien für die jeweiligen Tumoren entwickelt werden könnten, welche dieser kleinen Zellzahl der TSZ-Populationen gerecht würden.

Einen anderer Ansatzpunkt zur Kritik an der Relevanz der Isolierung von TSZ-Populationen boten Hill et al. im Bezug auf die Daten der CD133^{+/+} Population des Kolonkarzinoms (O'Brien et al. 2007) an. Sie hoben die Diskrepanz der Zellzahlen im Vergleich von sortierten und unsortierten Zellpopulationen hervor, welche im Transplantationsmodell zur Tumorentstehung nötig waren. In ihrem Modell war ein Vielfaches der Zellen der unsortierten Population nötig, um nach Transplantation einen Tumor zu erzeugen, im Gegensatz zu der Zahl die nötig war um nur mit CD133⁺ Zellen einen Tumor zu initiieren. Vermutet wurde in diesem Fall, dass die CD133⁻ Zellen hemmend auf das Tumorstadium wirkten und somit der wachstumsfördernden Funktion der CD133⁺ Zellen entgegenwirkten. So folgerten sie, dass eine TSZ-Population an sich, aus dem normalen Milieu gerissen und getrennt von bezüglich des einen Markers andersartigen Zellen, wenig Bedeutung hätte. Essentiell war das umgebende Zellmilieu, ohne dessen Einfluss die potentielle TSZ-Population, auch wenn im Modell eindeutig nachgewiesen, ihre Charakteristika stark verändern könnte. Somit wären die erforschten Merkmale einzelner isolierter Zellpopulationen im weiteren nicht aussagekräftig (Hill et al. 2007).

Ebenfalls kritische Ergebnisse zeigten Shmelkov et al.. Auch diese Gruppe bezog sich auf vorab veröffentlichte Daten einer CD133⁺ TSZ-Population des Kolonkarzinoms (O'Brien et al. 2007). Sie zeigten einerseits verschiedene Gründe auf weswegen CD133 als TSZ-Marker untauglich ist (vgl. 4.5). Zudem bemängelten sie, dass verschiedene Entwicklungsstadien der Tumorzellen im Verlauf der Tumorbildung, unter anderem einhergehend mit variabler Oberflächenmarkerexpression, eine Charakterisierung irgendeiner Population an Hand von Oberflächenmarkern im allgemeinen unmöglich machen (Shmelkov et al. 2008).

Nach dem großen Interesse und dem anfänglichen starken Glauben an eine definierbare TSZ-Population in soliden Tumoren, welche Grundlage für eine Revolution in der Onkologie darstellen könnte, mehren sich die kritischen Stimmen und berechtigten Einwände zur Detektion und Relevanz der Isolierung von TSZ.

4.9. Ausblick

Das TSZ-Konzept repräsentiert eine überzeugende und fortschrittliche Betrachtungsweise der Tumorbildung von soliden Tumoren. Sollte sich das Konzept wie heute definiert bewahrheiten, eröffnet die Charakterisierung von TSZ-Populationen neue Möglichkeiten, die Diagnostik und Therapie in der Onkologie zu revolutionieren. Anhand der in der Arbeit gewonnenen Ergebnisse, sowie auf Basis von vorangegangenen Studien stellen CD133 und cMet sehr interessante Marker im Zusammenhang mit dem TSZ-Konzept dar.

Allerdings stellt die Detektion einer TSZ-Population weiterhin ein Problem dar. Es wurden bis heute keine spezifischen Marker gefunden, um ein reines TSZ-Kollektiv zu isolieren. Zudem könnte eine TSZ-Population aus Zellen bestehen, die sich morphologisch deutlich unterscheiden. Somit könnte anhand verschiedener Marker eine TSZ-Population nicht isoliert werden. Zudem ist zu beachten, dass es keine allgemein gültige Charakterisierung für eine TSZ-Population für alle Tumorentitäten zu geben scheint. Für jede Tumorentität, oder sogar innerhalb einer Tumorentität, könnte es unterschiedliche Gruppen von tumorinitiierenden Zellen geben.

Insgesamt lassen sich bei Betrachtung der hier gewonnenen Ergebnisse und anhand von Daten aus vorangegangenen Veröffentlichungen bezüglich des TSZ-Konzepts, die vielseitigen Möglichkeiten erkennen, die die zukünftige Forschung auf diesem Gebiet birgt.

5. Zusammenfassung

Das TSZ-Konzept hat wichtige Implikationen für Diagnostik und Therapie in der Onkologie. Dieses Konzept besagt, dass Tumoren nach einem hierarchischen Modell aus einer Subpopulation von Tumorzellen entstehen, die sich durch einen stammzellähnlichen Charakter auszeichnen: Selbsterneuerung, unlimitiertes Wachstum und Initiierung hierarchisch aufgebauter Tumoren. Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob CD133 und/oder cMet potentielle TSZ-Marker im murinen Pankreaskarzinommodell darstellen. Die beiden Marker wurden in der Literatur als potentiell Tumorstammzellen charakterisierende Marker, für mehrere Tumorentitäten, beschrieben.

Hierzu wurden verschiedene früh passagierte murine Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer Expression von CD133, cMet und anderer potentieller TSZ-Marker untersucht. Des Weiteren wurden die Linien, unsortiert und nach FACS, mit CD133 und cMet, in positive und negative Populationen, subkutan und orthotop, in Nacktmäuse transplantiert um Tumorigenität, Invasivität, Metastasierungspotential, Wachstumsverhalten etc. *in vivo* zu testen.

Die verwendeten Zelllinien zeigten in Bezug auf Wachstum, Morphologie und Zellveränderungen im Passageverlauf keine deutlichen Veränderungen. In der Durchflußzytometrie waren CD133 und cMet in den jeweiligen Zelllinien in konstanten Subpopulationen exprimiert und zeigten eine hohe Stabilität der Markerexpression über mehrere Passagen. CD133 zeigte eine hohe Variabilität der Expression im Vergleich der verschiedenen Zelllinien. cMet war gleichmäßig niedrig in allen Linien exprimiert.

Bei den s.c.-Transplantationen mit CD133^{+/-} Zellen ergaben sich signifikante Wachstumsunterschiede mit deutlich schneller wachsenden und größeren Tumoren der CD133⁺ Zellen. Die orthotopen Tumoren zeigten deutliche Differenzen im Vergleich der Tumormorphologie. Die Tumoren der CD133⁻ Zellen waren durch eine anaplastische Zellstruktur mit fischschwarmartiger Anordnung gekennzeichnet.

Bei den s.c.-Tumoren nach cMet^{+/-} Transplantation ließen sich keine Unterschiede in der Tumorinitiierung und im Wachstumsverhalten zwischen den beiden Tumorengruppen ausmachen. Nach orthotoper Transplantation zeigten die cMet⁺ Tumoren, im Vergleich zu den cMet⁻ Tumoren, sowohl eine kürzere Überlebenszeit als auch eine anaplastische, fischschwarmähnliche Tumormorphologie.

CD133 und cMet exprimierende und nicht-exprimierende Populationen wiesen in den untersuchten murinen Tumorzelllinien Unterschiede in der Tumorbildung, -wachstum und -differenzierung auf, wobei die Expression von CD133 differenzierender war. Eine hinsichtlich TSZ diskriminierende Rolle der Marker ließ sich nicht identifizieren.

Zusammenfassend beeinflussen CD133 und cMet Tumorinitiierung und -wachstum im murinen Pankreaskarzinom, stellen jedoch für sich keine hinreichenden Tumorstammzellmarker im Sinne des TSZ-Konzepts dar.

6. Abstract

The tumor stem cell concept has important implications for diagnostic and therapy in oncology. This concept states that tumors are constructed in a hierarchical model of subgroups of cancer cells, which show stem cell like characteristics: self renewal, unlimited growth and initiation of hierarchical constructed tumors. Goal of this thesis was to discover whether CD133 and/or cMet are potential tumor stem cell markers for the murine pancreatic carcinoma model. Both these markers have been described in literature as markers potentially characterizing tumor stem cells for different tumor entities.

Therefore, various murine tumor cell lines were tested concerning the expression of CD133, cMet and other potential tumor stem cell markers. Following, the cell lines were transplanted subcutaneously and orthotopically in nude mice, unsorted and after FACS with CD133 and cMet. That way tumorigenicity, invasion, potential of metastasis, characteristics of growth etc. could be tested *in vivo*.

Over the course of passaging the used cell lines showed no significant change in growth, morphology and transformation of cell shape. Within the flow cytometry, CD133 and cMet were expressed in constant subpopulations in the respective cell line and displayed a high level of stability in the expression of the marker over various passages. CD133 showed a high variability of expression comparing the different cell lines. cMet was expressing at a constant low level.

When transplanted subcutaneously with CD133^{+/-} cells, growth varied significantly with tumors from CD133⁺ cells growing faster and becoming larger. The orthotopic tumors only displayed significant differences in respect to the morphology of the tumor. CD133⁻ cells showed anaplastic cell structure constructed in the appearance of a fish swarm.

When transplanting the cMet^{+/-} population subcutaneously no difference could be found comparing the two groups of tumors. After the orthotopic transplantation the cMet⁺ tumors showed a shorter survival time as well as a anaplastic, fish swarm-like arrangement compared to the cMet⁻ population.

Both CD133 and cMet expressing and non expressing populations in the tested murine tumor cell lines showed differences in initiation, growth and differentiation of tumors, while the expression of CD133 was more differentiating. A discriminating role of the markers concerning tumor stem cells could not be identified.

In summary, CD133 and cMet influence initiation and growth of tumors in the murine pancreatic carcinoma model. Still these themselves do not represent tumor stem cell markers in terms of the tumor stem cell concept.

7. Literaturverzeichnis

1. Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., DePinho, R.A. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 17 (2003). 3112-26
2. Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003). 3983-8
3. Batzler, W. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin, 2008, 6. Auflage
4. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., Vande Woude, G.F. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003). 915-25
5. Boccaccio, C., Comoglio, P.M. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* 6 (2006). 637-45
6. Canto, M.I., Goggins, M., Hruban, R.H., Petersen, G.M., Giardiello, F.M., Yeo, C., Fishman, E.K., Brune, K., Axilbund, J., Griffin, C., Ali, S., Richman, J., Jagannath, S., Kantsevoy, S.V., Kalloo, A.N. Screening for early pancreatic neoplasia in high-risk individuals: a prospective controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4 (2006). 766-81; quiz 665
7. Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., Wahl, G.M. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66 (2006). 9339-44
8. Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., Maitland, N.J. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 65 (2005). 10946-51
9. Dalerba, P., Cho, R.W., Clarke, M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58 (2007). 267-84
10. Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W.M., Clarke, M.F., Wicha, M.S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* 36 Suppl 1 (2003). 59-72
11. Eyler, C.E., Rich, J.N. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 26 (2008). 2839-45
12. Fargeas, C.A., Corbeil, D., Huttner, W.B. AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature. *Stem Cells* 21 (2003). 506-8
13. Fargeas, C.A., Huttner, W.B., Corbeil, D. Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update. *Tissue Antigens* 69 (2007). 602-6
14. Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., Vescovi, A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64 (2004). 7011-21

15. Gentile, A., Trusolino, L., Comoglio, P.M. The Met tyrosine kinase receptor in development and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 27 (2008). 85-94
16. Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., Heeschen, C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1 (2007). 313-23
17. Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., Depinho, R.A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20 (2006). 1218-49
18. Hill, R.P. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 66 (2006). 1891-5; discussion 1890
19. Hill, R.P., Perris, R. "Destemming" cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst* 99 (2007). 1435-40
20. Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V., Hruban, R.H., Lowy, A.M., Tuveson, D.A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4 (2003). 437-50
21. Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Anver, M.R., Biankin, A.V., Boivin, G.P., Furth, E.E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Lauwers, G.Y., Longnecker, D.S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G.J., Perez-Gallego, L., Redston, M., Tuveson, D.A. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 66 (2006). 95-106
22. Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., Kern, S.E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6 (2000). 2969-72
23. Hruban, R.H., Iacobuzio-Donahue, C., Wilentz, R.E., Goggins, M., Kern, S.E. Molecular pathology of pancreatic cancer. *Cancer J* 7 (2001). 251-8
24. Kern, S.E., Shibata, D. The fuzzy math of solid tumor stem cells: a perspective. *Cancer Res* 67 (2007). 8985-8
25. Koorstra, J.B., Hustinx, S.R., Offerhaus, G.J., Maitra, A. Pancreatic carcinogenesis. *Pancreatology* 8 (2008). 110-25
26. Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367 (1994). 645-8
27. Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., Simeone, D.M. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67 (2007). 1030-7
28. Ma, P.C., Maulik, G., Christensen, J., Salgia, R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev* 22 (2003). 309-25
29. Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., Hruban, R.H. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* 12 (2005). 81-91
30. Maitra, A., Hruban, R.H. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3 (2008). 157-88

31. Mazur, P.K., Einwachter, H., Lee, M., Sipos, B., Nakhai, H., Rad, R., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Radtke, F., Kloppel, G., Schmid, R.M., Siveke, J.T. Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010). 13438-43
32. Mehra, N., Penning, M., Maas, J., Beerepoot, L.V., van Daal, N., van Gils, C.H., Giles, R.H., Voest, E.E. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases. *Clin Cancer Res* 12 (2006). 4859-66
33. Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90 (1997). 5013-21
34. Mizrak, D., Brittan, M., Alison, M.R. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 214 (2008). 3-9
35. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194 (1976). 23-8
36. O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J.E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445 (2007). 106-10
37. Olempska, M., Eisenach, P.A., Ammerpohl, O., Ungefroren, H., Fandrich, F., Kalthoff, H. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6 (2007). 92-7
38. Oshima, Y., Suzuki, A., Kawashimo, K., Ishikawa, M., Ohkohchi, N., Taniguchi, H. Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132 (2007). 720-32
39. Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., Daidone, M.G. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65 (2005). 5506-11
40. Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., Morrison, S.J. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456 (2008). 593-8
41. Rajasekhar, V.K., Dalerba, P., Passegue, E., Lagasse, E., Najbauer, J. The 5th International Society for Stem Cell Research (ISSCR) Annual Meeting, June 2007. *Stem Cells* 26 (2008). 292-8
42. Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J., Collins, A.T. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 117 (2004). 3539-45
43. Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., Herlyn, M. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141 (2010). 583-94
44. Sandgren, E.P., Luetkeke, N.C., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Lee, D.C. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61 (1990). 1121-35
45. Shmelkov, S.V., Butler, J.M., Hooper, A.T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., St Clair, R., Baljevic, M., White, I., Jin, D.K., Chadburn, A., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., D'Angelica, M., Kemeny, N., Lyden, D., Rafii, S. CD133

- expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest* 118 (2008). 2111-20
46. Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D., Rafii, S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005). 715-9
 47. Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432 (2004). 396-401
 48. Siveke, J.T., Einwachter, H., Sipos, B., Lubeseder-Martellato, C., Kloppel, G., Schmid, R.M. Concomitant pancreatic activation of Kras(G12D) and Tgfa results in cystic papillary neoplasms reminiscent of human IPMN. *Cancer Cell* 12 (2007). 266-79
 49. Southam, C., Brunschwig, A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer* (1961).
 50. Virchow, R. Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. August Hirschwald, Berlin, 1858, 1. Auflage
 51. Visvader, J.E., Lindeman, G.J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8 (2008). 755-68
 52. Wagner, M., Luhrs, H., Kloppel, G., Adler, G., Schmid, R.M. Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice. *Gastroenterology* 115 (1998). 1254-62
 53. Wahl, J., Debatin, K.-M. Tumorstammzellen: Grundlagen, klinische Implikationen und Kontroversen. *onkopipeline* (2008).
 54. Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., Huttner, W.B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997). 12425-30
 55. Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D.W. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90 (1997). 5002-12
 56. Yin, S., Li, J., Hu, C., Chen, X., Yao, M., Yan, M., Jiang, G., Ge, C., Xie, H., Wan, D., Yang, S., Zheng, S., Gu, J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 120 (2007). 1444-50

8. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
APC	Allophycocyanin
BRCA2	“breast cancer 2“ (Brustkrebs 2)
°C	Grad Celsius
CA19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CCD	Charge Coupled Device
CD	“Cluster of Differentiation“
CD133 ^{+/-}	positive und negative CD133 (Population oder Zellen)
CEA	Carcino-Embryonales-Antigen
CK	<i>p48^{+/-Cre}; Kras^{+/-G12D}</i>
CKN2	<i>p48^{+/-Cre}; Kras^{+/-G12D}; N2ko</i>
CKT	<i>p48^{+/-Cre}; Kras^{+/-G12D}; Tgfa</i>
cMet	“mesenchymal-epithelial transition factor“ (mesenchymaler epithelialer Transitionsfaktor)
cMet ^{+/-}	positive und negative cMet (Population oder Zellen)
d	Tag
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DZ	Durchflußzytometrie
EDTA	“ethylenediaminetetraacetic acid“ (Äthylendiamintetraessigsäure)
FACS	“fluorescence activated cell sorting“ (Auftrennung von Zellen nach Markierung durch eine fluoreszierenden Antikörper)
FBS	“Fetal bovine serum“ (fötales Rinderserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
h	“hour“ (Stunde)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	“hepatocyte growth factor“ (Wachstumsfaktor der Hepatozyten)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
INK4A	“Inhibitor of cyclin dependent kinase 4A“ (Hemmstoff der Zyklin abhängigen Kinase 4A)
IPMN	Intraduktale papillöse muzinöse Neoplasie
<i>Kras</i>	Kirsten rat sarcoma
LKB1	=STK11; Serin/Threonin Protein Kinase 11 (Gen assoziiert mit Peutz-Jeghers Syndrom)
M.	Mittelwert
MCN	Muzinöse zystische Neoplasie
min	Minute
MLH1	mutL homolog 1 (Gen assoziiert mit HNPCC)
MMF	Midazolam, Medetomidin, Fentanyl
MRI	Klinikum rechts der Isar München
<i>N2</i>	<i>Notch 2</i>
NS	Normalserum
NOD	“non-obese diabetic“
<i>p48</i>	Untereinheit eines humanen Schadensspezifisches DNA Bindungsprotein
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphat gepufferte Saline

PCNA	“proliferating cell nuclear antigen” (nukleäres Antigen der proliferierenden Zelle)
PDAC	“pancreatic ductal adeno carcinoma” (duktales Adenokarzinom des Pankreas)
PE	Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.c.	subkutan
SCID	“severe combined immunodeficient” (schwerer kombinierter Immundefekt)
Tgf	“transforming growth factor” (Wachstums Faktor)
Tr.	Tropfen
TSZ	Tumorstammzelle(n)
TU	Technische Universität
vgl.	vergleiche
vs.	“versus“ (gegenüber gestellt)
WHO	“World Health Organisation” (Weltgesundheitsorganisation)
Wt	Wildtyp
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.1: Schematische Abbildung der Tumorbildung im Sinne des TSZ-Konzepts</i>	9
<i>Abbildung 1.2: CD133</i>	11
<i>Abbildung 1.3: cMet</i>	13
<i>Abbildung 1.4: Potentielle Entwicklungswege des PDAC</i>	15
<i>Abbildung 1.5: Tumorprogressionsmodell des PDAC</i>	15
<i>Abbildung 1.6: Relevanz des Genotypen im Bezug auf Tumorbildung und Überleben der Mäuse</i>	18
<i>Abbildung 2.1: Schema s.c.-Transplantation</i>	26
<i>Abbildung 3.1: Morphologie einer Auswahl der verwendeten Zelllinien</i>	33
<i>Abbildung 3.2: Markerstabilität im Passageverlauf</i>	35
<i>Abbildung 3.3: Graphische Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse für CD133 und cMet</i>	36
<i>Abbildung 3.4: Ursprungstumor der Maus 944</i>	37
<i>Abbildung 3.5: Progressive Pankreaskarzinomentwicklung der Maus 510079</i>	38
<i>Abbildung 3.6: Ursprungstumor der Maus 510079</i>	39
<i>Abbildung 3.7: s.c.-Tumoren der unsortierten Linien 944 und 510079</i>	40
<i>Abbildung 3.8: CK19 und PCNA Expression der s.c.-Tumoren von 944 und 510079</i>	41
<i>Abbildung 3.9: Orthotope Transplantation der Zellen der Linie 510079</i>	42
<i>Abbildung 3.10: Mikroskopische Analyse der orthotopen 510079 Tumoren</i>	43
<i>Abbildung 3.11: Durchflusszytometrische Analyse vor und nach FACS</i>	44
<i>Abbildung 3.12: IF-Färbung der Linien 944 unsortiert und nach FACS</i>	45
<i>Abbildung 3.13: Morphologie der Zellen nach FACS</i>	46
<i>Abbildung 3.14: S.c.-Tumoren nach Injektion von CD133^{+/-} Zellen</i>	47
<i>Abbildung 3.15: HE-Färbung der CD133^{+/-} s.c.-Tumoren</i>	49
<i>Abbildung 3.16: Expression von CK19 der CD133^{+/-} s.c.-Tumoren</i>	50
<i>Abbildung 3.17: IF-Färbung der CD133^{+/-} Tumoren</i>	51
<i>Abbildung 3.18: Expression von PCNA der CD133^{+/-} s.c.-Tumoren</i>	52
<i>Abbildung 3.19: Aufnahmen orthotoper CD133^{+/-} Tumoren im Wachstumsverlauf</i>	53
<i>Abbildung 3.20: Überleben der Mäuse nach orthotoper Transplantation</i>	54
<i>Abbildung 3.21: Tumoren nach orthotoper Transplantation von CD133^{+/-} Zellen</i>	54
<i>Abbildung 3.22: Mikroskopische Analyse der orthotopen CD133^{+/-} Tumoren</i>	55
<i>Abbildung 3.23: Tumoren nach s.c.-Transplantation von cMet^{+/-} Zellen</i>	57
<i>Abbildung 3.24: HE-Färbung und Expression von CK19 und PCNA der cMet^{+/-} s.c.-Tumoren</i>	58
<i>Abbildung 3.25: Aufnahmen der orthotop transplantierten cMet^{+/-} Tumorzellen im Wachstumsverlauf</i> ...	59

<i>Abbildung 3.26: Tumoren nach orthotoper Transplantation der cMet^{+/-} Population</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 3.27: Mikroskopische Analyse der orthotopen cMet^{+/-} Tumoren</i>	<i>61</i>

9.2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1: Antikörpertabelle</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 2.2: Aufstellung der verwendeten Zelllinien mit entsprechendem Genotyp</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 3.1: Wachstumsrate der verwendeten Zelllinien</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 3.2: Durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 3.3: Reinheit der FACS-sortierten Populationen</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 3.4: Tumorgrößen und Überlebenszeit nach s.c.-Transplantation von CD133^{+/-} Zellen</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 3.5: Vergleich der CD33^{+/-} s.c.-Tumoren in Abhängigkeit der injizierte Zelllinie</i>	<i>48</i>

10. Danksagung

Dr. Jens Siveke - Danke für die Vergabe der Arbeit, für die intensive Betreuung und Beratung, für die tolle Zeit im Labor, für die Möglichkeit Kongresserfahrung zu sammeln und für alles was ich lernen durfte.

Caro - Danke für den ewigen Beistand und die Gesellschaft, für mehr Spaß in der Zellkultur, für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Gestaltung der Poster, für die lustige Zeit im Labor und auf den Kongressen, für fachliche Unterstützung und Diskussionen und für die tolle Reise bevor wir alles fast hingeschmissen hätten.

An alle Mitglieder der Arbeitsgruppe - Danke für eine schöne Zeit, für so viel Beistand und kompetente Beratung, für die Einweisung in den Laboralltag und diverse Methoden und auch für die lustigen Abende außerhalb des Labors.

Dr. M. Schiemann und K. Götsch- Danke für die Zusammenarbeit beim FACS

Lena und Stefan - Danke für die nächtliche maus-chirurgische Ausbildung.

Dem Kicker

Der Espressomaschine

Meinen Eltern - Danke für die Möglichkeit zu promovieren und Medizin zu studieren und für die finanzielle Unterstützung mit allen Freiheiten die diese mit sich bringt.