

Aus der Chirurgischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von Tumorstammzellen in pankreatobiliären
Karzinomen: Der Notch-Signalweg als potentielles Therapieziel

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisabeth Seidel

aus Brandenburg an der Havel

Datum der Promotion: 18.12.2020

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

1) "Characterization of the Stem Cell Fraction in Pancreatobiliary Carcinomas: The Notch Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Target", Journal of Cancer Therapy, Special Issue zum Thema "Cancer Stem Cells", Seidel E, de Carvalho Fischer C, Neumann CCM, Reutzel-Selke A, Andreou A, Gassner J, Gogolok J, Tang P, Schirmeier A, Klein F, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB 09(06):480-502, Januar 2018; DOI: 10.4236/jct.2018.96040

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
1. Einleitung	1
1.1. Charakterisierung des duktales Adenokarzinom des Pankreas sowie des extrahepatischen Cholangiokarzinoms	1
1.1.1. Epidemiologie, Pathogenese, Prognose und Therapieoptionen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas	1
1.1.2. Epidemiologie, Pathogenese, Prognose und Therapieoptionen des extrahepatischen Cholangiokarzinoms	3
1.2. Definition und Bedeutung von Cancer Stem Cells in der Tumorgenese	5
1.3. Darstellung und physiologische Relevanz des Notch-Signalweges	6
1.4. Aktuelle Anwendung von „Targeted Therapies“ in der Tumorthherapie	8
1.5. Herleitung der Fragestellung	10
1.6. Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Material	11
2.1.1. Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hersteller	11
2.1.2. Chemikalien, Lösungen und Hersteller	12
2.2. Methoden	13
2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen	13
2.2.2. Anlegen, Pflegen und Passagieren einer Tumorzellkultur	13
2.2.3. Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung (FACS)	14
2.2.4. CellTox Green Cytotoxicity Assay	16
2.2.5. TUNEL-Färbung	17
2.2.6. Statistische Analyse	18
3. Ergebnisse	
3.1. FACS-Analyse der SP-Zellfraktion und Notch-Proteine in PDAC- und eCC-Zelllinien	18
3.1.1. Ausprägung der SP-Zellfraktion in den untersuchten Zelllinien	18
3.1.2. Charakterisierung ausgewählter Komponenten des Notch-Signalwegs in SP- und NSP-Zellfraktionen der Zelllinien	19

3.2. Darstellung apoptotischer und zytotoxischer Effekte der Gemcitabin- und GSI-IX/DAPT-Behandlung auf die PDAC- und eCC-Gesamtzellpopulationen	23
3.2.1. Detektion zytotoxischer Effekte von Gemcitabin auf die Gesamtzellpopulationen durch das CellToxGreen Cytotoxicity Assay	23
3.2.2. Untersuchung zytotoxischer Wirkungen von DAPT/GSI-IX auf die Gesamtzellpopulationen anhand des CellToxGreen Cytotoxicity Assays	29
3.2.3. Prüfung apoptotischer Effekte der Therapeutika auf die Gesamtzellpopulationen durch das TUNEL-Assay	36
3.3. FACS-Auswertung der therapeutischen Wirkung von Gemcitabin und GSI-IX/DAPT auf die SP-Zellfraktion der eCC- und PDAC-Zelllinien	40
4. Diskussion	43
4.1. Tumorstammzellen als therapeutischer Angriffspunkt	43
4.2. Beurteilung der pharmakologischen Modulation des Notch-Signalweges als „Targeted Therapy“ des PDACs und eCCs	46
4.3. Stellenwert der therapeutischen Notch-Inhibition versus Gemcitabin in Tumorstammzellen des PDACs und eCCs	49
4.4. Schlussfolgerung	52
4.5. Limitationen	52
4.6. Ausblick und weitere Forschung	55
Referenzen	59
Eidesstaatliche Versicherung	67
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	68
Lebenslauf	69
Publikationsliste	71
Danksagung	72

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Therapie des lokal begrenzten, resektablen Pankreaskarzinoms	3
Abbildung 2: Mögliche Lokalisationen des Cholangiokarzinoms	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des CSC-Modells	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs	8
Abbildung 5: Höchst-33342 Färbung mit Darstellung und Markierung der SP-Zellen	14
Abbildung 6: Beispielhafte Flow-Jo-Analyse der SP- und Non-SP-Fraktion mit Notch1	16
Abbildung 7: Zweifaktorieller Anova-Test der SP-Zellfraktionen der eCC- und PDAC-Zelllinien	19
Abbildung 8: Prozentualer Anteil von Notch1, Notch4, ADAM17, Musashi und Hes1 an der SP-Zellfraktion der PDAC-Zelllinien	20
Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Notch1, Notch4, ADAM17, Musashi und Hes1 an der NSP-Zellfraktion der PDAC-Zelllinien	21
Abbildung 10: Ausprägung ausgewählter Notch-Proteine innerhalb der SP und NSP-Fraktion der eCC-Zelllinien	22
Abbildung 11: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter PDAC-Zelllinien	24
Abbildung 12: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter eCC-Zelllinien	27
Abbildung 13: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter PDAC-Zelllinien	30
Abbildung 14: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter eCC-Zelllinien	33
Abbildung 15: TUNEL-Färbung.	37
Abbildung 16: Statistische Auswertung der TUNEL-Färbung der Zelllinien Panc1 und ASPC durch den Einfaktoriellen Anova Test	38
Abbildung 17: TUNEL-Färbung mit Zunahme des apoptotischen Signals innerhalb der eCC-Zelllinie TFK	38
Abbildung 18: Statistische Auswertung mittels Zweifaktoriellem ANOVA-Tets der Zelllinie TFK	39
Abbildung 19: Zweifaktorieller Anova-Test der durchgeführten FACS-Analyse	41
Abbildung 20: Zweifaktorieller Anova-Test der eCC-Zelllinien mit	

signifikanter Reduktion der SP-Zellpopulationen unter einer Behandlung mit 50µM GSI-IX/DAPT und 50µM Gemcitabin	42
Abbildung 21: Zweifaktorieller Anova-Test der behandelten eCC- und PDAC-Zelllinien	43
Tabelle 1: Verwendete Antikörper und Verdünnungen	15
Tabelle 2: Zweifaktorieller ANOVA-Test der Komponenten des Notch-Signalweges in den SP- und NSP-Fractionen der Zelllinien Panc1, ASPC und Capan	22
Tabelle 3: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays	27
Tabelle 4: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays	29
Tabelle 5: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays	31
Tabelle 6: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays	35

Abkürzungsverzeichnis

5-FU: 5-Fluoruracil

ABC-Transporter: ATP-binding cassette-Transporter

APACT: Adjuvant therapy for pancreatic cancer trial

BillN: Biliäre Intraepitheliale Neoplasie

BSA: Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin

CAFs: Cancer associated fibroblast, Tumor-assoziierte Fibroblasten

CC: Cholangiokarzinom

eCC: Extrahepatisches Cholangiokarzinom

pCC: Periduktales Cholangiokarzinom

dCC: Distales Cholangiokarzinom

CML: Chronisch myeloische Leukämie

CNV: Copy Number Variations

CSC: Cancer Stem Cells

CT: Computertomographie

DLL: Delta-like ligand

DMSO: Dimethylsulfoxid

EMT: Epithelial-mesenchymale Transition

ERC: Endoskopisch Retrograde Cholangiographie

EUS: Endoskopischer Ultraschall

FACS: Fluoreszenz-Aktivierete Zellsortierung bzw. Fluorescence-activated cell sorting
FOLFIRINOX: 5-FU/Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin
GEMOX: Gemcitabin und Oxaliplatin
GM-CSF: granulocyte macrophage – colony stimulating factor
GSI: Gamma-Sekretase-Inhibitor
HES: Hairy enhancer of split
iNOS: Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IPMN: Intraduktale Papilläre Muzinöse Neoplasie
IPNB: Intraduktale Papilläre Neoplasie
Jag: Jagged
MCN: Muzinöse Zystische Neoplasie
MDR1-Transporter: Multi drug resistance1-Transporter
MRCP: Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT: Magnetresonanztomographie
PDAC: Duktales Adenokarzinom des Pankreas
PanIN: Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie
PPPD: Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie
PTCD: Perkutane Transhepatische Cholangiodrainage
PSC: Primär Sklerosierende Cholangitis
SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms
SP: Side Population
TGF- β : transforming growth factor- β
Tris-HCL: Tromethamin-hydrochlorid
TUNEL: TdT-Mediated dUTP Nick End Labeling

Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) und das extrahepatische Cholangiokarzinom (eCC) sind hochmaligne Tumoren und mit einer sehr schlechten Prognose vergesellschaftet. Im klinischen Alltag zeigen beide Tumorentitäten eine ausgeprägte Resistenz gegenüber den aktuell zur Verfügung stehenden medikamentösen Therapieansätzen.

Diverse Publikationen diskutieren den Notch-Signalweg als mitursächlich für die Entstehung des PDACs und eCCs. Diese Signalkaskade beeinflusst im Rahmen der Embryonalentwicklung die Mobilisierung und Differenzierung gewebsspezifischer Vorläuferzellen. Im adulten Organismus steuert sie grundlegende zelluläre Prozesse, deren Dysregulation die maligne Entartung verschiedener Gewebe verursachen kann.

Weiterhin wird angenommen, dass so genannte Tumorstammzellen, beziehungsweise Cancer Stem Cells (CSC) die Tumorbildung induzieren können. CSCs werden als eine Subpopulation des zellulären Netzwerks eines Karzinoms beschrieben, denen eine führende Rolle in dessen Chemoresistenz, Metastasierungs- und Rezidivfähigkeit zugesprochen wird.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie beziehungsweise die Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)-Analyse zur Charakterisierung der CSCs und Notch-assoziierten Proteinen in fünf etablierten PDAC- und eCC-Zelllinien durchgeführt. Des Weiteren wurde der therapeutische Effekt eines spezifischen Notch-Inhibitors (GSI-IX beziehungsweise DAPT) auf die CSCs untersucht und mit dem des Chemotherapeutikums Gemcitabin verglichen.

Zusätzlich wurde der apoptotische und zytotoxische Effekt der Therapeutika auf die eCC- und PDAC-Zellpopulationen in Form des TUNEL- und CellToxGreen Cytotoxicity Assays untersucht. Die FACS-Analyse ergab, dass die eCC-Zellpopulationen einen signifikant höheren CSC-Anteil aufweist als die PDAC-Zelllinien ($p < 0.0001$). Zusätzlich wurde die CSC-Population der eCC-Zelllinien unter der Therapie mit DAPT ($p < 0.008$) und Gemcitabin ($p < 0.04$) signifikant reduziert. Dahingegen zeigte die CSC-Fraktion der PDAC-Zelllinien ein schwaches Ansprechen auf die Therapie.

Das CellToxGreen Cytotoxicity Assay zeigte eine signifikante Verringerung der Zellviabilität in der gesamten eCC-Zellpopulation unter der DAPT- und Gemcitabin-Therapie ($p < 0.05$), wohingegen nur moderate Effekte in den PDAC-Zelllinien beobachtet wurden. Die Auswertung des TUNEL-Apoptoseassays bestätigte diese Erkenntnisse.

Zusammenfassend zeigten die CSC-Populationen beider Tumorentitäten ein unterschiedliches Ansprechen auf die Blockade des Notch-Signalweges. Diese Erkenntnis eröffnet neue

Perspektiven auf die Therapie des eCCs. Bezogen auf die Therapieoptionen des PDACs erscheint dieser Ansatz jedoch weniger erfolgversprechend. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle der Notch-Signalkaskade und die klinische Relevanz der CSCs in Hinblick auf das Therapieansprechen beider Tumorentitäten zu determinieren.

Abstract

Pancreatic cancer and cholangiocellular carcinoma are aggressive tumors with high mortality rates and poor treatment options. Recent reports describe the Notch pathway as highly relevant for a variety of fundamental cellular processes in the embryonic and adult organism. Therefore its deregulation can induce tumorigenesis. Moreover, cancer stem cells (CSC) are discussed as a source for the formation, chemotherapeutical resistance and recurrence of tumors.

Through Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)-Analysis, the existence of cancer stem cells in eCCA- and PDAC cell lines as well as the presence of five Notch-associated proteins in this population was examined. Additionally, the effect of a specific Notch-inhibitor (DAPT-IX/GSI) and the chemotherapeutic gemcitabine on CSCs in eCCA- and PDAC cell lines was explored. To investigate whether these pharmacological agents also affect the entire cell population, TUNEL-staining indicated the rate of apoptosis in eCCA- und PDAC cell lines. Additionally, CellToxGreen Cytotoxicity Assay was used to demonstrate the cytotoxicity potential of gemcitabine and GSI in PDAC- and eCCA cell lines.

In the here presented study, FACS-analysis showed that the CSC population in eCCA cell lines is significantly larger than in PDAC cell lines ($p < 0.0001$). Contrary to the effect on PDAC cell lines, GSI-IX/DAPT ($p < 0.008$) and Gemcitabin ($p < 0.04$) treatment caused a significant decrease of the eCCA-CSC populations.

The CellToxGreen Cytotoxicity Assay indicated that GSI-IX/DAPT and Gemcitabin treatment decreases cell viability of both ECC cell lines significantly ($p < 0.05$), but reveals only moderate effects on PDAC cell lines. The rate of apoptosis underlines these results.

In conclusion, the eCCA und PDAC cell lines are different due to the percentage of CSCs and the expression of Notch-associated proteins. Particularly in regard to its effect on the CSC population, Notch-Signaling may be of therapeutic value in eCC, but seems to show no effect on more aggressive PDAC. We could hereby further support our hypothesis, that it is required to modulate cancer therapy in regard to the CSC fraction to achieve a more effective therapy against those tumour entities. As could be essential for the improvement in outcomes of the eCC patients, other trials are needed to determine the role of further Notch components.

1. Einleitung

1.1. Charakterisierung des duktales Adenokarzinom des Pankreas sowie extrahepatischen Cholangiokarzinoms

1.1.1. Epidemiologie, Pathogenese, Prognose und Therapieoptionen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine der aggressivsten Tumorerkrankungen mit steigenden Inzidenz- und hohen Mortalitätsraten (2-4). Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland führt eine steigende Anzahl der Neuerkrankungen sowohl für das männliche als auch für das weibliche Geschlecht auf. Laut der S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom von 2013 nähern sich die Inzidenz- und Mortalitätsraten in Deutschland stark an (5). Das PDAC nimmt den vierten Platz der Tumor assoziierten Todesursachen ein, wobei ein Langzeitüberleben der Patienten als eine Rarität beschrieben wird (4, 5). Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren bei Männern und 76 Jahren bei Frauen ist das Pankreaskarzinom insbesondere eine Krankheit des älteren Menschen (5).

In histopathologischer Hinsicht handelt es sich bei über 85% der Fälle um ein Adenokarzinom mit glandulärer Struktur, welches aus dem Epithel des Ductus pancreaticus hervorgeht. (2) Als ursächlich für seine Entstehung wird von einem mehrstufigen Modell der Kanzerogenese ausgegangen: Konsekutive Mutationen von diversen Tumorsuppressor- und Protoonkogenen bedingen eine maligne Entartung von zunächst benignen Zelltypen (2). Vermutlich fördern lokale Anpassungsreaktionen an anhaltende Entzündungsprozesse, beispielweise im Rahmen einer chronischen Pankreatitis sowie genetische Dispositionen, unter anderem Mutationen des Kras- und p53-Gens, das Fortschreiten der zellulären Entartung (2). Konkreter lässt sich dieser Prozess am Beispiel der so genannten Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasien (PanINs) beschreiben: Aus dem kubischen Epithel des Pankreasganges entsteht ein zylindrisches Epithel, welches vorerst als gut differenziert eingestuft wird, jedoch als Vorgängerläsion für die Entstehung eines Adenokarzinoms fungieren kann (2, 3, 6). Außerdem werden die Intraduktalen Papillären Muzinösen Neoplasien (IPMNs) beziehungsweise Muzinöse Zystische Neoplasien (MCNs) als Karzinomvorstufe beschrieben. Ähnlich wie PanINs erwachsen IPMNs aus dem Epithel des Pankreasganges, haben jedoch die Eigenschaft, Mucin zu produzieren (2). Bei den MCNs handelt es sich ebenfalls um mucinproduzierende Epithelzellen, die allerdings unabhängig vom Ductus pancreaticus entstehen und ein ovarähnliches Stroma aufweisen (2).

Die einzelnen Vorläuferläsionen erfordern ein strenges Monitoring in Hinblick auf deren Wachstumsverhalten, klinische Symptomatik, bildmorphologische Malignitätskriterien und lokale Komplikationen (7).

Die schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms wird erheblich durch dessen mangelndes Ansprechen auf aktuell bestehende Therapieansätze bedingt. Die einzige potentiell kurative Therapieoption stellt die operative Entfernung des Tumors bestenfalls in Kombination mit einer adjuvanten Chemotherapie dar (3, 4). Bezüglich des Pankreaskopfkarcinoms hat sich die partielle Pankreatikoduodenektomie nach Kausch-Whipple beziehungsweise die pyloruserhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie (PPPD) als Standardprozedur bewährt (7). Bei Befall des Pankreas corpus oder -cauda wird in der Regel die subtotale Pankreaslinksresektion mit Splenektomie durchgeführt. Postoperativ ist eine adjuvante Chemotherapie indiziert (4). Dafür stehen zur Zeit verschiedene Therapieregimen zur Verfügung (8-10).

Gelingt die radikale Resektion des Tumors im Gesunden, das heißt sind im Resektionsrand mikroskopisch keine Tumorzellen nachweisbar, erreichen 27-30% der Patienten das 5. postoperative Jahr (3, 4). Die relative 5-Jahres-Überlebensrate aller PDAC-Patienten liegt jedoch bei nur 7-8%. Dies ist unter anderem darin begründet, dass 80% aller PDACs, teilweise aufgrund der früh und aggressiv stattfindenden Fernmetastasierung, als inoperabel eingestuft werden (2). Gegenstand der Forschung ist derzeit, ob bereits vor Detektieren des Primarius ein metastasiertes Krankheitsbild im Sinne einer okkulten Metastasierung vorliegt (2).

Besteht ein lokal fortgeschrittenes Karzinom in Form einer Infiltration der Arteria mesenterica superior oder des Truncus coeliacus, stellt dies trotz einer erhöhten intraoperativen Morbidität und Mortalität keine absolute Kontraindikation für ein operatives Vorgehen dar (11-13). Spezialisierte Zentren führen bei geeigneten Patienten in diesem Fall die Karzinomresektion samt Resektion des Truncus coeliacus mittels der so genannten Appleby-Operation durch (13). Trotz einer bestehenden Infiltration von Nachbarorganen kann durch die en bloc Resektion des betroffenen Gewebes eine Entfernung im Gesunden angestrebt werden (4). Das Vorliegen einer Peritonealkarzinose, Fernmetastasen beziehungsweise nicht-regionaler Lymphknotenmetastasen gilt jedoch als absolute Kontraindikation für ein operatives Vorgehen (4).

Der palliative Therapieansatz des Pankreaskarzinoms besteht in der systemischen Chemotherapie mit Gemcitabin oder dem FOLFIRINOX-Schema in Kombination mit Taxanen beziehungsweise an Albumin gebundene Nanopartikel des Paclitaxels (9, 14). Diskutiert wird derzeit, ob sich eine additive, perkutane Strahlentherapie als sinnvoll erweisen könnte (4, 7).

Supportiv können zur Schmerzkontrolle Neurolytische Verfahren, beispielsweise die Blockade des Plexus Coeliacus eingesetzt werden (15). Bei dem Vorliegen einer symptomatischen Tumorcholestase ist die Ableitung der Gallensäure mittels endoskopisch eingesetztem Stents möglich (16). Erweist sich dieses Verfahren als unzureichend oder unmöglich, ist die Anlage einer Perkutanen Transhepatischen Cholangiodrainage (PTCD) beziehungsweise die chirurgische Anlage einer biliodigestiven Anastomose mittels Choledochusjejunostomie oder Gastroenterostomie indiziert (17-19).

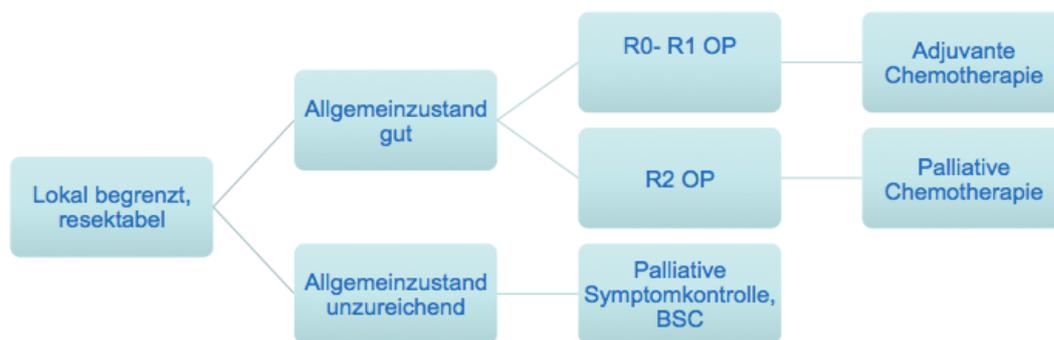


Abbildung 1: Therapie des lokal begrenzten, resektablen Pankreaskarzinoms. BSC= Best supportive care.

1.1.2. Epidemiologie, Pathogenese, Prognose und Therapieoptionen des extrahepatischen Cholangiokarzinoms

Das Cholangiokarzinom (CC) ist ein hochaggressiver Tumor mit einer steigenden Inzidenz in der westlichen Welt (20, 21). In einer vom deutschen Ärzteblatt im Jahr 2014 verfassten Übersichtsarbeit werden demografische Faktoren als ursächlich für diese epidemiologische Entwicklung angesehen (22). Das mittlere Erkrankungsalter der von dem CC betroffenen Patienten beträgt 65 Jahre, wobei eine diskrete Häufung bei dem männlichen Geschlecht zu beobachten ist (20).

Definitionsgemäß wird das CC anhand seines anatomischen Manifestationsortes in die Unterformen des intrahepatischen (iCC) und extrahepatischen (eCC) Cholangiokarzinoms unterteilt (3, 21, 23, 24). Das eCC beinhaltet die beiden Tumorentitäten des perihilären (pCC) und distalen (dCC) Cholangiokarzinoms (3, 21, 23). Das pCC, welches auch als Klatskin-Tumor bezeichnet wird, ist in der Häufigkeitsverteilung der Entitäten führend, gefolgt vom dCC (21, 23).

Als Ursprungsgewebe des pCCs werden Cholangiozyten und peribiliäre Drüsen des Leberhilus angesehen (3, 21, 23). Dieser kann vom pCC infiltriert werden (3, 21). Es kann jedoch auch exophytisch und papillär wachsend oder in nodulärer beziehungsweise sklerosierender Form auftreten (3, 21, 23). Dahingegen ist das dCCA, welches ebenfalls aus Gallengangsepithel- und -drüsenzellen hervorgeht, definitionsgemäß zwischen der Zytikusgabel und Ampulla vateri lokalisiert (3, 21, 23).

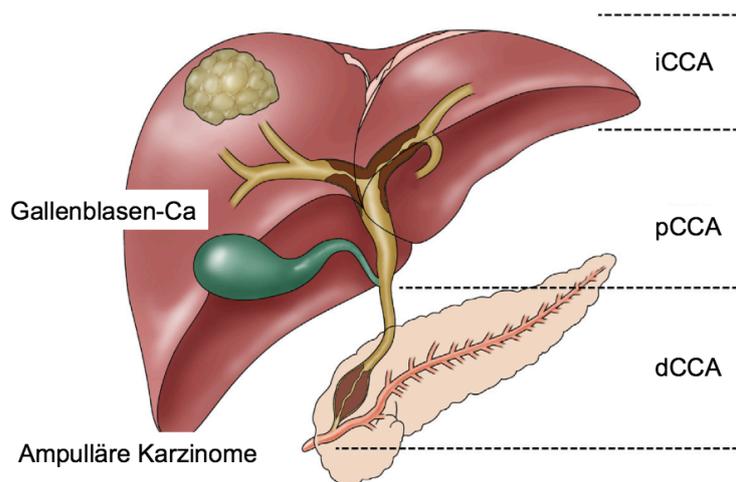


Abbildung 2: Mögliche Lokalisationen des Cholangiokarzinoms.. Vogel et al. (22)

Vergleichbar mit der Kanzerogenese des PDACs wird angenommen, dass die maligne Formation der Cholangiozyten ebenfalls sukzessiv aus benignen Vorstufen wie den Intraduktalen Papillären Neoplasien (IPNB) und Biliären Intraepithelialen Neoplasien (BillN) erfolgt (3, 23). Risikofaktoren für diese zelluläre Entartung sind beispielsweise eine anhaltende Cholestase, Choledochuszysten, eine chronisch fortschreitende Entzündung der Gallengänge, wie die primär sklerosierende Cholangitis (PSC), oder seltener eine Infektion der Gallenwege durch Leberegel (20-22). Diese Pathologien fördern sowohl DNA-Schäden in diversen Tumorsuppressor- und Protoonkogenen als auch die Dysregulation von Schlüsselproteinen der Gewebshomöostase, beispielsweise Zytokinen, Interleukinen, Tyrosinkinase und Wachstumsfaktoren (20, 21, 25). Zusätzlich existiert die Annahme, dass ein Anteil der CCs aus biliären- beziehungsweise hepatischen Stammzellen hervorgeht (20).

Analog zu denen des PDACs sind die Behandlungsmöglichkeiten des pCCs und dCCs begrenzt: Für beide Entitäten gilt die radikale Resektion als einzig kurative Therapieoption (3, 20, 23). Bezüglich des Klatskin-Tumors kann durch die etablierte chirurgische Prozedur der erweiterten Hemihepatektomie mit Lymphadenektomie und en-bloc Resektion der extrahepatischen

Gallengänge in 50% ein R0-Status erreicht werden (20). In diesem Fall variiert die 5-Jahres-Überlebensrate in der Literatur zwischen 11-41% (20, 21). Präoperativ kann eine selektive Pfortaderembolisation erfolgen, um das verbleibende Lebervolumen nach Hemihepatektomie zu maximieren (20-22). Für einzelne, aus anatomischen Gründen nicht zu resezierenden Patienten kann bei negativem Lymphknotenstatus im Rahmen von klinischen Studien eine Lebertransplantation diskutiert werden (3, 21). Kontraindikationen für einen operativen Eingriff bestehen bei dem Vorhandensein von Fernmetastasen und einer bilateralen oder kontralateralen Infiltration der Gallengänge zweiter Ordnung (21).

Bezüglich des dCCs ist die Pyloruserhaltende Pankreaskopfresektion das chirurgische Verfahren der Wahl, wodurch nach erfolgreicher R0-Resektion eine 5-Jahres-Überlebensrate von 27-30% erzielt werden kann (3, 20).

Klinische Studien befassen sich aktuell mit palliativen, lokal-ablativen Therapien des CCs, die zumeist transpapillär mittels ERC durchgeführt werden (22). Nennenswert sind diesbezüglich die Photodynamische Therapie, Radiofrequenz-Ablation, transabdominelle Chemoembolisation, selektive interne Radiotherapie und Afterloading/Brachytherapie (20, 22).

Eine wesentliche palliative Intervention stellt die mittels ERC erfolgende, einseitige oder beidseitige Stentimplantation zur Gallengangsdrainage dar (21, 22). Die palliative Erstlinien-Chemotherapie besteht aus der Kombination von Gemcitabin und Cisplatin, wodurch eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeiten beobachtet werden konnte (21, 22). Evidenzbasierte Empfehlungen für eine Zweitlinientherapie existieren derzeit nicht (20, 22). Dennoch werden bei auftretenden Unverträglichkeiten infolge der Gemcitabin-Cisplatin-Therapie alternativ 5-FU basierte Schemata angewandt (22).

1.2. Definition und Bedeutung von Cancer Stem Cells in der Tumorgenese

In der letzten Dekade orientierten sich die Theorien zur Tumorentstehung zunehmend an den so genannten Tumorstammzellen, beziehungsweise Cancer Stem Cells (CSCs). Die Annahme, Malignome bestünden aus einem homogenen Verband von Zellklonen, rückt zunehmend in den Hintergrund. Bereits in den frühen Neunzigerjahren erfolgte ein Paradigmenwechsel von diesem stochastischen Modell, in dem sich Tumorzellen in funktioneller und morphologischer Hinsicht gleichen, hin zu der Vorstellung einer zellulären Diversität und Hierarchie im Tumornetzwerk (26, 27). CSCs wurden bisher an erster Stelle dieser zellulären „Rangordnung“ postuliert (26, 27). Diese werden als kleine Subpopulation mit stammzellartigen Eigenschaften definiert: Sie weisen die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Gewebetypen, eine exzessive

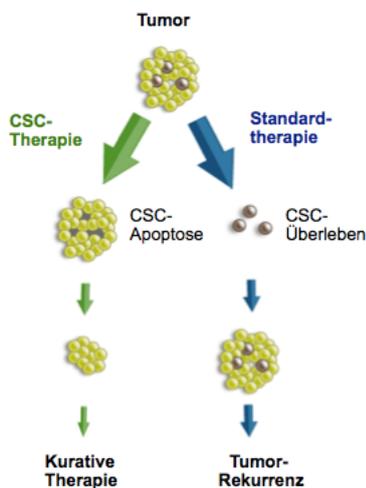


Abbildung 3: Schematische Darstellung des CSC-Modells, modifiziert nach Schmidt et al.(1)

Proliferation und Migration sowie eine symmetrische Mitose auf (27). Aufgrund dessen werden sie einerseits für die Formation zahlreicher Tumoren, andererseits für deren aggressives Rezidiv- und Metastasierungsverhalten verantwortlich gemacht (26-28). Durch den Arrest des Zellzyklus und die Suppression der Apoptose scheinen die CSCs ein potentes Selbsterneuerungspotential zu besitzen (27, 29). Damit reduzieren sie die Effektivität zahlreicher konventioneller Therapien entscheidend (27, 29).

Als ein weiterer charakteristischer Resistenzmechanismus wurden die so genannten ATP-binding cassette- (ABC)-Transporter beschrieben (26, 27, 29). Diese sind auf der Zelloberfläche der CSCs lokalisiert und ermöglichen den Efflux zytotoxischer Substanzen durch einen ATP-gebundenen Transport (26, 29).

Dementsprechend wird deren Vulnerabilität gegenüber gängigen Therapien reduziert und das Behandlungsversagen verstärkt (29). Ein Beispiel für diesen Schutzmechanismus stellt der Multidrug resistance-1 (MDR-1)-Transporter dar, der unter anderem im Mammakarzinom vermehrt exprimiert wird (29).

Insgesamt wurden bereits zahlreiche Biomarker und Oberflächengene identifiziert, welche die Charakterisierung und gezielte Therapie der CSCs ermöglichen, beispielsweise innerhalb leukämischen Erkrankungen als auch in soliden Karzinomen wie Hirntumoren (27, 29, 30).

Die Herkunft der CSCs wird kontrovers diskutiert: Ob sie bereits bestehenden Progenitorzellen entstammen oder entartete somatische Zellen stammzellartigen Eigenschaften durch spezifische äußere Einflüsse wie hypoxischen Stress erlangen können, ist derzeit noch unklar (27, 30).

1.3. Darstellung und physiologische Relevanz des Notch-Signalweges

Hinsichtlich der molekularen Entstehungsweise von Tumoren wird dem Notch-Signalweg eine führende Rolle zugeschrieben (31-41). Bereits während der zellulären Reifung eines Organismus beeinflusst er dessen regelrechte Entwicklung auf Stammzellebene (32-34, 39). Bezogen auf das pankreatobiliäre Organsystem steuert die Notch-Signalkaskade die epitheliale Ausdifferenzierung der Gangsysteme des Pankreas sowie der Gallengänge aus deren gemeinsamen embryonalen Ursprung, dem Entoderm (21, 39, 42-44). Weiterhin supprimieren Notch-spezifische Proteine einerseits die Mobilisation exo- und endokriner Zellen aus der

Stammzellreserve des Pankreas, andererseits fördern sie die Proliferation der jeweiligen Vorläuferzellen (39, 40). Dass der Notch-Signalweg eine zentrale Bedeutung für die Regulation von Stammzellen innehält, zeigt sich ebenfalls in weiteren Organsystemen: Unter seinem Einfluss wird während der embryonalen Entwicklung die Ausdifferenzierung stromaler, kardialer, gastraler, vaskulärer und neuraler Progenitorzellen inhibiert (39, 40).

Die Modulation basaler zellulärer Abläufe erfolgt indes ebenso im adulten Organismus. Die Annahme, der Notch-Signalweg sei im ausdifferenzierten Gewebe unter physiologischen Bedingungen inaktiv, wurde beispielsweise in Untersuchungen an Pankreasgewebe widerlegt (40). Die etwa durch eine Pankreatitis geschädigten azinären Zellen unterliegen während ihrer Regeneration dem erheblichen Einfluss unterschiedlicher Notch-assoziiertes Proteine (40). Anhand dieser Erkenntnisse ließ sich herleiten, dass diese auch an der Entstehung von pankreatischen Neoplasien beziehungsweise deren Vorläuferläsionen wie PanINs beteiligt sind (39, 42).

Darüber hinaus ist seine fundamentale Wirkung auf die Homöostase diverser Gewebe bekannt, bedingt durch die Beeinflussung der zellulären Proliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose (39, 40, 42). Damit spielt die Dysregulation des Notch-Signalwegs in der Kanzerogenese verschiedener hämatologischer und solider Tumoren, beispielsweise des Glioblastoms und des Mammkarzinoms eine wichtige Rolle (30). Ob die Notch-Proteine dabei als Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene agieren, ist bisher ungeklärt (40).

Im Rahmen des physiologischen Ablaufs des Signalwegs erfolgt zunächst eine juxtakrine Aktivierung der jeweiligen Zellen über die Bindung eines spezifischen Liganden (beispielsweise DLL1,2,3,4) an einen von bisher 4 bekannten transmembranären, heterodimeren Rezeptoren (Notch1-4) (39). Infolgedessen wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (NICD) unter dem Einfluss der so genannten Gamma-Sekretase und der Matrix-Metalloprotease ADAM-17 in den Nukleolus der Zelle transportiert (39). Dort findet, nach Interaktion mit einem DNA-gebundenen Transkriptionsfaktor, schließlich die Transkription diverser Zielgene, beispielsweise HES-1, statt (39). Die Repression des Signalweges kann währenddessen durch die Bindung verschiedener Ko-Faktoren erfolgen, oder aber bereits auf Rezeptorebene, beispielsweise in dem dessen Affinität gegenüber den Liganden durch chemische Modifikationen wie Glykolierungen herabgesetzt werden (39). Des Weiteren kann die Notch-Signalkaskade während der Translation durch die Bindung negativer Regulatoren, beispielsweise Numb, inhibiert werden (30). Das mRNA-bindende Protein Musashi-1 bewirkt eine Herunterregulierung von Numb, so dass Musashi-1 als Aktivator des Notch-Signalweges verstanden werden kann (30).

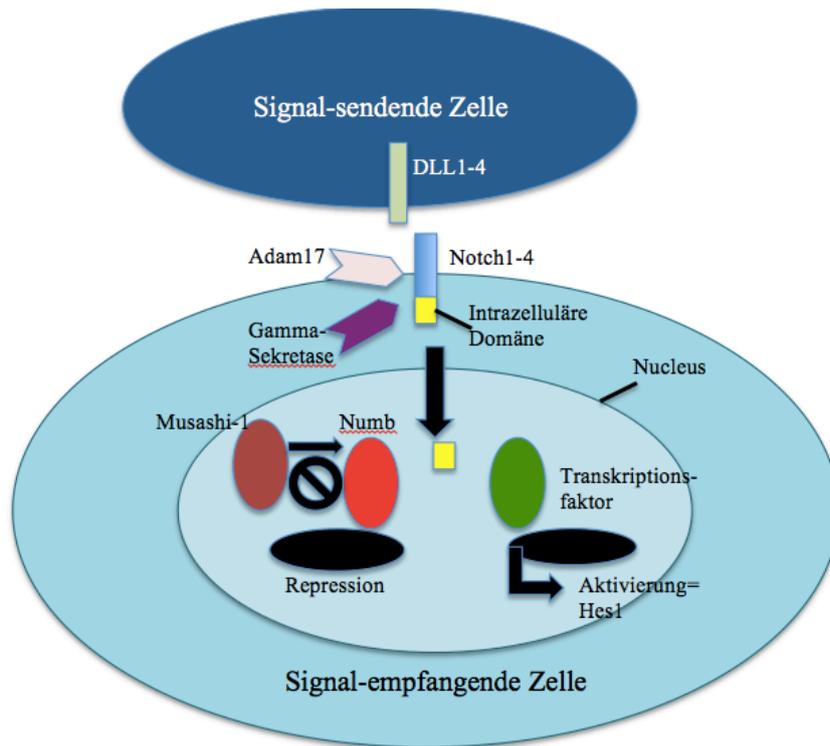


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Notch-Signalweges

1.4. Aktuelle Anwendung von “Targeted Therapies” in der Tumorthherapie

Die Anwendung der gezielten Krebstherapie beziehungsweise der so genannten „Targeted Therapies“ hat in den letzten Jahren einen wichtigen Status in der Tumorforschung erlangt. Angriffspunkt dieser neuen Therapieform stellen zuvor analysierte, beispielsweise genetische Alteration bei Patienten dar, wodurch die personalisierte Medizin einen bemerkenswerten Aufschwung erlebt (45). Die genetischen Mutationen beinhalten den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen als auch der Überexpression von Protoonkogenen auf transkriptioneller Ebene (46). Ziel sind des Weiteren auch nicht-genomische Anomalien in der Expression von Proteinen, die ein potentielles Risiko für die Tumorentstehung darstellen (46). Dysregulationen dieser molekularen Schaltstellen können durch die gezielte Krebstherapie selektiv angegriffen werden. Dies birgt den entscheidenden Vorteil gegenüber der klassischen Chemotherapie, die auf alle mitotisch aktiven Zellen gleichermaßen zytotoxisch wirkt (46).

Das Feld dieser gezielten Krebstherapie wird stetig erweitert und bezieht sich nicht nur auf die Tumorzellen als solche, sondern auch auf das sie umgebende zelluläre Milieu, bestehend aus Bindegewebs-, Immun-, Gefäßzellen, sowie deren Interaktion (46). Derzeit existieren diverse Angriffspunkte durch beispielsweise Rezeptortyrosinkinasen und intrazelluläre Kinasen,

Hormonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Immunmodulatoren und auch Stammzellsignalwege wie die Notch-Signalkaskade (46). Anhand ihrer molekularen Eigenschaften und Wirkungsweise werden sie in die Gruppen der monoklonalen Antikörper, „small molecules“ beziehungsweise Kinaseinhibitoren und RNA-Interferenzen eingeteilt (46).

Der Durchbruch der „Targeted Therapy“ gelang durch den Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib in der Behandlung der Philadelphia-Chromosom positiven chronischen myeloischen Leukämie (CML), welches das Outcome der betroffenen Patienten signifikant verbesserte (47). Der außerordentliche Erfolg dieses Medikaments motivierte viele Arbeitsgruppen weltweit, auch in soliden Tumoren diverse molekulare Schaltstellen als potentielle Therapieziele in Betracht zu ziehen (47). Beispiele für eine gelungene klinische Etablierung dieser Substanzen bestehen unter anderem in der Therapie des HER2neu-positiven Mammakarzinoms mit dem Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Trastuzumab sowie des metastasierten Kolonkarzinoms mit den VEGF- und EGFR-Antikörpern Bevacizumab und Cetuximab (46).

Auch in der palliativen Therapie des Pankreaskarzinoms hat die gezielte Krebstherapie Einzug gefunden. Laut der S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom verlängert die Kombinationstherapie von Gemcitabin und dem EGF-Rezeptortyrosinkinaseinhibitor Erlotinib das Überleben von betroffenen Patienten signifikant. Der evidenzbasierten Empfehlung der Leitlinie folgend, kann der Einsatz weiterer „Targeted Therapies“ außerhalb von kontrollierten Studien jedoch noch nicht empfohlen werden.

Die Therapie des Gallengangskarzinoms betreffend wurden die „Targeted Therapies“ vielversprechend im experimentellen Umfeld eingesetzt (48). Randomisierte, klinische Phase-II-Studien befassen sich derzeit mit der Erprobung von Erlotinib, Cetuximab, Bevacizumab, dem VEGFR-/BRAF-Antikörper Sorafinib und dem EGFR-/HER2-Antagonisten Lapatinib als Monotherapie oder in Kombination mit Gemcitabin/Oxaliplatin (25). Der klinische Routineeinsatz dieser Substanzen konnte bisher jedoch noch nicht sichergestellt werden (20).

Aktuell zielen diverse Forschungsvorhaben darauf ab, ihre Kenntnisse über stammzellrelevante Bio- und Oberflächenmarker hinsichtlich der gezielten Krebstherapie zu nutzen. In einer multizentrischen, internationalen Phase-II-Studie wurde beispielsweise der stammzellspezifische CD95-Antagonist APG101 innerhalb eines Glioblastom-Patientenkollektiv getestet (49). Durch dessen Einsatz konnten verlängerte Überlebenszeiten und eine erhöhte Lebensqualität beobachtet werden (49).

1.5. Herleitung der Fragestellung

Pankreatobiliäre Neoplasien, welche vom Gangepithel des Pankreaskopfes und der distalen Gallenwege ausgehen, weisen nicht nur den selben embryologischen Ursprung auf, sondern gleichen sich sowohl in ihrer morphologischen als auch histopathologischen Erscheinung (6). Die Differenzierung der beiden Tumorentitäten wird ferner durch ihre enge anatomische Nähe, ähnlichem Wachstumsmuster und phänotypischen Analogien erschwert (6). Des Weiteren teilen sie funktionelle Eigenschaften, wie eine dramatisch niedrige Lebenserwartung und schlechte therapeutische Outcomes (6). Diese ergeben sich unter anderem aus der deutlichen Resistenz beider Tumorentitäten gegenüber konventionellen Chemotherapeutika (6). Somit existieren hinsichtlich der kurativen Therapie des CCs momentan keine randomisierten, prospektiven, statistisch hochwertigen Studien, die einen klaren Überlebensvorteil der Patienten durch ein spezifisches Chemotherapieregime aufzeigen (20). Von prognostischer Bedeutung sind ebenfalls die Rezidivraten, die sich nach Resektion des CCs innerhalb der ersten 3 postoperativen Jahren mit 85% außerordentlich hoch zeigen (22). Bedauernswerter Weise stellen sich die Zahlen hinsichtlich der Prognose beim Pankreaskarzinom ähnlich ernüchternd dar, so dass es unbedingt notwendig ist, neue therapeutische Optionen für beide Tumorentitäten zu evaluieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Tumorstammzellen sowie den stammzellrelevanten Notch-Signalweg als mögliche Angriffspunkte für eine Tumorthherapie zu untersuchen. Die Widerstandsfähigkeit der CSCs gegenüber konventionellen Therapieregimen determinieren das maligne Potential diverser Tumoren entscheidend (26, 29). Obwohl deren histologische und funktionelle Charakteristika Gegenstand intensiver Untersuchungen sind, bleiben bisher viele Fragen unbeantwortet. Trotz vielversprechender Vorarbeiten ist die Rolle des Notch-Signalwegs in der Entwicklung und Aktivierung von CSCs ebenfalls noch nicht abschließend geklärt.

1.6. Fragestellung

Primär

Zielstellung der folgenden Studie ist es, charakteristische Eigenschaften von Tumorstammzellen des PDACs und eCCs *in vitro* zu evaluieren. Durch die FACS-Methode soll zunächst eine quantitative Analyse der CSCs in den entsprechenden Zelllinien durchgeführt werden.

Angestrebt wird ebenfalls die Charakterisierung Notch-assoziiierter Antigene sowohl in der Gesamtzell- als auch CSC-Population. Um die therapeutische Relevanz des Notch-Signalwegs

zu beurteilen, wird dessen selektive Blockierung durch einen Gamma-Sekretase-Inhibitor (GSI-IX/DAPT) untersucht.

In einem weiteren Schritt soll die therapeutische Effektivität des konventionellen Chemotherapeutikums Gemcitabin mit dem des molekularen Notch-Inhibitors GSI-IX sowohl auf die Gesamtzell- als auch CSC-Population verglichen werden.

Sekundär

Durch den Vergleich des therapeutischen Effekts von Gemcitabin und DAPT soll einerseits das maligne Potential der CSCs analysiert und andererseits der Notch-Signalweg als potentielles therapeutisches Ziel im Rahmen der „Targeted Therapy“ eruiert werden. Die Untersuchung dieses Signalweges kann zur Aufklärung molekularer Entstehungsmechanismen von pankreatobiliären Tumorerkrankungen beitragen und somit der Gewinnung neuer therapeutischer Ansatzpunkte dienen. Das Verständnis über die dysregulierten Mechanismen sowohl in Hinblick auf CSCs als auch den Notch-Signalweg soll zur Durchführung weiterer Studien motivieren, die langfristig eine Verbesserung klinischer Outcomes von betroffenen Patienten bedingen könnten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verbrauchsmaterialien, Geräte und Hersteller

Verbrauchsmaterialien und Geräte	Hersteller
Autoklaviergerät	Schütt
Brutschrank für Zellkulturen	Labotec
Eppendorf-Pipetten 10, 20, 50, 100ml	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
FACS LSRII	BD Scientific
Gefrierschrank, Kühlschrank	Liebherr
Gewebekulturflaschen 25, 50ml	Falcon
Glaswaren	Schott
Kühlschrank	Liebherr
Mikroliterpipetten	Gibson
Mikrowelle, Mikrowellengefäße	AEG
Neubauer Zählkammer	Resistance

Petrischalen	Falcon
Plattenleser	Optima
Pipettenspitzen	Eppendorf
Sterifilter CellTrics	Sysmex
Sterilwerkbank	Haraeus
Orbitalschüttler	VWR
Plate Reader	Optima
Vortexer	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert, Julabo
Zentrifuge	Haraeus, Sigma
Zentrifugenröhren	Falcon
96-Well Assay-Mikrotiterplatten, schwarz, mit klarem Boden, F-Bottom	Greiner Bio One
12-Well Assay-Platten	Falcon

2.1.2. Chemikalien, Lösungen und Hersteller

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Antibiotika-Stammlösung Penicillin, Streptomycin, Cotrimoxazol	Gibco, Ratiopharm
CellTox Green Cytotoxicity Assay Kit	Promega
Calciumdihydrat	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid	Biochem
Formalin	Sigma Aldrich
Fetales Kälberserum	Gibco
Gamma-Sekretase-Inhibitor DAPT	Sigma Aldrich
Gemcitabin	Hexal
Hoechst-33342 Farbstoff	Abcam
In Situ Cell Death Detection Kit TMR red	Roche
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich
RPMI 1640 Medium	Gibco
Rinderserumalbumin	Gibco
PBS-Puffer	Thermo Fischer
Propidium Iodid	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom

Trisodiumcitrat

Sigma Aldrich

Verapamil Hydrochlorid

Sigma Aldrich

2.2. Methoden

2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen

Um Kontaminationen der Zellkultur zu vermeiden, wurde eine aseptische Arbeitstechnik und das regelmäßige Desinfizieren der Arbeitsflächen sichergestellt.

Artikel für die Zellkultur wurden steril verpackt erworben und nach einmaliger Anwendung entsorgt. Hitzebeständige Materialien wurden für 25 Minuten bei 120° autoklaviert. Nicht-hitzebeständige Materialien, Lösungen und Chemikalien wurden sterilfiltriert.

2.2.2. Anlegen, Pflegen und Passagieren der Tumorzellkulturen

Für die folgenden Experimente wurden einschichtige Zellkulturen aus jeweils drei etablierten PDAC-Zelllinien (Panc-1, Capan, ASPC) und zwei eCC-Zelllinien (EGI, TFK) verwendet.

Nach dem Auftauen aus der -80°C Kryokonservierung wurden die Zelllinien in ein 10ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit RPMI-Medium versetzt. In einem weiteren Schritt erfolgte die Zentrifugation der Zellen, um das im Einfriermedium enthaltene, zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) zu eliminieren. Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Überstandes und der Resuspension der Zellen in RPMI-Medium wurden sie in eine 75cm² Zellkulturflasche übertragen. Dem RPMI-Medium wurden zur Kultivierung der Zelllinien 10% fetales Kälberserum sowie 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin und 480mg/5ml Cotrimoxazol zugesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 Grad Celsius und fünfprozentiger CO₂-haltiger, befeuchteter Luft. Alle drei Tage wurde ein Wechsel des Nährmediums durchgeführt.

Etwa alle sieben bis 10 Tage erreichten die Zellen eine Konfluenz von circa 80%, so dass die Subkultivierung beziehungsweise das Passagieren der Zelllinien erforderlich wurde. Hierzu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und Spülung mit einem PBS-Waschpuffer für drei Minuten mit 10ml 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS bei 37 Grad Celsius inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert, resuspendiert und die Zellzahl nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die erneute Aussaat der Zellen erfolgte bei einer Dichte von 20.000-30.000 Zellen in einer 75cm²-Zellkulturflasche.

Häufige Komplikationen des Gebrauchs von Zelllinien, wie das Auftreten von Kreuzkontaminationen zwischen Zellen verschiedener Herkunft sowie Verunreinigungen mit Bakterien oder Pilzen konnten in unseren Versuchen durch stichprobenartige Untersuchungen vermieden werden.

2.2.3. Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung (FACS)

Um eine quantitative Analyse der CSCs und Notch-assoziierten Proteinen in den PDAC- und eCC Zelllinien durchzuführen, sowie den therapeutischen Effekt des spezifischen Notch-Inhibitors GSI-IX zu evaluieren, wurde die Fluoreszenz-Aktivierte Zellsortierung (FACS) durchgeführt. Diese Methode wurde bereits 1996 für die Analyse hämatopoetischer Stammzellen beschrieben und seither erfolgreich bei einer Vielzahl solider Tumoren angewandt (50-54). Die FACS-Methode nutzt die Eigenschaft der CSCs, neben Zytostatika auch diverse weitere Substanzen wie den Fluoreszenzfarbstoff Höchst-33342 durch einen ATP-gebundenen Effluxtransporter aus dem Zellinneren zu schleusen. Nach der Färbung mit Höchst-33342 entsteht dementsprechend eine charakteristische Minderfärbung von Zellen mit einer hohen Transporterdichte, die daraufhin als Side Population Cells oder SP-Zellen bezeichnet werden. Die übrigen Zellen werden als Non-SP- beziehungsweise NSP-Zellen beschrieben. Da dieser transmembranäre Transport calciumabhängig ist, wird die Minderfärbung der SP-Zellen durch den Calciumkanalblocker Verapamil aufgehoben. Anhand dieser Negativkontrolle kann in der folgenden Analyse ein spezifisches Analysefenster („Gate“) festgelegt werden, welches die SP-Zellen markiert. Somit können die CSCs der experimentellen Analyse zugänglich und in funktioneller Hinsicht von dem ursprünglichen, heterogenen Zellverband differenziert werden.

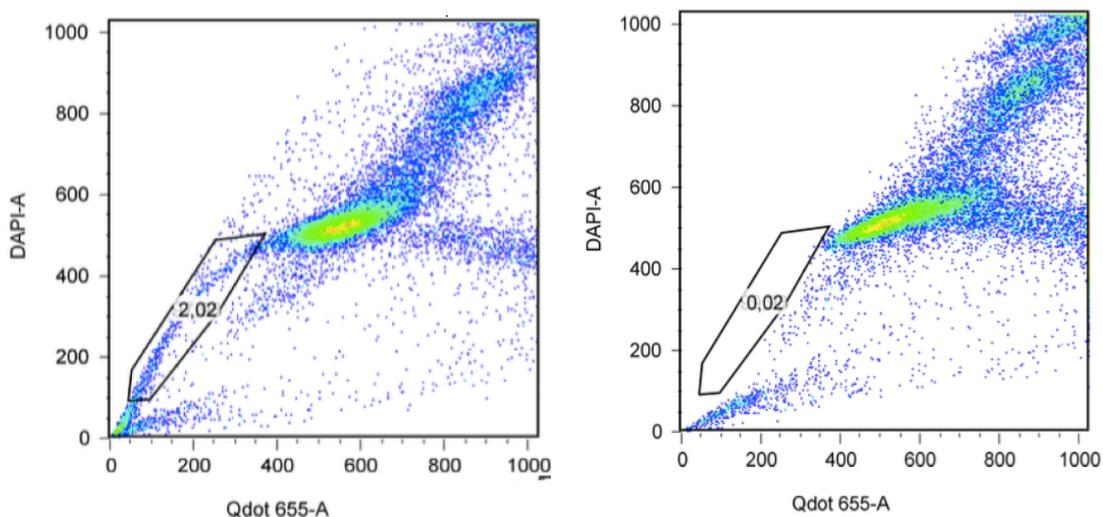


Abbildung 5: Höchst-33342 Färbung mit Darstellung und Markierung der SP-Zellen (links, 2,02%) anhand der Negativkontrolle mit Verapamil (rechts).

Für die FACS-Versuche wurden die jeweiligen Zellen durch Trypsinierung geerntet und exakt gezählt. Nach der Zentrifugation, dem Waschen und der Resuspendierung in der PBS-Pufferlösung wurden die Zelllinien mit dem Höchst-33342 Farbstoff in einer Konzentration von $5\mu\text{l/ml}/10^6$ Zellen/ml für 90 Minuten bei 37 Grad Celsius unter Lichtabschirmung inkubiert. Der Negativkontrolle wurde $4\mu\text{l/ml}$ Verapamilhydrochlorid, verdünnt in destilliertem Wasser, zugesetzt. Es folgten drei Waschschritte mit einer PBS-Pufferlösung.

Anschließend erfolgte eine Antikörperfärbung, um die Existenz beziehungsweise Dysregulation Notch-assoziiierter Proteine in den Zelllinien zu untersuchen. Dazu wurden die Höchst-gefärbten Zelllinien zunächst mit den in Tabelle 1 aufgeführten, verdünnten Notch-spezifischen Primärantikörpern, anschließend mit einem APC-konjugiertem Sekundärantikörper für 15 Minuten bei 4° inkubiert.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
Notch1	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	1: 249,5
Notch4	BioLegend, San Diego, USA	1: 65,33
Adam17	Antikörper online	1: 28,94
Musashi	Antikörper online	1: 30,18
Hes1	St. John's Laboratory, London, UK	1: 33,89
APC-konjugierter Sekundärantikörper	Antikörper online	1: 99

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und Verdünnungen.

Bis zur endgültigen Analyse verblieben die Zellen durchgehend bei 4 Grad Celsius. Um Zellaggregate zu vermeiden, wurde die Zellsuspension unmittelbar vor der Messung durch einen Mikrofilter pipettiert.

Die FACS-Analyse erfolgte durch das LSRII Flow-Zytometer. Die Anregung des Hoechst Farbstoffs wurde mit einem ultravioletten Laser erreicht (350 nm). Für die Trennung der Emissionen wurde ein dichroitischer (zweifarbiger) Filter verwendet. Die Emission wurde durch einen 450/50 420LP (blau) bzw. 675/50 635LP (rot) Filter gemessen. Unmittelbar vor der Analyse wurde das DNA-spezifische Fluochrom Propidium Iodid (PJ) appliziert, wodurch defekte Zellen exkludiert und die Viabilität der Zellsuspension sichergestellt werden konnten. Die Fluoreszenz von PJ wurde ebenso durch einen 675/50 635LP Filter gemessen, erschien jedoch deutlich Heller als das Signal von Hoechst rot. Die Signale wurden in linearer Form auf

einem rot gegen blau Diagramm aufgetragen. Die endgültige Auswertung erfolgte durch das so genannte FlowJo-Programm.

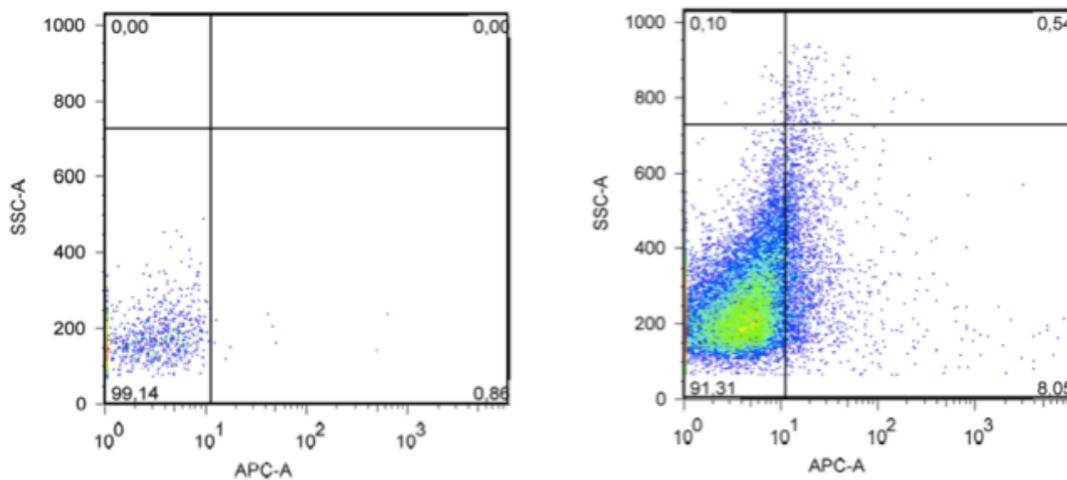


Abbildung 6: Beispielhafte FlowJo-Analyse der Antikörperfärbung der SP-(links) und Non-SP-Fraktion (NSP) mit Notch1.

Um die therapeutische Wirksamkeit des Notch-Inhibitors GSI-IX/DAPT und Gemcitabin auf die SP-Zellen zu untersuchen, wurden 2×10^5 Zellen in eine klare 12 Well-Assay-Platte überführt. 24 Stunden nach dem Aussetzen wurden die Zelllinien mit 10, 30, 50 μ M GSI-IX/DAPT oder 50 μ M Gemcitabin (1mg/ml) behandelt. Nach dem Ablauf von 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, trypsinisiert, mit Höchst-33342 gefärbt und gewaschen, um schließlich der FACS-Analyse zugeführt zu werden.

Alle Experimente wurden in mindestens vier Durchläufen wiederholt.

2.2.4. CellTox Green Cytotoxicity Assay

Der zytotoxische Effekt des Gamma-Sekretase-Inhibitors DAPT und Gemcitabin auf die Gesamtzellpopulation wurde durch das CellTox Green Cytotoxicity Assay untersucht. Dieses Experiment zielt darauf ab, Veränderungen in der Membranintegrität einer Zelle durch einen fluoreszierenden grünen Farbstoff zu detektieren. Dieser wird durch genomische DNA aktiviert, welche durch die Zerstörungen von Kern- und äußerer Zellmembran freigesetzt wird. Die Intensität der Färbung ist dementsprechend proportional zu der Anzahl toter Zellen.

Für das Experiment wurden die Zelllinien in 96-Well Assay-Mikrotiterplatten mit einer Dichte von 2×10^3 Zellen/Well für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die CellTox Green Farbstofflösung in einer 1:500 Verdünnung, als auch 5, 10, 30, 50 μ M DAPT oder 10, 50, 100,

500, 1000 μM Gemcitabin, in Nährmedium gelöst, hinzugeführt. Jene Wells, die nur mit Nährmedium behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle. Die Positivkontrolle wurde mit einer 0,1 prozentigen Tritonlösung behandelt, die eine Zerstörung der äußeren- und Kernmembran verursachte.

Während der Etablierung wurde die Sensitivität des Assays anhand des Herstellerprotokolls durch die Berechnung der so genannten „Noise-to-signal-rate“ mit über 95 Prozent getestet. Daraufhin erfolgte die Quantifizierung der Zytotoxizität der untersuchten Therapeutika durch den Optima Plate Reader bei 492nm Exzitation und 520nm Emission. Die Auswertung der Messergebnisse wurde 0, 24 und 48 Stunden nach der applizierten Behandlung durchgeführt. Die CellTox Green Cytotoxicity Assay-Experimente erfolgten mindestens drei Mal.

2.2.5. TUNEL-Färbung

Anhand der durchgeführten TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung wurde die Apoptoserate in der Gesamtzellpopulation nach der Behandlung mit Gemcitabin und GSI-IX bestimmt. Das Prinzip des TUNEL-Assays basiert auf der enzymatisch gesteuerten Fluoreszenzmarkierung von DNA-Bruchstücken, die in der frühen Phase der Apoptose entstehen. Die Färbung erfolgte durch das Situ Cell Death Detection Kit.

Nach dem korrekten Ernten und Zählen wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^3$ in schwarze 96-Well Assay-Mikrotiterplatten mit klarem Boden überführt und unter den in 2.2.2. beschriebenen Standardkonditionen über Nacht im Brutschrank belassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit den im Nährmedium gelösten Therapeutika in folgenden Konzentrationen inkubiert: 5, 10, 30, 50 μM DAPT oder 10, 50, 100, 500, 1000 μM Gemcitabin. Nach 48 Stunden wurden die behandelten Zellen mit vierprozentigem Formaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde anschließend eine 0,1 prozentige Triton-Trisodiumcitrat-PBS-Lösung für zwei Minuten bei vier Grad Celsius aufgetragen. Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation der Positivkontrolle mit einer Lösung aus Bovinem Serumalbumin (BSA), Tris-HCL (Tromethamin-hydrochlorid), Magnesiumchlorid, Calciumhydrat und DNase für 30 Minuten bei 37 Grad Celcius. Durch diese Lösung wurde die Zerstörung der Zellmembranen und Freisetzung der DNA-Bruchstücke innerhalb der Positivkontrolle sichergestellt. Nach einem weiteren Waschschrift mit der PBS-Pufferlösung wurde die Färbung in Dunkelheit durchgeführt. Dafür wurde eine Negativkontrolle mit der vom Kit bereitgestellten „label solution“ und die übrigen Wells mit der „enzyme solution“ beimpft. Im Anschluss wurden die gefärbten Zellkerne durch ein

Fluoreszenzmikroskop visualisiert und bei einer 20fachen Vergrößerung in vier Blickfeldern mittels der Software ImageJ manuell gezählt.

Das TUNEL-Assay wurde mindestens dreimal wiederholt.

2.2.6. Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde die GraphPad Prism Software (Version 6.0e für Macintosh) verwendet. Die generierten Messwerte wurden durch Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) und beziehungsweise oder Standardfehler (SE) zusammengefasst, um eine deskriptive Statistik zu erstellen. Die Normalverteilung der Daten wurde durch die D'Agostino und Pearson Omnibus Normalitätstests untersucht. Im Falle einer gegebenen Normalverteilung wurden die Messwerte durch den t-Test verglichen. Der Vergleich nicht-normalverteilter Daten erfolgte durch den Mann-Whitney-Test.

Ein einfaktorielles ANOVA (One-Way Analysis of Variance) oder der parameterfreie Kruskal-Wallis-Test wurden angewandt, um multiple Gruppen hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz zu überprüfen. Diese wurde anschließend durch den post-hoc-Test (Turkey's and Dunn's) bestätigt.

Um den Unterschied von verschiedenen multiplen Variablen zu untersuchen, wurde der zweifaktorielle ANOVA (Two-Way Analysis Of Variance) mit anschließendem Post-hoc-Test (Tukey's) für den paarweisen Vergleich durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein P von >0.05 gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. FACS-Analyse der SP-Zellfraktion und Notch-Proteinen in PDAC- und eCC-Zelllinien

3.1.1. Ausprägung der SP-Zellfraktion in den untersuchten Zelllinien

Zunächst erfolgte der Nachweis der SP-Zellen durch die FACS-Analyse in den PDAC- (Panc1, ASPC, Capan) und eCC-Zelllinien (TFK, EGI).

Der durchschnittliche Prozentsatz der SP-Zellen in den PDAC-Zelllinien beträgt dabei 1.1% bis 2.1% ($n=13$, $M 1.68 \pm 0.12$, $SD 0.64$) und 2.1% bis 5.1% ($n=29$, $M 3.83 \pm 0.45$, $SD 1.6$) in den eCC-Zelllinien. Demzufolge zeigen die eCC-Zelllinien einen signifikant höheren SP-Zellanteil als die PDAC-Zelllinien ($p < 0.0001$, Abbildung 7). Des Weiteren sind zwischen den PDAC-Zelllinien signifikante Unterschiede in der Ausprägung der SP-Zellfraktionen zu beobachten. Somit zeigt die Zelllinie Panc-1 ($n=11$, $M 2.13 \pm 0.13$, $SD 0.40$) einen höheren SP-Zellanteil als

die Zelllinien ASPC (n=10, M 1.41±0.22, SD 0.69, p=0.02) und Capan (n=9, M 1.47±0.19, SD 0.56, p=0.03, Abbildung 7). Zwischen dem Anteil der SP-Zellen in den eCC-Zelllinien EGI und TFK kann kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

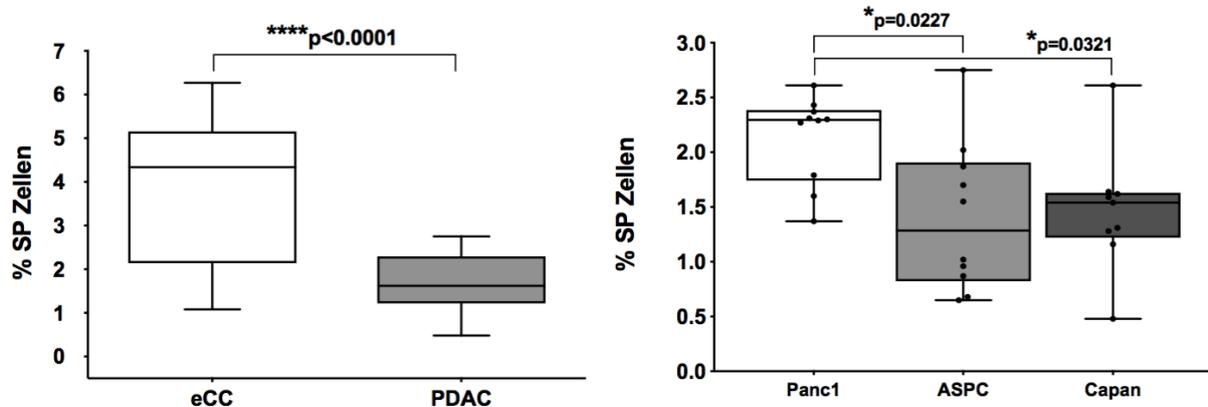


Abbildung 7. Links: Zweifaktorieller Anova-Test der SP-Zellfraktionen der eCC- und PDAC-Zelllinien. Die eCC-Zelllinien weisen einen signifikant höheren SP-Zellanteil als die PDAC-Zelllinien (Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben) auf. Rechts: SP-Zellfraktionen der untersuchten PDAC-Zelllinien. Panc1 zeigt die größte SP-Zellfraktion, gefolgt von ASPC und Capan.

3.1.2. Charakterisierung ausgewählter Komponenten des Notch-Signalwegs in SP- und NSP-Zellfraktionen der Zelllinien

Nachdem der Nachweis von SP-Zellen in den PDAC- und eCC-Zelllinien erfolgte, wurde die Aktivität des Notch-Signalwegs in dieser Subpopulation untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Höchst-Antikörperfärbung mit fünf spezifischen Notch-Proteinen (Notch1, Notch4, Adam17, Musashi, Hes1) durchgeführt und mittels FACS-Durchflusszytometrie ausgewertet. Dieses Experiment legt dar, dass die ausgewählten Notch-assoziierten Proteine innerhalb der SP-Fraktion aller untersuchten Zelllinien vorhanden sind (Abbildung 6, Tabelle 2).

Die SP-Zellfraktion der PDAC-Zelllinie Panc1 zeigt einen hohen prozentualen Anteil der Proteine Notch1 und Hes1, wohingegen die ASPC- und Capan-SP-Zellen einen nur moderaten Prozentsatz derselben aufweisen (Abbildung 8, Tabelle 2). Ein statistisch signifikanter Unterschied kann jedoch weder zwischen den Zelllinien, noch im Vergleich zu der Höchst-Kontrolle festgestellt werden (siehe Tabelle 2). Ebenfalls hinsichtlich der prozentualen Anteile von Notch4 und Musashi unterschieden sich die SP-Zellfraktionen der drei Zelllinien nicht signifikant (Abbildung 8, Tabelle 2). Die Notch-spezifische Antigen ADAM17 zeigt sich vermehrt in den Panc1- und ASPC-SP-Zellen, wohingegen sie in Capan-SP-Zellen nur in

geringer Prozentzahl vorhanden ist (Abbildung 8, Tabelle 2). Auch hier kann kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien ermittelt werden. Insgesamt zeigt die Zelllinie Capan die geringste Ausprägung aller Notch- Proteine. Diese ist im Vergleich zu den ASPC- und Panc1-Zelllinien sowie zu der Höchst-Kontrolle jedoch nicht statistisch signifikant verringert (Abbildung 8, Tabelle 2).

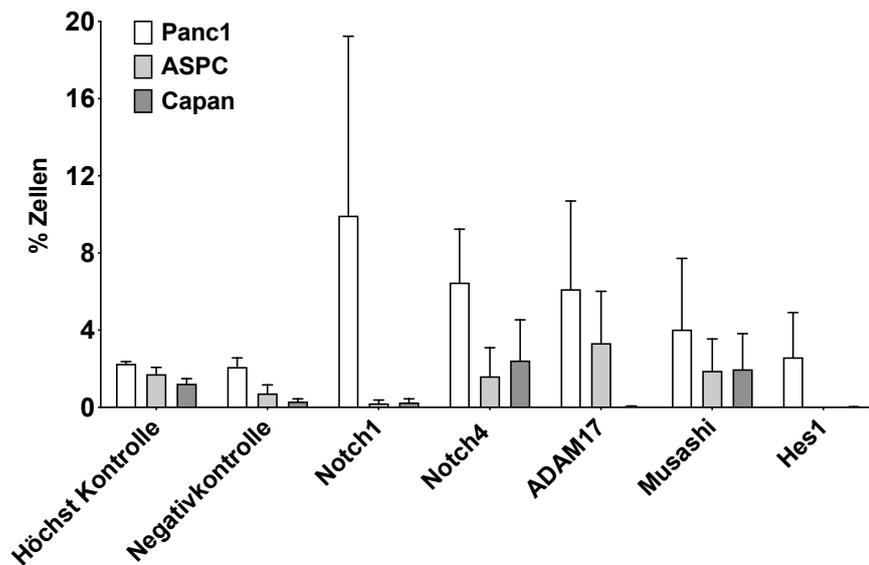


Abbildung 8: Prozentualer Anteil von Notch1, Notch4, ADAM17, Musashi und Hes1 an der SP-Zellfraktion der PDAC-Zelllinien.

Die NSP-Fraktion der PDAC-Zelllinien betreffend, zeigt Panc1 insgesamt den höchsten prozentualen Anteil der untersuchten Notch-Proteine, wohingegen ASPC und Capan geringere Prozentwerte aufweisen (Abbildung 9, Tabelle 2). Am deutlichsten wird diese Verteilung anhand der Proteine Notch1, Musashi und Hes1 (Abbildung 9, Tabelle 2). Diese erreicht jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Tabelle 2). Auch Verglichen mit der SP-Fraktion der PDAC-Zelllinien konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.

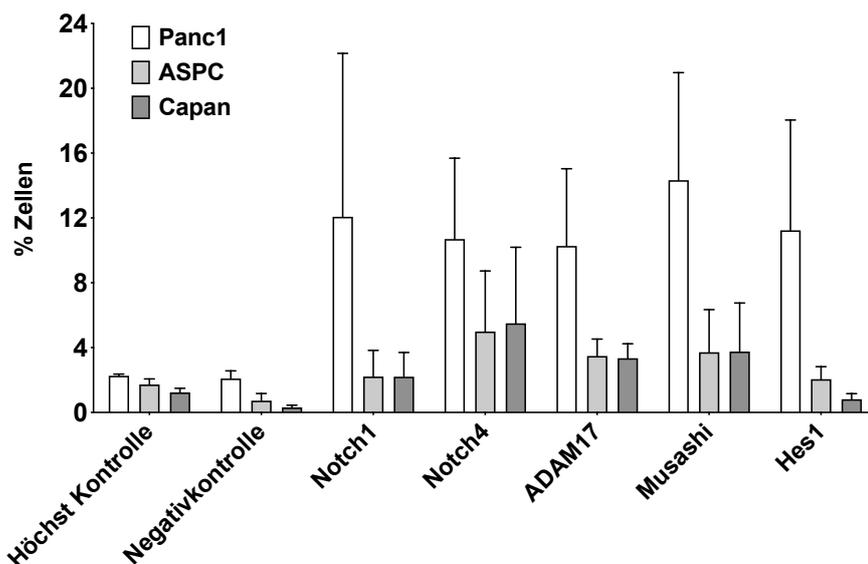


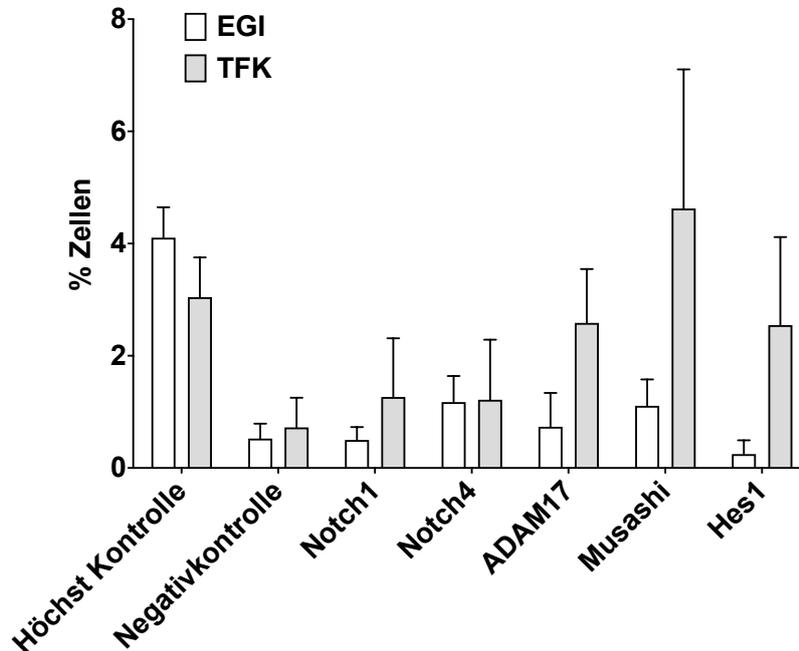
Abbildung 9: Prozentualer Anteil von Notch1, Notch4, ADAM17, Musashi und Hes1 an der NSP-Fraktion der PDAC-Zelllinien

Zelllinie, Antikörper	Mittlere Differenz	p-Wert	Standardfehler
Panc1			
Höchst vs. Notch1 SP	-7,675	0,6798	5,372
Höchst vs. Notch1 Non SP	-9,808	0,3906	5,372
Höchst vs. Notch4 SP	-4,208	0,9884	5,372
Höchst vs. Notch4 Non SP	-8,438	0,5713	5,372
Höchst vs. ADAM17 SP	-3,865	0,9917	5,372
Höchst vs. ADAM17 NonSP	-8,008	0,6325	5,372
Höchst vs. Musashi SP	-1,775	0,9996	5,372
Höchst vs. Musashi Non SP	-12,07	0,1771	5,372
Höchst vs. Hes1 SP	-0,3330	> 0,9999	5,372
Höchst vs. Hes1 Non SP	-8,978	0,4968	5,372
ASPC			
Höchst vs. Notch1 SP	1,510	0,9997	5,885
Höchst vs. Notch1 Non SP	-0,4880	0,9999	5,885
Höchst vs. Notch4 SP	0,1060	> 0,9999	5,885
Höchst vs. Notch4 Non SP	-3,272	0,9991	5,885
Höchst vs. ADAM17 SP	-1,612	0,9996	5,885
Höchst vs. ADAM17 NonSP	-1,758	0,9996	5,885
Höchst vs. Musashi SP	-0,1760	> 0,9999	5,885
Höchst vs. Musashi Non SP	-1,994	0,9995	5,885
Höchst vs. Hes1 SP	1,722	0,9996	5,885
Höchst vs. Hes1 Non SP	-0,3280	> 0,9999	5,885
Capan			
Höchst vs. Notch1 SP	0,9750	0,9998	6,580
Höchst vs. Notch1 Non SP	-0,9780	0,9998	6,580

Höchst vs. Notch4 SP	-1,203	0,9997	6,580
Höchst vs. Notch4 Non SP	-4,273	0,9960	6,580
Höchst vs. ADAM17 SP	1,193	0,9997	6,580
Höchst vs. ADAM17 NonSP	-2,118	0,9996	6,580
Höchst vs. Musashi SP	-0,7500	0,9999	6,580
Höchst vs. Musashi Non SP	-2,523	0,9994	6,580
Höchst vs. Hes1 SP	1,210	0,9997	6,580
Höchst vs. Hes1 Non SP	0,4125	> 0,9999	6,580

Tabelle 2: Zweifaktorieller ANOVA-Test der Komponenten des Notch-Signalweges in den SP- und NSP-Fractionen der Zelllinien Panc1, ASPC und Capan, analysiert durch die FACS-Durchflusszytometrie.

Die SP-Fraktion der eCC-Zelllinie TFK weist einen hohen prozentualen Anteil der Proteine Musashi, sowie Hes1 und ADAM17 auf (Abbildung 10). Die NSP-Fraktion der Zelllinie TFK exprimiert vermehrt Notch1 und Notch4 (Abbildung 10). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den SP- und NSP-Zellen als auch zur Zelllinie EGI ermittelt werden. Die Zelllinie EGI betreffend, zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Anteils der Notch-Proteine in den SP- und NSP-Fractionen (Abbildung 10).



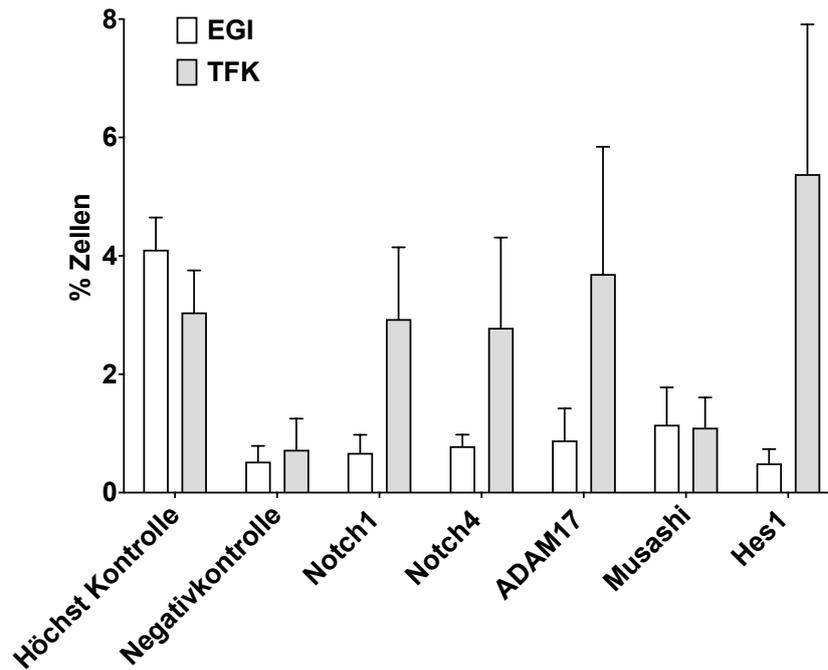


Abbildung 10: Ausprägung ausgewählter Notch-Proteine innerhalb der SP (oben) und NSP-Fraktion (unten) der eCC-Zelllinien.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Komponenten des Notch-Signalwegs in den untersuchten Zelllinien vorhanden sind. Eine statistisch signifikante Über- oder Unterexpression der untersuchten Proteine in den SP-Zellen der Zelllinien, verglichen mit der NSP-Fraktion als auch der Höchst- und Verapamil-Kontrolle, konnte in den absolvierten Versuchen nicht nachgewiesen werden.

3.2. Darstellung apoptotischer und zytotoxischer Effekte der Gemcitabin- und GSI-IX/DAPT-Behandlung auf die PDAC- und eCC-Gesamtzellpopulationen

3.2.1. Detektion zytotoxischer Effekte von Gemcitabin auf die Gesamtzellpopulationen durch das CellToxGreen Cytotoxicity Assay

Um die Viabilität der eCC- und PDAC-Zellpopulationen während der Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Chemotherapeutikums Gemcitabin zu untersuchen, wurde das CellToxGreen Cytotoxicity Assay durchgeführt.

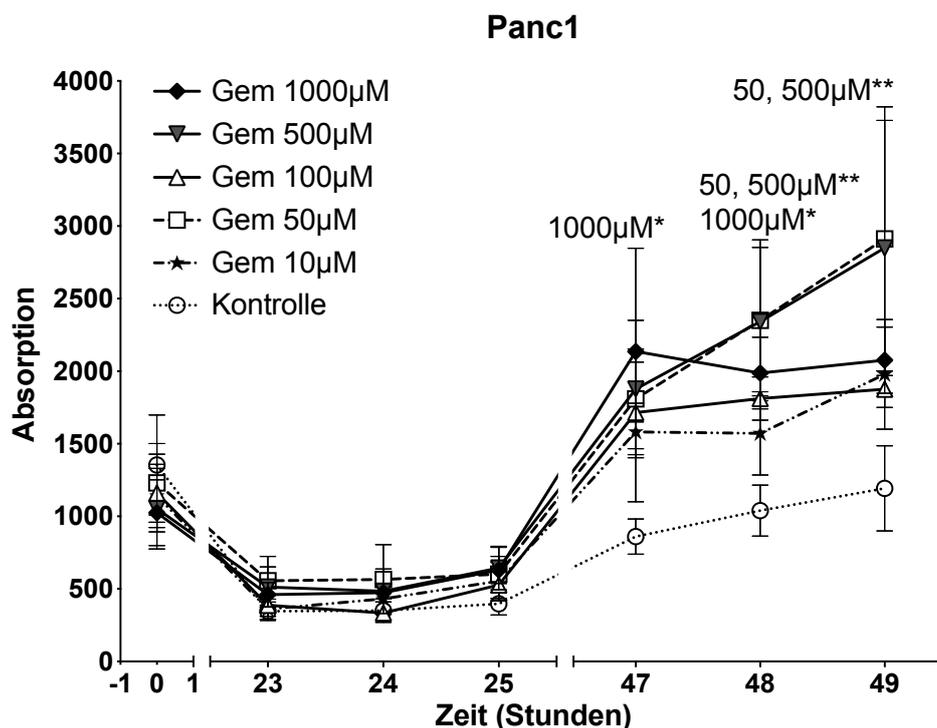
Die PDAC-Zellpopulationen zeigen dies betreffend ein unterschiedliches Ansprechen. Ein signifikanter Unterschied wurde sowohl zwischen den Zelllinien, als auch den verschiedenen Messzeitpunkten festgestellt. Somit zeigt die PDAC-Zelllinie Panc1 nach einer 47 stündigen Inkubation mit 1000µM Gemcitabin eine deutliche Reduktion der Zellviabilität. Nach 48

beziehungsweise 49 stündiger Inkubation reduzieren 50, 500 und 1000 μ M Gemcitabin die Zellviabilität signifikant. Niedrigere Konzentrationen des Therapeutikums konnten in den absolvierten Versuchen keinen signifikanten Anstieg des zytotoxischen Signals erzielen (Abbildung 9, Tabelle 3).

Dahingegen wird die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin auf die Zelllinie ASPC auch in geringerer Konzentration erreicht. Nach 47-49 stündiger Inkubation bewirkt das Chemotherapeutikum in jeder der applizierten Dosierungen einen signifikanten Anstieg des zytotoxischen Signals (Abbildung 11, Tabelle 3).

Zu früheren Messzeitpunkten wurde weder in den Panc1- noch ASPC-Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellviabilität beobachtet (Abbildung 11, Panc1: $p > 0.83$, ASPC: $p > 0.73$).

Erstaunlicherweise zeigt Gemcitabin in keiner der gewählten Konzentration einen signifikanten zytotoxischen Effekt auf die Zelllinie Capan (Abbildung 11). Diesbezüglich lässt sich zwar eine zeitabhängige Zunahme des zytotoxischen Signals feststellen (Abbildung 11), diese erreicht in der zweifaktoriellen Anova-Test-Auswertung jedoch keine statistische Signifikanz ($p > 0.50$).



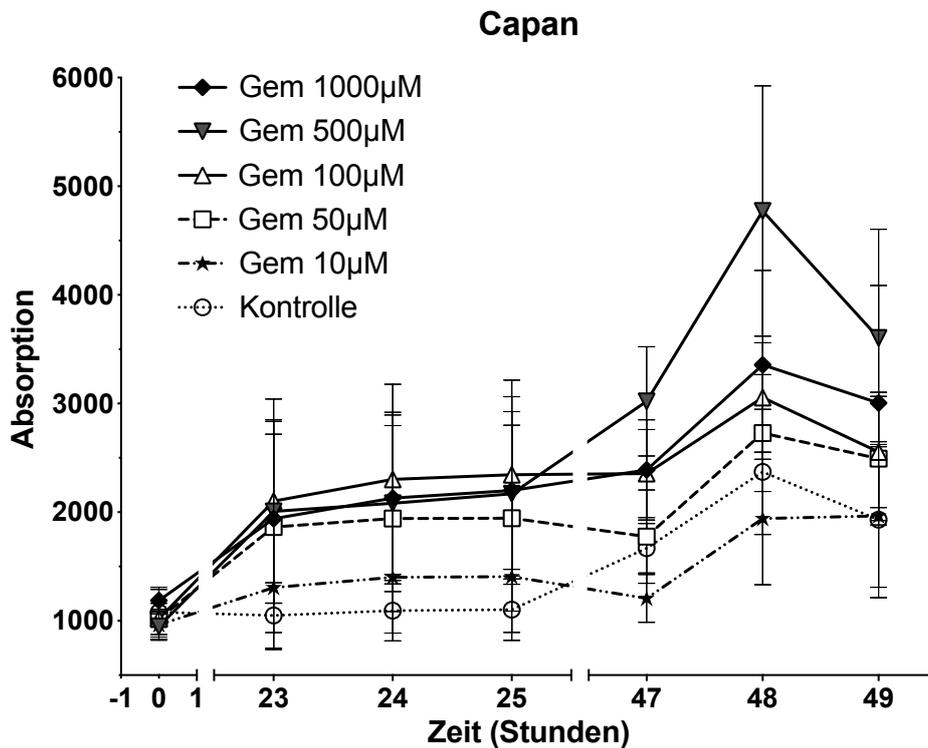
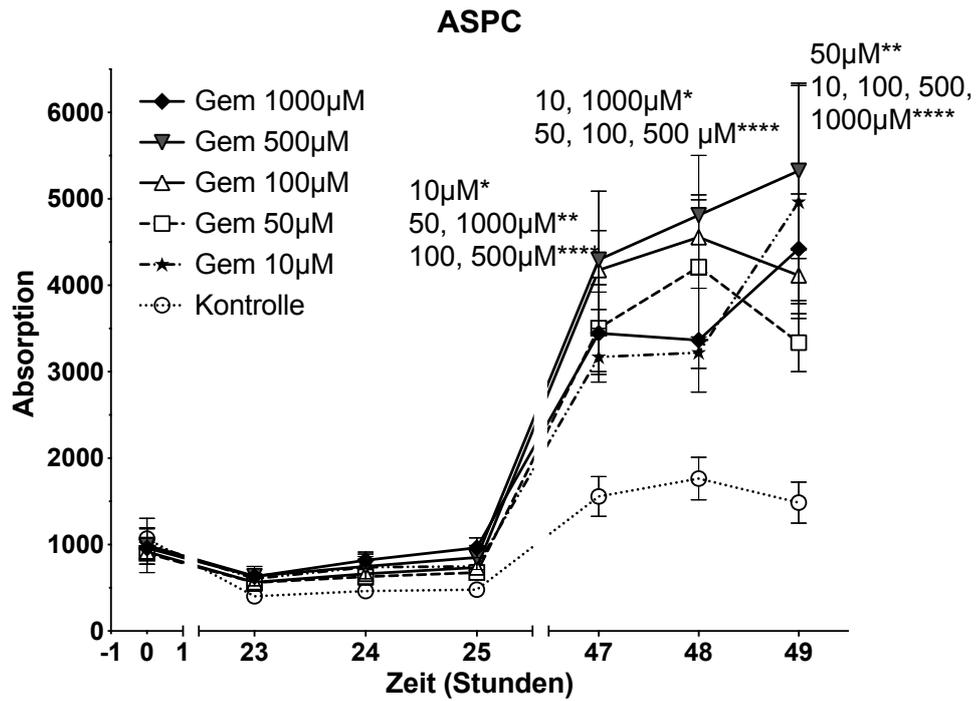


Abbildung 11: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter PDAC-Zelllinien. Zytotoxischer Effekt des Therapeutikums Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen nach 0, 23-25 und 47-49 Stunden auf die Panc1- (oben), ASPC- (Mitte) und Capan- (unten)

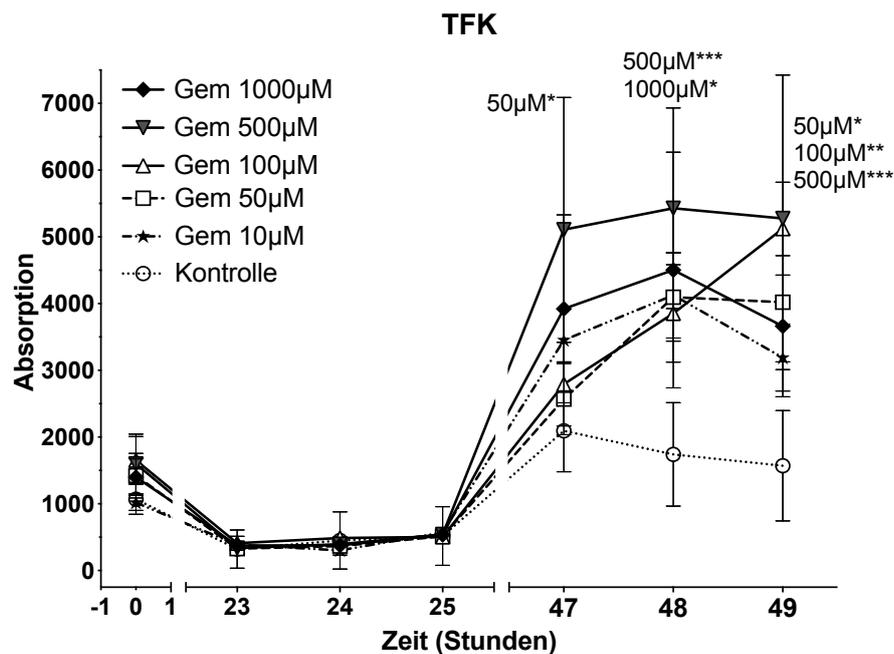
Gesamtzellpopulation. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. (* >0.005, ** =0.005-0.001, *** =0.001-0.0001, ****< 0,0001). Gem=Gemcitabin.

Zelllinie, Zeitpunkt, Konzentration	Mittlere Differenz	p-Wert	Standardfehler
Panc1			
T= 0h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	213,5	0,9676	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	123,5	0,9968	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	194,0	0,9783	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	301,3	0,8797	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	328,8	0,8390	367,0
T=23h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 1 μ M	-14,00	> 0,9999	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-210,0	0,9698	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-40,50	0,9999	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-165,8	0,9892	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-114,3	0,9980	367,0
T=24h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-81,00	0,9997	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-214,7	0,9819	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	16,67	> 0,9999	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-133,3	0,9979	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-123,0	0,9983	423,8
T=25h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-156,8	0,9918	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-204,5	0,9729	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-130,5	0,9961	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-246,8	0,9421	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-233,5	0,9534	367,0
T=47h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-721,0	0,3069	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-949,0	0,1054	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-854,3	0,1699	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-1017	0,0728	423,8
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-1275	0,0146	423,8
T=48h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-531,8	0,4585	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-1312	0,0025	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-772,5	0,1413	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-1303	0,0027	367,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-947,5	0,0465	367,0
T=49h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-785,0	0,4173	519,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-1719	0,0058	519,0

Kontrolle vs. Gemcitabin 100µM	-683,0	0,5505	519,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500µM	-1656	0,0085	519,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000µM	-883,5	0,3064	519,0

Tabelle 3: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays. Zytotoxischer Effekt von Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die PDAC-Zelllinien Panc1 und ASPC. Kontrolle= unbehandelte Zellen. T= Zeit in Stunden (h).

Bezüglich der eCC-Gesamtzellpopulation lässt sich ebenfalls eine konzentrations- und zelllinienabhängige Therapieantwort feststellen. Dementsprechend zeigt die Zelllinie TFK nach 47 stündiger Behandlung ein statistisch signifikantes Ansprechen auf 500µM, nach 48 Stunden auf 500 und 1000µM sowie nach 49 Stunden auf 50,100 und 500µM Gemcitabin (Abbildung 12, Tabelle 4). Demgegenüber lässt sich in der Zelllinie EGI zwar ein Anstieg des zytotoxischen Signals im Zeitverlauf detektieren. Dieses Ergebnis erreicht jedoch keine statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 12, $p > 0.09$).



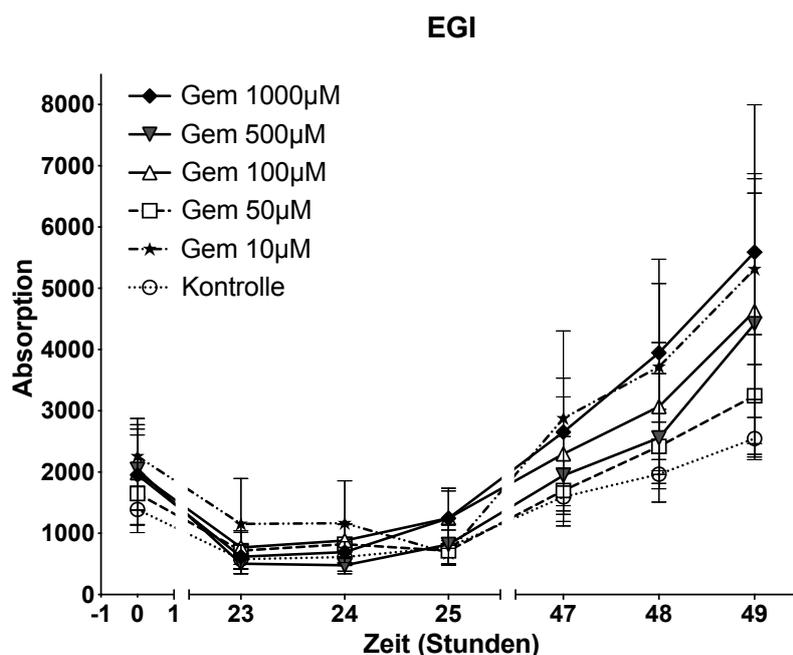


Abbildung 12: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter eCC-Zelllinien. Zytotoxischer Effekt des Therapeutikums Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen nach 0, 23-25 und 47-49 Stunden auf die Zelllinien TFK (oben) und EGI (unten)-Gesamtzellpopulation. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. (* >0.005 , ** $=0.005-0.001$, *** $=0.001-0.0001$, **** $< 0,0001$). Gem= Gemcitabin.

Zelllinie, Zeitpunkt, Konzentration	Mittlere Differenz	p-Wert	Standardfehler
T=0h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10µM	51,25	$> 0,9999$	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 50µM	-354,5	0,9907	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 100µM	-583,5	0,9249	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 500µM	-530,0	0,9480	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000µM	-330,5	0,9933	810,6
T=23h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10µM	-63,00	0,9999	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 50µM	-5,750	$> 0,9999$	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 100µM	-87,75	0,9999	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 500µM	-15,00	$> 0,9999$	810,6
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000µM	-54,00	$> 0,9999$	810,6
T=24h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10µM	149,0	0,9997	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50µM	84,00	0,9999	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100µM	-37,67	$> 0,9999$	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500µM	56,33	$> 0,9999$	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000µM	72,67	0,9999	936,0

T=25h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-55,33	> 0,9999	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	3,667	> 0,9999	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	11,67	> 0,9999	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-25,33	> 0,9999	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-19,33	> 0,9999	936,0
T=47h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-1358	0,6452	1146
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-474,5	0,9929	1146
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-699,0	0,9606	1146
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-3014	0,0418	1146
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-1829	0,3673	1146
T=48h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-2386	0,0512	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-2356	0,0555	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-2112	0,1024	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-3688	0,0008	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-2762	0,0176	936,0
T=49h			
Kontrolle vs. Gemcitabin 10 μ M	-1618	0,2937	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 50 μ M	-2449	0,0432	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 100 μ M	-3552	0,0013	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 500 μ M	-3704	0,0007	936,0
Kontrolle vs. Gemcitabin 1000 μ M	-2091	0,1077	936,0

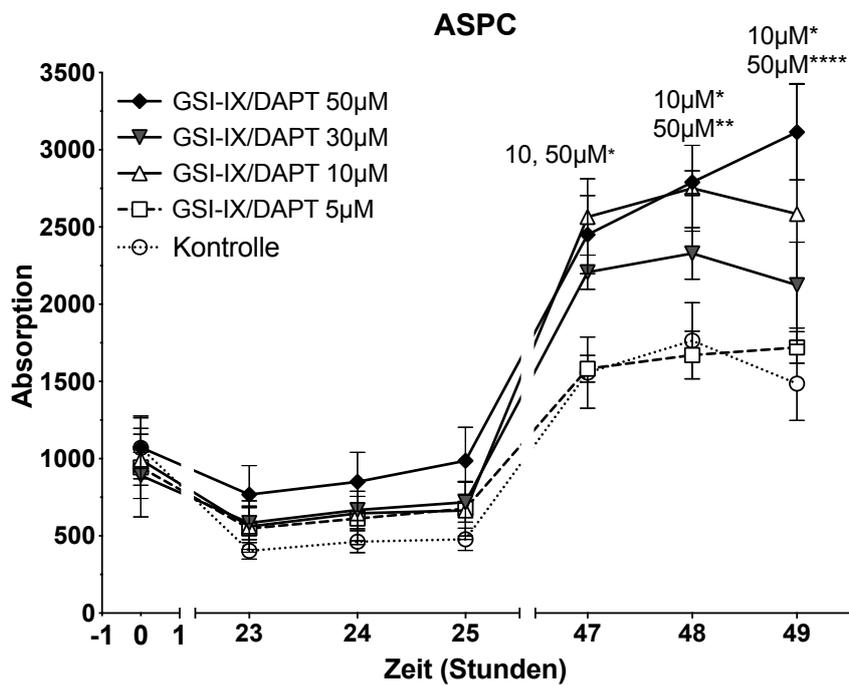
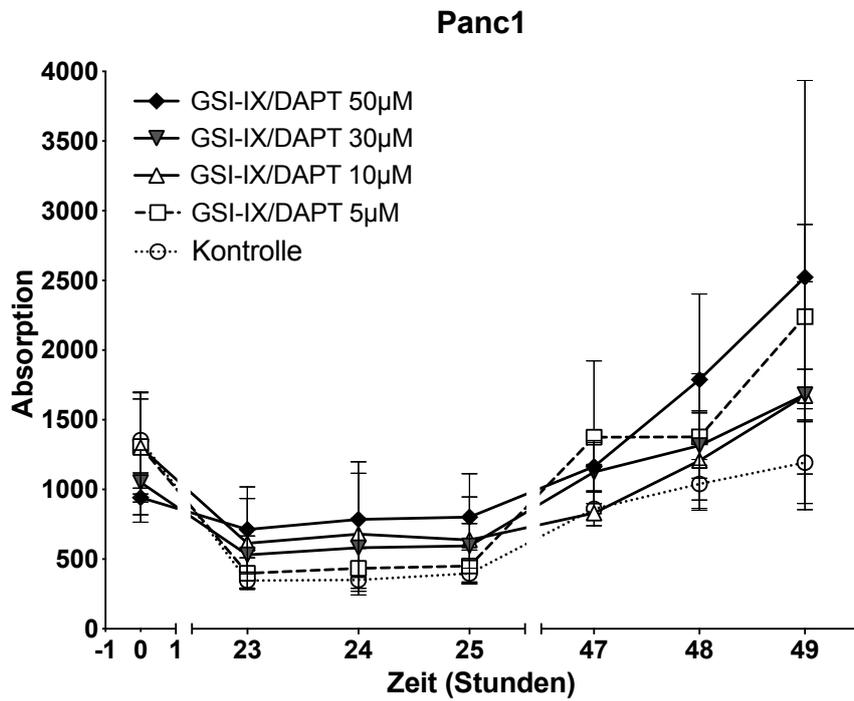
Tabelle 4: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays. Zytotoxischer Effekt von Gemcitabin in verschiedenen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Zelllinie TFK. Kontrolle= unbehandelte Zellen. T= Zeit in Stunden (h).

3.2.2. Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von DAPT/GSI-IX auf die Gesamtzellpopulationen anhand des CellToxGreen Cytotoxicity Assays

Das folgende CellToxGreen Cytotoxicity Assay wurde durchgeführt, um die zytotoxische Wirkung des spezifischen Notch-Inhibitors GSI-IX/DAPT auf die PDAC- und eCC-Zellpopulationen zu untersuchen.

Die Viabilität der ASPC-Zellen wurde unter den DAPT-Konzentrationen von 10 und 50 μ M statistisch signifikant reduziert (Abbildung 13, Tabelle 5). Dieser Effekt trat jedoch erst nach einer 47 bis 49 stündigen Inkubation mit GSI-IX/DAPT auf. Zu früheren Zeitpunkten konnten keine signifikante Reduktion der Zellviabilität detektiert werden (Abbildung 13, Tabelle 5). Die PDAC-Zelllinien Panc-1 und Capan zeigen zwar ebenfalls einen Anstieg des zytotoxischen

Signals im zeitlichen Verlauf, es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt (Abbildung 10, Panc1: $p > 0.51$, Capan: $p > 0.58$).



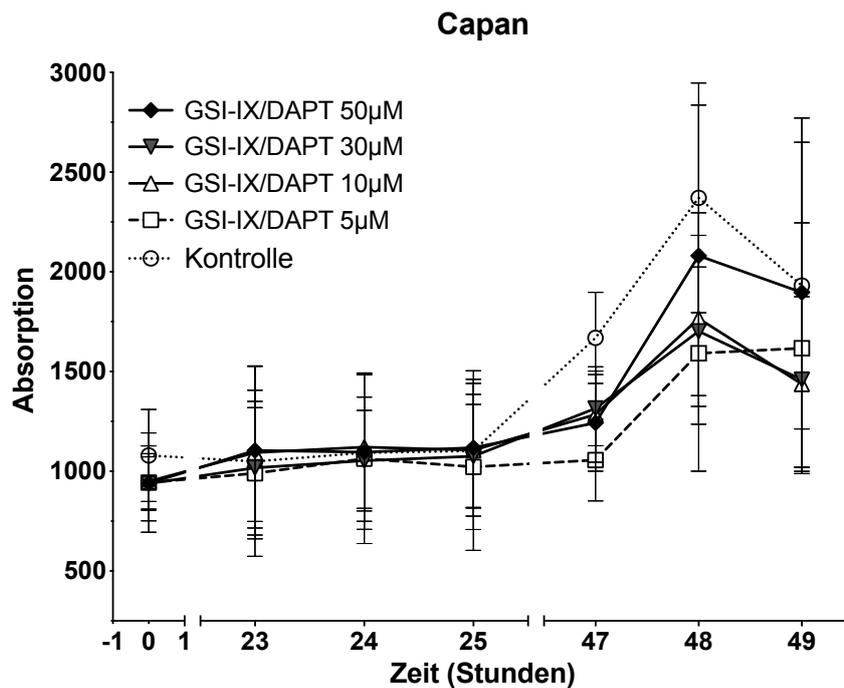


Abbildung 13: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter PDAC-Zelllinien. Zytotoxischer Effekt des Notch-Inhibitors GSI-IX/DAPT in verschiedenen Konzentrationen nach 0, 23-25 und 47-49 Stunden auf die Zelllinien Panc1 (oben), ASPC (mitte) und Capan (unten)-Gesamtpopulation. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. (* >0.005 , ** $=0.005-0.001$, *** $=0.001-0.0001$, **** $< 0,0001$).

Zelllinie, Zeitpunkt, Konzentration	Mittlere Differenz	p-Wert	Standardfehler
ASPC			
T=0h			
Kontrolle vs. DAPT 5 μ M	125,5	0,9780	286,8
Kontrolle vs. DAPT 10 μ M	76,00	0,9966	286,8
Kontrolle vs. DAPT 30 μ M	178,3	0,9260	286,8
Kontrolle vs. DAPT 50 μ M	-3,000	$> 0,9999$	286,8
T=23h			
Kontrolle vs. DAPT 5 μ M	-145,0	0,9631	286,8
Kontrolle vs. DAPT 10 μ M	-157,8	0,9507	286,8
Kontrolle vs. DAPT 30 μ M	-181,5	0,9215	286,8
Kontrolle vs. DAPT 50 μ M	-364,5	0,5207	286,8
T=24h			
Kontrolle vs. DAPT 5 μ M	-149,8	0,9587	286,8
Kontrolle vs. DAPT 10 μ M	-183,8	0,9184	286,8

Kontrolle vs. DAPT 30µM	-205,0	0,8851	286,8
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-387,8	0,4661	286,8
T=25h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-198,0	0,8968	286,8
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-186,3	0,9148	286,8
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-239,8	0,8187	286,8
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-508,5	0,2341	286,8
T=47h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-25,33	0,9999	331,1
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-1008	0,0111	331,1
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-650,3	0,1618	331,1
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-894,0	0,0289	331,1
T=48h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	94,00	0,9957	331,1
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-986,3	0,0134	331,1
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-564,3	0,2652	331,1
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1025	0,0095	331,1
T=49h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-234,7	0,8881	331,1
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-1099	0,0049	331,1
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-637,7	0,1747	331,1
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1629	< 0,0001	331,1

Tabelle 5: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays. Zytotoxischer Effekt von GSI-IX/DAPT in verschiedenen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Zelllinie ASPC. Kontrolle= unbehandelte Zellen. T= Zeit in Stunden (h).

In beiden eCC-Zelllinien führt das Therapeutikum GSI-IX/DAPT zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität. Nach 49 Stunden wurde bereits in einer Konzentration von 5µM ein signifikanter Anstieg des zytotoxischen Signals in der Zelllinie EGI gemessen (Abbildung 14, Tabelle 6). Innerhalb der Zelllinie TFK wurde nach einer 48 stündigen Inkubation mit 50µM GSI-IX/DAPT ein signifikanter zytotoxischer Effekt detektiert (Abbildung 14, Tabelle 6).

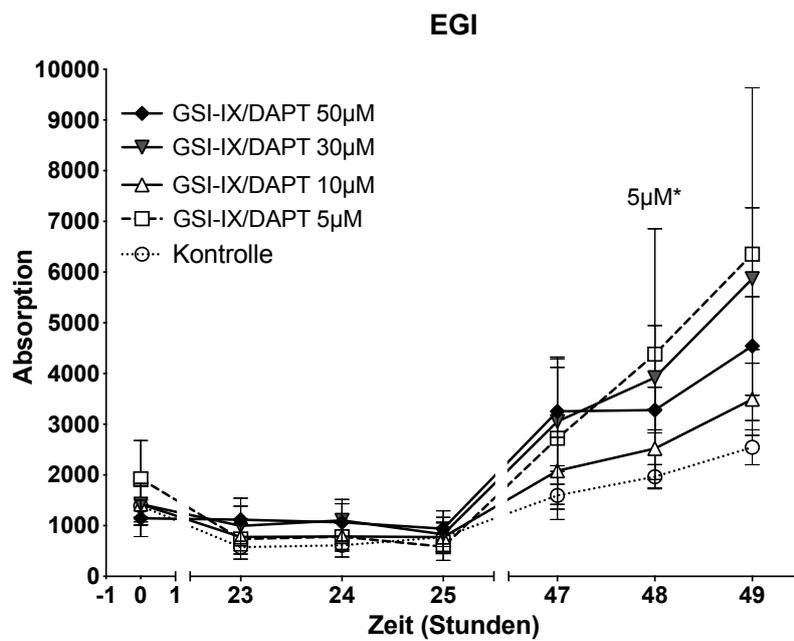
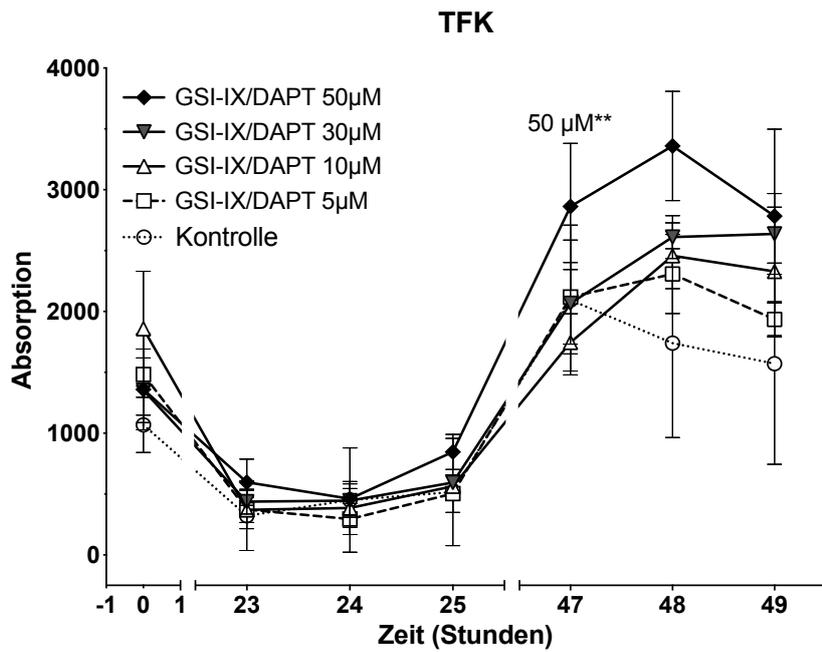


Abbildung 14: Auswertung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays behandelter eCC-Zelllinien. Zytotoxischer Effekt des Notch-Inhibitors GSI-IX/DAPT in verschiedenen Konzentrationen nach 0, 23-25 und 47-49 Stunden auf die Zelllinien TFK (oben) und EGL (unten)-Gesamtzellpopulation. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. (* >0.005 , ** =0.005-0.001, *** =0.001-0.0001, **** $< 0,0001$).

Zelllinie, Zeitpunkt, Konzentration	Mittlere Differenz	Adjustierter P Wert	Standardfehler
TFK			
T=0h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-414,5	0,7573	444,3
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-789,3	0,2342	444,3
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-284,3	0,9187	444,3
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-291,8	0,9117	444,3
T=23h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-50,25	0,9998	444,3
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-47,50	0,9999	444,3
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-115,5	0,9968	444,3
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-275,0	0,9269	444,3
T=24h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	156,0	0,9944	513,0
Kontrolle vs. DAPT 10µM	65,00	0,9998	513,0
Kontrolle vs. DAPT 30µM	4,333	> 0,9999	513,0
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-11,00	> 0,9999	513,0
T=25h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	13,33	> 0,9999	513,0
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-47,33	0,9999	513,0
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-78,33	0,9997	513,0
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-329,7	0,9175	513,0
T=47h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-24,50	> 0,9999	628,3
Kontrolle vs. DAPT 10µM	348,0	0,9495	628,3
Kontrolle vs. DAPT 30µM	27,50	> 0,9999	628,3
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-768,0	0,5554	628,3
T=48h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-568,3	0,6362	513,0
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-718,3	0,4359	513,0
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-871,0	0,2697	513,0
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1619	0,0084	513,0
T=49h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-363,0	0,8886	513,0
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-757,7	0,3885	513,0
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-1066	0,1295	513,0
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1213	0,0684	513,0
EGI			
T=0h			
Kontrolle vs. DAPT 5mM	-534,0	0,9521	978,8
Kontrolle vs. DAPT 10mM	-35,00	> 0,9999	978,8
Kontrolle vs. DAPT 30mM	-34,25	> 0,9999	978,8

Kontrolle vs. DAPT 50mM	242,3	0,9973	978,8
T=23h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-161,3	0,9993	978,8
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-201,5	0,9987	978,8
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-419,0	0,9796	978,8
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-541,8	0,9497	978,8
T=24h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-169,0	0,9991	978,8
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-174,5	0,9991	978,8
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-490,0	0,9644	978,8
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-452,8	0,9730	978,8
T=25h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	187,8	0,9990	978,8
Kontrolle vs. DAPT 10µM	0,0	> 0,9999	978,8
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-55,50	> 0,9999	978,8
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-167,3	0,9992	978,8
T=47h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-1128	0,6043	978,8
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-486,5	0,9652	978,8
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-1459	0,3791	978,8
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1660	0,2693	978,8
T=48h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-2416	0,1124	1130
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-554,3	0,9669	1130
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-1950	0,2553	1130
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1312	0,5979	1130
T=49h			
Kontrolle vs. DAPT 5µM	-3807	0,0252	1384
Kontrolle vs. DAPT 10µM	-946,5	0,8998	1384
Kontrolle vs. DAPT 30µM	-3323	0,0616	1384
Kontrolle vs. DAPT 50µM	-1997	0,4085	1384

Tabelle 6: Zweifaktorieller ANOVA-Test des CellToxGreen Cytotoxicity Assays. Zytotoxischer Effekt von GSI-IX/DAPT in verschiedenen Konzentrationen und zu verschiedenen Zeitpunkte auf die Zelllinien TFK und EGI. Kontrolle= unbehandelte Zellen. T= Zeit in Stunden (h).

Zusammenfassend variiert der zytotoxische Effekt von GSI-IX/DAPT und Gemcitabin zwischen den PDAC- und eCC-Zelllinien. Das Chemotherapeutikum Gemcitabin induziert nach 48 bis 49 Stunden eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in zwei der drei untersuchten PDAC-Zelllinien. Dahingegen ist ein signifikanter zytotoxischer Effekt der GSI-IX/DAPT-Behandlung auf eine der PDAC-Zelllinien (ASPC) begrenzt.

Die eCC-Zelllinien betreffend, wird die Zellviabilität innerhalb der Zelllinie TFK sowohl durch die Gemcitabin- als auch die GSI-IX/DAPT-Behandlung reduziert. Interessanterweise zeigt die Zelllinie EGI kein signifikantes Ansprechen auf die Gemcitabin-Therapie. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität unter GSI-IX/DAPT-Therapie erzielt werden.

3.2.3. Prüfung apoptotischer Effekte der Therapeutika auf die Gesamtzellpopulationen durch das TUNEL-Assay

Um die Auswirkungen des Chemotherapeutikums Gemcitabin und der pharmakologischen Notch-Inhibition durch GSI-IX/DAPT auf die Apoptoserate in den PDAC- und eCC-Zellen zu untersuchen, wurde ein TUNEL-Assay durchgeführt.

In Bezug auf die Gemcitabin- und GSI-IX/DAPT-Behandlung der ASPC- und Panc1-Zelllinien wurde keine statistisch signifikante Zunahme des apoptotischen Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet (Panc1: $n=3$, $M 12.28 \pm 33.83$, $SD 24.01$ bis 50.01 , $p>0.99$; ASPC: $n=3$, $M 17.31 \pm 45.28$, $SD 7.79$ bis 37.51 , $p>0.99$, Abbildung 15, 16).

Hinsichtlich der TFK-Gesamtzellpopulationen induziert eine Gemcitabin-Konzentration von $1000\mu\text{M}$ die Apoptose signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($n=3$, $M 49.71 \pm 16.97$, $SD 33.94$, $p= 0.04$, Abbildung 18). Dahingegen zeigt Gemcitabin keinen signifikanten apoptotischen Effekt auf die Zelllinie EGI ($n=3$, $M 11.81 \pm 49.12$, $SD 12.33$ bis 31.41 , $p> 0.06$). Dieses Ergebnis untermauert jene des CellToxGreen Cytotoxicity Assays, das einen signifikanten zytotoxischen Effekt von Gemcitabin auf die Zelllinie TFK, jedoch nicht EGI zeigte.

Ferner zeigt die TUNEL-Färbung eine Zunahme des apoptotischen Signals unter einer GSI-IX/DAPT-Therapie von $50\mu\text{M}$ innerhalb der eCC-Zelllinien EGI ($n=3$, $M 32.28 \pm 19.96$, $SD 34.58$, $p=0.57$, Abbildung 18) und TFK ($n=3$, $M 27.65 \pm 7.12$, $SD 14.25$, $p=0.36$, Abbildung 17,18). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte jedoch keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

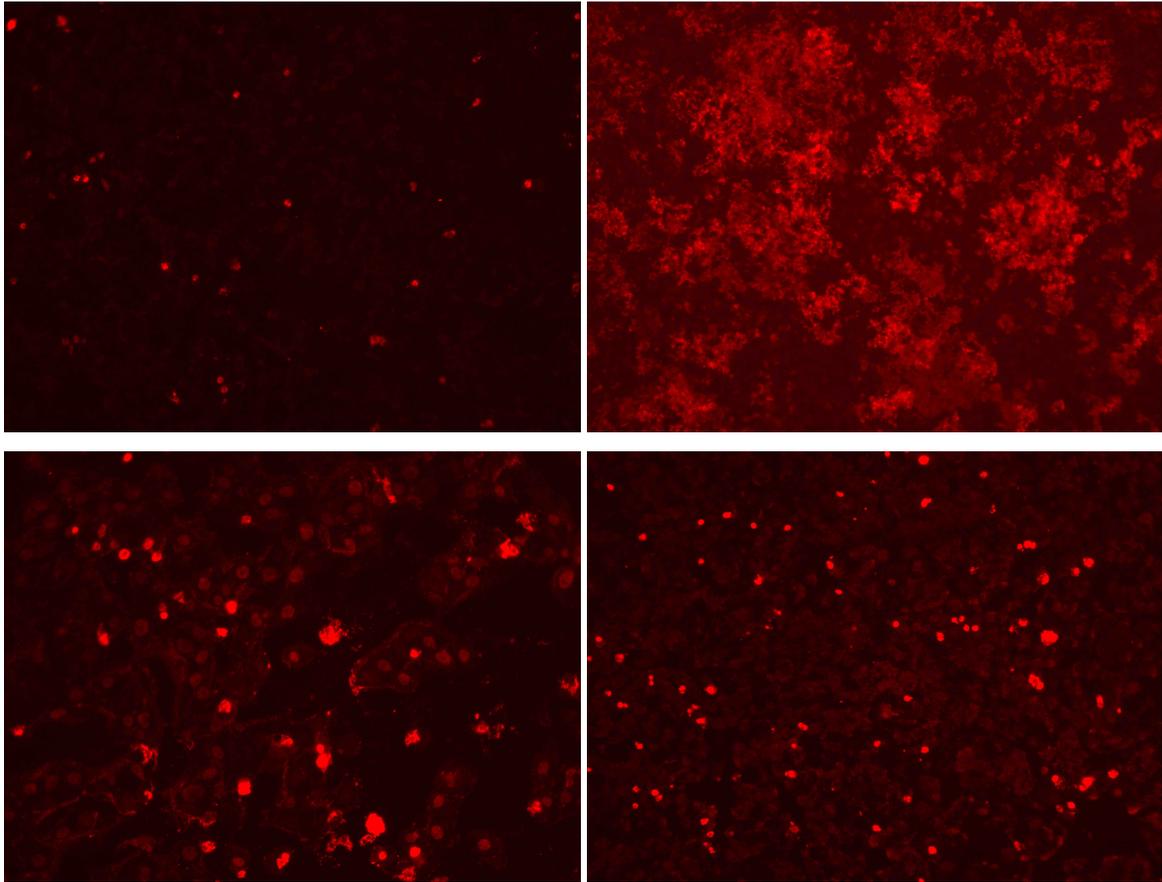
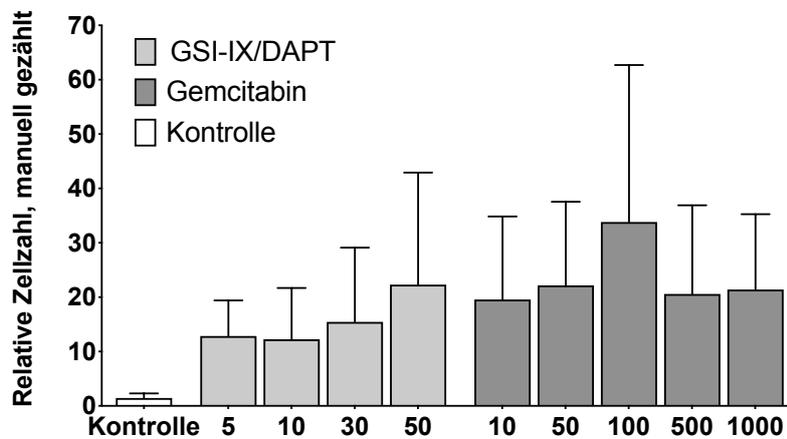


Abbildung 15. TUNEL-Färbung: Zunahme des apoptotischen Signals innerhalb der Gemcitabin-behandelten PDAC-Zelllinie ASPC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Links oben: Unbehandelte Kontrolle. Rechts oben: Positivkontrolle. Links unten: Gemcitabin-Behandlung in einer Konzentration von 50 μ M. Rechts unten: GSI-IX/DAPT-Behandlung in einer Konzentration von 50 μ M.



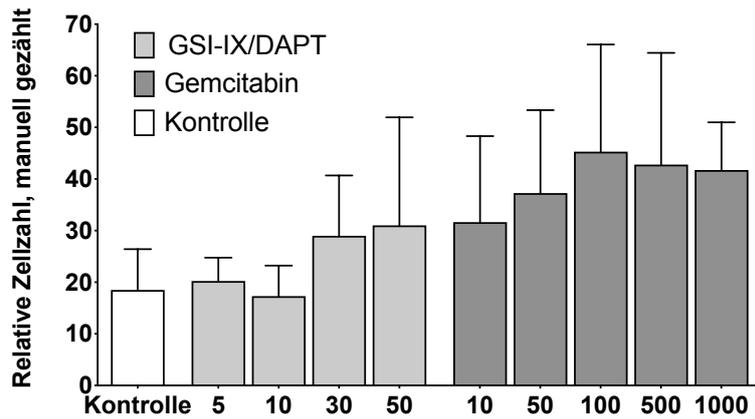


Abbildung 16: Statistische Auswertung der TUNEL-Färbung der Zelllinien Panc1 (oben) und ASPC (unten) durch den Einfaktoriellen Anova Test: Keine signifikante Zunahme des apoptotischen Signals unter der Gemcitabin- und GSI-IX/DAPT-Therapie innerhalb der Zelllinie Panc1 und ASPC ($p > 0.99$).

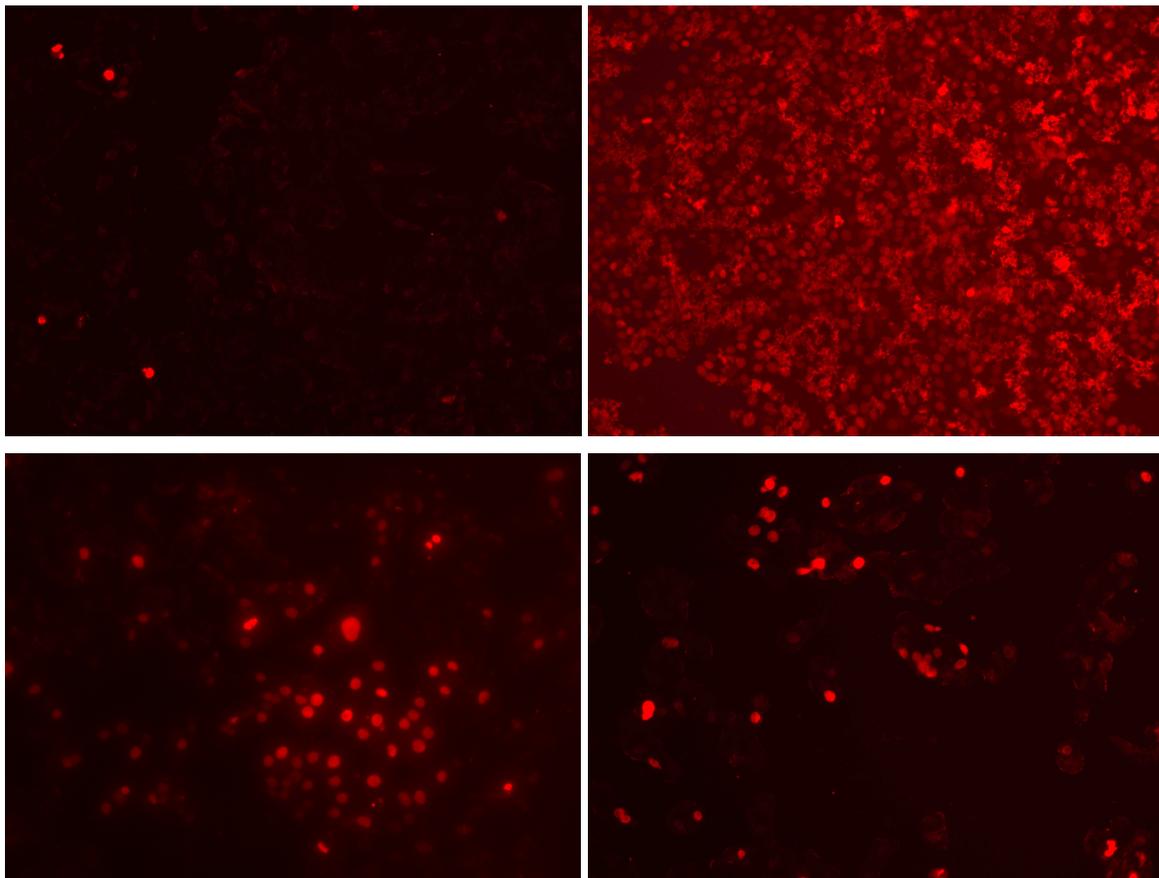


Abbildung 17: TUNEL-Färbung mit Zunahme des apoptotischen Signals innerhalb der eCC-Zelllinie TFK. Links oben: Unbehandelte Kontrolle. Rechts oben: Positivkontrolle. Links unten: Gemcitabin-Behandlung in einer Konzentration von 1000 μM . Rechts unten: GSI-IX/DAPT-Behandlung in einer Konzentration von 50 μM .

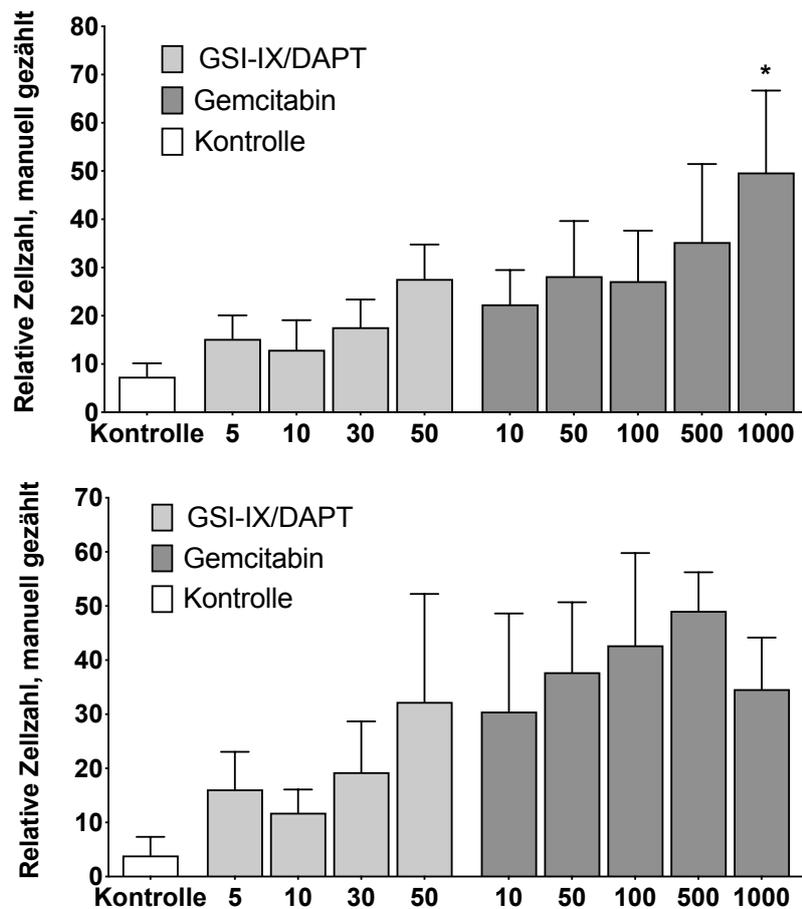


Abbildung 18: Statistische Auswertung mittels Zweifaktoriellem ANOVA-Tets der Zelllinie TFK (oben): Signifikante Zunahme der Apoptose unter 1000 μ M Gemcitabin ($p=0.04$). Statistische Auswertung mittels Two-Way ANOVA-Tets der Zelllinie EGI (unten): Nicht-signifikante Zunahme des apoptotischen Signals unter Gemcitabin-und GSI-IX/DAPT-Therapie (Gemcitabin: $p>0.06$, GSI-IX/ DAPT: $p>0.57$).

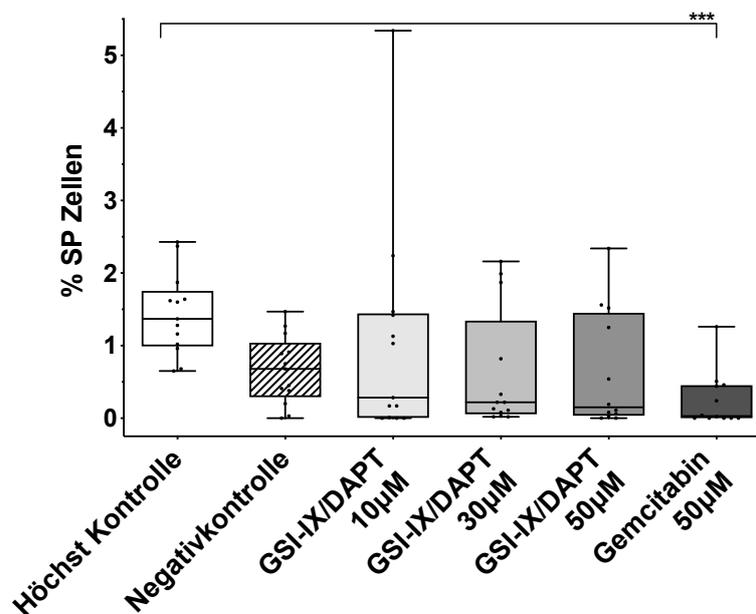
Zusammenfassend wurden sowohl unter der Therapie mit DAPT als auch Gemcitabin keine signifikante Zunahme der apoptotischen Signale in den Zelllinien Panc1, ASPC, TFK und EGI festgestellt. Verglichen mit der unbehandelten Kontrolle konnte nur in der Zelllinie TFK eine signifikante Zunahme des apoptotischen Signals unter einer Therapie mit 1000 μ M Gemcitabin beobachtet werden.

3.3. FACS-Auswertung der therapeutischen Wirkung von Gemcitabin und GSI-IX/DAPT auf die SP-Zellfraktion der eCC- und PDAC-Zelllinien

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, welche spezifischen Auswirkungen eine Inhibition des Notch-Signalweges und die Therapie mit Gemcitabin auf die SP-Fraktionen der eCC- und PDAC-Zelllinien hat. Hierfür wurde nach einer 48 stündigen Behandlung der Zelllinien mit Gemcitabin und GSI-IX/DAPT die FACS-Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen ein unterschiedliches Ansprechen der SP-Zellfraktionen auf die Notch-Inhibition. Demnach bewirkt die GSI-IX/DAPT-Therapie der PDAC-Zelllinien zusammengefasst keine signifikante Reduktion der jeweiligen SP-Zellfraktionen. Es ist jedoch eine signifikante Reduktion der SP-Zellen unter der Therapie mit 50 μ M Gemcitabin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festzustellen (n= 16, M 0.24 \pm 0.10, SD 0.37, p=0.001, Abbildung 19).

In einem nächsten Schritt wurden die SP-Zellfraktionen der PDAC-Zelllinien einzeln untersucht. Diesbezüglich bewirkt die Gemcitabin-Therapie eine signifikante Abnahme der Panc1-SP-Zellfraktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4, M 0.31 \pm 0.11, SD 0.22, p=0.05, Abbildung 19). Es kann jedoch kein signifikanter Einfluss der GSI-IX/DAPT- oder Gemcitabin-Therapie auf die SP-Zellfraktionen der Zelllinie Capan und ASPC festgestellt werden (Capan: p> 0.322, ASPC: p> 0.326, Abbildung 19).



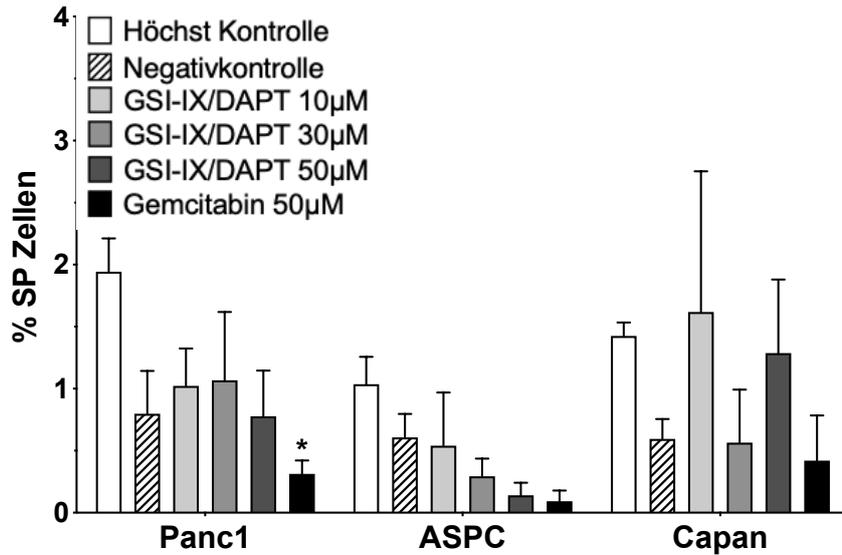


Abbildung 19: Zweifaktorieller Anova-Test der durchgeführten FACS-Analyse. Signifikante Reduktion der PDAC-SP-Zellen unter der Therapie mit 50µM Gemcitabin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (oben). Signifikante Panc1-SP-Zellreduktion unter der Therapie mit 50µM Gemcitabin und Trend in der SP-Zellabnahme der Zelllinie ASPC (unten). Die Daten sind als $M \pm SEM$ angegeben. (* >0.005 , ** $=0.005-0.001$, *** $=0.001-0.0001$, **** $< 0,0001$).

Die eCC-Zelllinien zusammengefasst, kann eine signifikante Reduktion ihrer SP-Zellfraktionen unter der Therapie mit 50µM GSI-IX/DAPT ($M 0.89 \pm 0.21$, $SD 0.58$, $p > 0.005$) und 50µM Gemcitabin ($n=7$, $M 1.02 \pm 0.35$, $SD 0.93$, $p=0.0001$, Abbildung 20) festgestellt werden. Die Analyse der einzelnen Zelllinien stellt heraus, dass die EGI-SP-Zellfraktion durch die Therapie mit 50µM Gemcitabin ($n=3$, $M 0.36 \pm 0.16$, $SD 0.28$, $p < 0.0001$) und 50µM GSI-IX/DAPT ($n=3$, $M 0.39 \pm 0.12$, $SD 0.22$, $p < 0.0001$, Abbildung 20) signifikant verringert wird. Ferner wird auch die TFK-SP-Zellfraktion durch 50µM Gemcitabin ($n=4$, $M 1.52 \pm 0.48$, $SD 0.96$, $p=0.05$), als auch 10µM GSI-IX/DAPT ($n=4$, $M 1.25 \pm 0.36$, $SD 0.72$, $p=0.007$) und 50µM GSI-IX/DAPT ($n=4$, $M 1.28 \pm 0.21$, $SD 0.44$, $p=0.009$, Abbildung 20) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert.

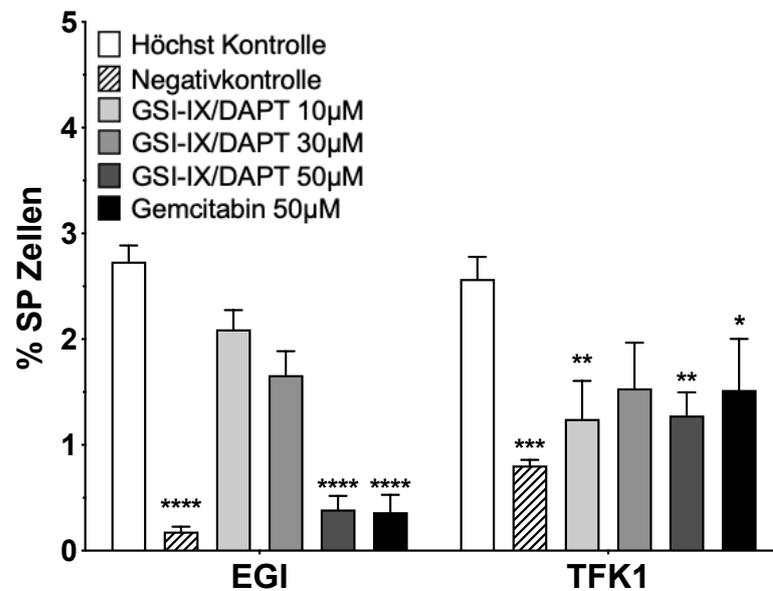
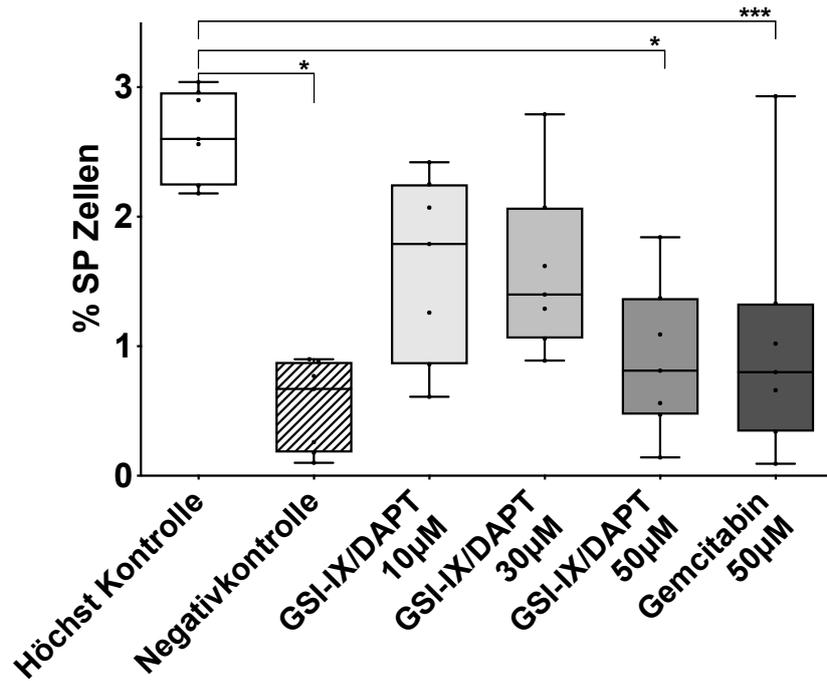


Abbildung 20: Zweifaktorieller Anova-Test der eCC-Zelllinien mit signifikanter Reduktion der SP-Zellpopulationen unter einer Behandlung mit 50µM GSI-IX/DAPT und 50µM Gemcitabin (oben). Signifikante Reduktion der EGI-SP-Zellpopulation unter 50µM Gemcitabin und 50µM GSI-IX/DAPT sowie TFK unter 10,50µM GSI-IX/DAPT und 50µM Gemcitabin (unten). Die Daten sind als $M \pm SEM$ angegeben. (* >0.005, ** =0.005-0.001, *** =0.001-0.0001, **** < 0,0001)

Zusammenfassend weisen die eCC-Zelllinien verhältnismäßig große SP-Zellfraktionen auf, die ein signifikantes Ansprechen auf die Behandlung mit GSI-IX/DAPT zeigen. Im Gegensatz dazu

zeigt die GSI-IX/DAPT-Therapie keinen signifikanten Effekt auf die kleinere SP-Zellfraktion der PDAC-Zelllinien (Abbildung 21). Gemcitabin reduziert die Anzahl der SP-Zellen beider eCC-Zelllinien signifikant, wohingegen der therapeutische Effekt innerhalb der PDAC-Zelllinien auf Panc1 begrenzt ist.

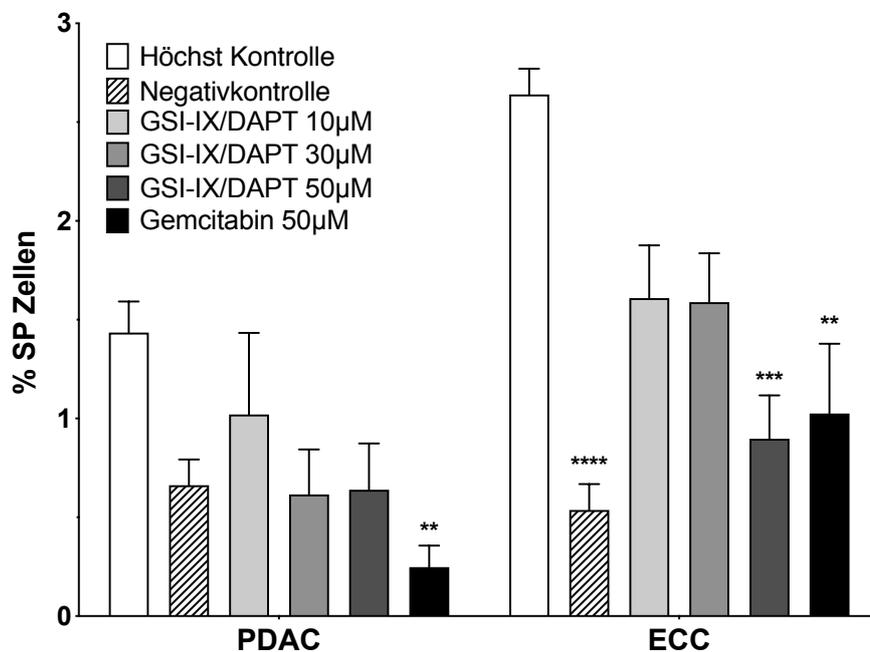


Abbildung 21: Zweifaktorieller Anova-Test der behandelten eCC- und PDAC-Zelllinien. Signifikante Reduktion der eCC-SP-Fraktion unter der Therapie mit 50µM Gemcitabin und 50µM GSI-IX/DAPT. Reduktion der PDAC-SP-Fraktion unter der Therapie mit 50µM Gemcitabin. Die Daten sind als $M \pm SEM$ angegeben. (* >0.005 , ** $=0.005-0.001$, *** $=0.001-0.0001$, **** <0.0001)

4. Diskussion

4.1. Tumorstammzellen als therapeutischer Angriffspunkt

Mit zunehmender Kenntnis über die Existenz von CSCs in hämatologischen und soliden Tumoren wurde umfangreich nach Möglichkeiten einer exakteren Charakterisierung und therapeutischen Inhibition dieser Subpopulation gesucht.

Die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass auch die untersuchten PDAC- und eCC-Zelllinien eine Stammzellfraktion aufweisen, die sich in ihrer Größe signifikant unterscheiden. Gemeinsam haben die SP-Fraktionen der PDAC- und eCC-Zelllinien jedoch, dass sie mit einem Anteil von 1,1 bis 5,1% an der Gesamtzellzahl insgesamt eine kleine Subpopulation darstellen. Dieses Erkenntnis wurde umfangreich in der Literatur vorbeschrieben und spricht keinesfalls gegen ihr hohes malignes Potential (26, 28, 55, 56). Im Gegenteil können

die CSCs als Subpopulation eines Tumors beschrieben werden, die den Motor einer Therapieresistenz und möglichen Rekurrenz darstellt (26, 28, 55, 56). Ihre hohe Aggressivität scheint durch Eigenschaften wie eine erhöhte Metastasierungs- und Invasionsfähigkeit als auch das Vermögen zur unbegrenzten Selbsterneuerung und Umgehung des Zelltodes bedingt zu sein (26, 28, 55, 56).

Die geringe Größe der Population macht sie im experimentellen Umfeld aber schwer fassbar. Insofern bildet die Kultivierung der CSCs nach ihrer Trennung der von der restlichen Zellpopulation durch das FACS-gestützte SP-Sorting eine anspruchsvolle Aufgabe. Dementsprechend eröffnete sich in den hier dargestellten Experimenten nicht die Möglichkeit, die Anzucht der PDAC- und eCC-SP-Zellen in großer Menge zu reproduzieren. Wang et al. ist es jedoch gelungen, ihre sich von der restlichen Zellpopulation unterscheidenden Wachstumsmuster und rapiden Verdopplungszeiten zu beobachten (28).

Bei der Wertung der Tumorstammzellen als therapeutischen Angriffspunkt muss das zelluläre Mikromilieu berücksichtigt werden. Einige Veröffentlichungen befassten sich beispielsweise mit der Rolle von so genannten Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs) und definieren sie als wichtigen Bestandteil sowohl des PDAC- als auch eCC-Tumorstromas (57-60). Mit einem Anteil von bis zu 90% an der Tumormasse dominieren sie das zelluläre Milieu häufig quantitativ (58). Außerdem scheinen sie maßgeblich an der Chemoresistenz der Tumoren beteiligt zu sein (57-60). Diesbezüglich zeigte eine Phase II klinische Studie mit einem speziellen molekularen Inhibitor, der das stromale Kompartiment des Pankreaskarzinom depletieren sollte, keinen signifikanten Effekt auf die untersuchten CAFs (57, 60, 61). Darüber hinaus stellten Versuche mit PDAC-Zelllinien und CAFs heraus, dass CAFs im Vergleich zu den epithelialen Tumorzellen eine stärkere Chemoresistenz aufweisen (57, 58, 60).

Aktuell steht die zelluläre Diversität eines Tumors im Fokus vieler Arbeitsgruppen. Offen bleibt die Frage, ob es maligne Zellen gibt, die solitär an der Spitze dieser zellulären Hierarchie stehen, oder ob es sich um eine Art zelluläre Interaktion handelt, die die Aggressivität eines Tumors bedingt. Diesbezüglich zeigen beispielsweise Experimente mit Ko-Kulturen von CAFs und PDAC-Zelllinien ein käfigartiges Wachstumsmuster der CAFs um die epithelialen Pankreaskarzinomzellen (58). Unter diesem Gesichtspunkt wird angenommen, dass die epithelialen Tumorzellen durch CAFs mechanisch vor Chemotherapeutika geschützt werden können (57, 58, 60).

Interessant wäre es, diesen Ansatz auf die CSCs zu übertragen. Dies meint konkreter die Charakterisierung des biologischen Verhaltens der CSCs in Ko-Kultur mit CAFs, um folgend zu analysieren, ob eine der beiden Zellpopulationen beispielsweise hinsichtlich der Therapieresistenz dominiert. Relevant wäre außerdem, die zelluläre Herkunft der CAFs zu erfassen. Angenommen, CAFs gingen ebenfalls aus Tumorstammzellen hervor, würde diese Erkenntnis die CSCs als Urheber des Stromalen Kompartiments eines Tumors identifizieren. Dabei ist die Fähigkeit der CSCs, sich in verschiedene Zelltypen differenzieren zu können, umfassend in der Literatur vorbeschrieben (26, 27). Ob sich die CSCs jedoch auch in CAFs differenzieren, wurde bisher noch nicht hinreichend untersucht. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf den fundamentalen Stellenwert der CSCs hinsichtlich der Malignität eines Tumors.

Die zelluläre Diversität des PDACs und eCCs beinhaltet auch eine Vielzahl von Immunzellen (61). Inzwischen ist bekannt, dass die Interaktion diverser Tumoren mit dem Immunsystem wesentlich für deren Formation, Fortbestehen und Rezidivieren ist (61). Beispielsweise wurde in einem Xenograft-Modell von Schmidt et al. der Zusammenhang zwischen Brustkrebszellen und T-Gedächtniszellen untersucht (1, 62). Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktivierung zuvor ruhender T-Gedächtniszellen zu einem längeren tumor- und metastasenfremem Überleben der Mausorganismen führte (1, 62). Außerdem belegen die Versuche die Existenz von spezifischen T-Gedächtniszellen, deren Aktivität die CSC-Formation innerhalb der Tumormasse reduziert (1, 62).

Spezifisch auf das eCC bezogen, wird weiterhin angenommen, dass die Dysregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 das Tumorwachstum beschleunigt (59).

Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Pankreaskarzinomzellen in der Lage sind, das Immunsystem durch die Produktion spezieller Zytokine zu täuschen. Beispielhaft ist dabei das Zytokin GM-CSF (granulozyte macrophage – colony stimulating factor) zu nennen (63). Unter physiologischen Bedingungen initiiert dieses Glykoprotein die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen in Makrophagen und Granulozyten (63).

Pankreaskarzinomzellen scheinen die Fähigkeit zu besitzen, GM-CSF zu produzieren, um die Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen zu verhindern und folgend nicht vom natürlichen Immunsystem als körperfremd identifiziert zu werden (63). Davon ausgehend, dass GM-CSF also einerseits stammzellrelevant, andererseits auf das Immunsystem wirkt, stellt sich die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Tumorstammzellen und diesem sowie anderen immunologisch bedeutsamen Zytokinen. Möglicherweise können bestimmte Zytokine des Tumorverbands die Formation von CSCs induzieren oder ihre Resistenzmechanismen stärken.

Diese Annahmen legen nahe, dass auch das adaptive Immunsystem eine führende Rolle in der Beeinflussung von Tumorstammzellen spielt. Damit wird der Interpretationsspielraum der in dieser Studie erhobenen Ergebnisse hinsichtlich der gezielten CSC-Therapie deutlich erweitert.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die untersuchten CSCs in Zusammenhang mit der Heterogenität ihres zellulären Umfelds betrachtet werden müssen. Dies muss in der Deutung und Auslegung unserer Studienergebnisse berücksichtigt werden. Zweifelsohne sind CSCs in den hier untersuchten PDAC- und eCC-Zelllinien existent. Weiterhin wurde der Einfluss der CSCs auf die Malignität eines Tumors umfangreich in der Literatur vorbeschrieben. Dennoch ist eine genauere Charakterisierung der CSCs in ihrer zellulären Umgebung nötig, um deren Zusammenspiel schließlich im therapeutischen Kontext zu betrachten.

4.2. Beurteilung der pharmakologischen Modulation des Notch-Signalweges als „Targeted Therapy“ des PDACs und eCCs

Die vorliegenden FACS-Ergebnisse verdeutlichen, dass Notch1, Notch4, ADAM17, Musashi und Hes1 in den SP-Fraktionen der PDAC- und eCC-Zelllinien vorhanden sind. Dennoch konnte keine signifikante Über- oder Unterexpression im Vergleich zur NSP-Fraktion festgestellt werden. Dies schließt die Notch-Signalkaskade als therapeutischen Angriffspunkt jedoch nicht aus. Die erfolgte Untersuchung von lediglich fünf Antigenen ermöglicht nur einen begrenzten Einblick in das komplexe Zusammenspiel des Signalweges. Somit wäre die Charakterisierung weiterer Notch-Proteine nötig, um dessen Dimension zu erfassen. Weitere Bestandteile des Signalweges, die eine charakteristische Rolle in der Entwicklung und Progression des PDACs und eCCs spielen, sind beispielsweise Notch3, Jag2, DLL3 und DLL4 (35, 38, 64, 65).

Die Forschungsgruppe um Plentz et al. beschreibt eine Unterexpression des Notch-Zielgens Hes1 in undifferenziertem Pankreaskarzinomgewebe (64). In Gewebeproben von differenzierten Pankreaskarzinomen zeigte sich dahingegen eine starke Hes1-Expression (64). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Expression der Notch-Gene nicht nur zwischen verschiedenen Tumortypen divergiert, sondern auch innerhalb einer Tumorentität. Die in unserer Studie durchgeführten FACS-Untersuchungen, die unterschiedliche Expressionen sowohl zwischen den PDAC- und eCC-Zelllinien als auch innerhalb der jeweiligen Zelllinien darstellen, untermauern diese Hypothese.

Weiterhin wurde von Plentz und Mazur et al. gezeigt, dass die Proteine Notch2 und Hes1 in PanINs hochreguliert sind, wohingegen sie in den hier untersuchten Zelllinien einen nur

geringen Anteil an der Gesamtzellzahl ausmachen (36, 40, 64). Folgend werden die Komponenten des Notch-Signalwegs unter Umständen abhängig von der jeweiligen Entwicklungsstufe als auch dem Differenzierungsgrad des PDAC und eCC-Tumorgewebes exprimiert.

Demzufolge ist es diskussionswürdig, ob die therapeutische Notch-Inhibition schon zu einem früheren Zeitpunkt einzusetzen wäre. Möglicherweise ist der therapeutische Effekt einer gezielten Notch-Blockade bereits während der Progression der PDAC- und eCC-Kanzerogenese ausschlaggebend. Dies kann eventuell einen Grund für den nur begrenzten therapeutischen Erfolg hinsichtlich der hier untersuchten, voll-differenzierten Pankreaskarzinomzellen darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass insgesamt nur eine der drei PDAC-Zelllinien auf eine Notch-Inhibition anspricht. Die Hypothese, dass eine therapeutische Notch-Blockade also schon im Verlauf der PDAC-Tumorformation sinnvoll wäre, könnte in Versuchen an PanIN-, IPMN- oder MCN- Gewebeproben verifiziert werden.

Weiterhin muss der Notch-Signalweg als ein Puzzleteil im Zusammenspiel molekularer Prozesse aufgefasst werden. Es existiert eine Vielzahl komplexer Signalkaskaden, welche die PDAC- und eCC-Tumorbiologie entscheidend beeinflussen.

In Hinblick auf den Stellenwert weiterer embryonaler Signalkaskaden ist zweifelsohne der Hedgehog-Signalweg aufzuführen (66, 67). Bezogen auf das Cholangiokarzinom konnten El Khatib et al. eine hohe Expression des Hedgehog-Liganden Shh (Sonic Hedgehog) innerhalb der Zelllinien TFK und EGI zeigen, die ebenfalls in der hier erörterten Studie verwendet wurden (68). Inhibitoren dieser Signalkaskade, wie beispielsweise Cyclopamin und 5E1, konnten die Viabilität sowie Migrations- und Invasionsfähigkeit der eCC-Zellen verringern und im Mausmodell eine Reduktion der Tumormasse erzielen (68). Zusätzlich gelang es der Arbeitsgruppe um Bahra, Hedgehog-Signalwegskomponenten in 50 Prozent der von ihnen untersuchten Cholangiokarzinomresektaten nachzuweisen (66). Eine anschließende Blockierung des Signalweges durch BMS-833923 und Cyclopamid konnte auch in diesem Fall die Tumormasse im Xenograft-Modell reduzieren (66). Bemerkenswerter Weise wurde festgestellt, dass der Hedgehog-Signalweg darüber hinaus desmoplastische Reaktionen von Cholangiokarzinomzellen reguliert, sich also auch auf das in 4.1. beschriebene Tumorstroma auswirkt (59, 68).

Interessant wäre es, dementsprechend den Einfluss des Notch-Signalweges auf das eCC- und PDAC-Tumorstroma zu erforschen.

Das Feld der eCC- und PDAC-relevanten Signalwege wird des Weiteren durch apoptosehemmende Kaskaden wie beispielsweise mTOR und Ras/Raf erweitert (42, 59, 69). Inhibitoren dieser Signalwege, die beispielsweise über die Blockierung der dazugehörigen aktivierenden EGF-Rezeptoren wie HER2neu wirken, werden in der Therapie des Cholangiokarzinoms bereits vielversprechend in klinischen Studien eingesetzt (20, 70). Angiogenesehemmer, die beispielsweise den VEGF-Rezeptor blockieren, werden ebenfalls in klinischen eCC-Studien untersucht (20, 70).

Der transforming growth factor β (TGF- β) wird sowohl mit der Induktion der Angiogenese des eCCs als auch des PDACs in Verbindung gebracht (42, 59). Dieses universale Zytokin ist ein basaler Bestandteil diverser Signalwege (42). Dazu zählt die Induktion der epithelial-mesenchymaler Transition (EMT), die durch die Modulation der Basalmembran die Metastasierungsfähigkeit der eCC- und PDAC-Zellen steigert (38). Die erfolgreiche Reduktion von eCC- und PDAC-Zellen durch die Hemmung von TGF- β gelang bisher jedoch nur *in vitro* (42, 59).

Mit den Komponenten des Notch-Signalwegs teilen das Zytokin TGF- β und der VEGF-Rezeptor die Eigenschaft, dass diese die Ausdifferenzierung und Funktionalität des Endothels eines Organismus grundlegend beeinflussen (42, 71). Somit resultiert die Notch-Inhibition innerhalb PDAC-Zelllinien in einer Reduktion des Proteins β -Catenin, welches als ein Schlüsselprotein der EMT bezeichnet wird (37). Demzufolge kann der Notch-Signalweg ebenfalls in Verbindung mit der deregulierten Angiogenese sowie EMT des PDACs und eCCs gebracht werden.

Von einem klinischen Blickpunkt aus betrachtet, wurde die antitumoröse Wirkung von verschiedenen selektiven Notch-Inhibitoren bereits in Phase I-Studien vorbeschrieben (72-74). Der hochpotente, spezifische Gamma Sekretase Inhibitor MK-0752 wurde zunächst in der Behandlung der Akuten Lymphatischen Leukämie eingesetzt und 2012 erstmals bei soliden Tumoren angewandt (72). In dieser Studie wurden insgesamt 103 Probanden, darunter drei Pankreaskarzinompatienten, MK-0752 in verschiedenen Dosierungsschemata oral verabreicht (72). Darunter konnte eine Abnahme Notch-assoziiertes Gene, beispielsweise der NCID, und ein klinischer Benefit beobachtet werden (72). Dosislimitierend war in diesem Fall das Auftreten gastrointestinaler Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe (72). Die gastrointestinale Toxizität des Medikaments wurde zunächst auf den grundlegenden Notch-Mechanismus, der für die Funktionalität des intestinalen Epitheliums verantwortlich ist, zurückgeführt (72). Nach Reduktion der MK-0752-Dosis konnte jedoch ein Rückgang der gastrointestinalen Nebenwirkungen festgestellt werden (72).

Eine weitere Dosisfindungsstudie der *American Society of Clinical Oncology* untersuchte 2012 die Pharmakokinetik und -dynamik des Notch-Inhibitors RO4929097 innerhalb soliden Tumoren (73). Auch hier wurde die therapeutische Potenz des GSI als auch dessen dosisabhängige gastrointestinale Toxizität beschrieben (73). Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der GSI-Applikation und steigenden IL-6 Level nachgewiesen werden (73). Dieses Ergebnis spricht für die Vernetzung des Notch-Signalweges mit dem Immunsystem (73). Diesbezüglich wurde außerdem festgestellt, dass der Notch-Signalweg die Aktivierung von tumoridentifizierenden CD4-positiven T-Zellen inhibiert (75). Eine Notch-Blockade geht also im Umkehrschluss mit einer Erhöhung CD4-positiver T-Zellen und einer potentiellen Bekämpfung des Tumors durch das adaptive Immunsystem einher (75).

Die therapeutische Wirksamkeit des GSI PF-03084014 wurde 2015 in einer weiteren Studie der *American Society of Clinical Oncology* untersucht (74). Die für die Studie ausgewählten 64 Probanden, darunter zwei Pankreaskarzinompatienten, zeigten ein unterschiedliches und dosisabhängiges Ansprechen auf die Notch-spezifische Therapie (74). Es konnte eine Reduktion des Notch-Zielgens Hes4 gezeigt, sowie eine sichere Anwendung des Therapeutikums gewährleistet werden (74). Im Gegensatz zu den Vorgängerstudien wurden die gastrointestinalen Nebenwirkungen von PF-03084014 als nur mild bis moderat beschrieben (74).

Ein Vergleich dieser Studien legt nahe, dass die verschiedenen DAPT-Inhibitoren hinsichtlich ihres Nebenwirkungsspektrums und ihrer dosisabhängigen Wirkung divergieren.

In den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten wurde nur ein GSI-Typ untersucht, nämlich GSI-IX (DAPT). Da der Notch-Signalweg jedoch diverse Bestandteile besitzt, müssen auch andere Angriffspunkte berücksichtigt werden. Somit können neben der Inhibition der Gamma Sekretase auch beispielsweise Liganden-blockierende Antikörper oder weitere, die NICD-inhibierende Peptide als Therapieziel evaluiert werden.

Als Ausblick muss eruiert werden, ob die therapeutische Effektivität verschiedener Notch-Inhibitoren in Kombination mit Gemcitabin und weiteren molekularen Signalwegs-Blockaden optimiert werden kann.

4.3. Stellenwert der therapeutischen Notch-Inhibition versus Gemcitabin in Tumorstammzellen des PDACs und eCCs

Sowohl das PDAC als auch das eCC sind hochmaligne Erkrankungen mit einer insgesamt schlechten Prognose. Dennoch konnte die Lebenserwartung der betroffenen Patienten durch die

aktuellen Therapieansätze verbessert werden. Gemcitabin zeigt in der adjuvanten und palliativen Situation einen gewissen Fortschritt (8, 20). Neuere Therapieregimen, in denen Gemcitabin mit Erlotinib und Nab-Paclitaxel kombiniert wurden, erzielten in der palliativen Therapiesituation eine Verlängerung des medianen Überlebens (14). Studien wie beispielsweise die APACT-Studie (adjuvant therapy for pancreatic cancer trial) mit Gemcitabin und nab-Paclitaxel oder die ACCORD/PRODIGE-Studie, ein modifiziertes FOLFIRINOX-Schema, zeigen ebenfalls Fortschritte in der adjuvanten Situation.

Welche Bedeutung der gezielten Notch-Inhibition in Bezug auf Tumorstammzellen in der zukünftigen Therapie des PDACs und eCCs zukommt, ist bisher noch ungeklärt. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen ein unterschiedliches Ansprechen der eCC- und PDAC-SP-Zellen auf die GSI-IX/DAPT-Behandlung. Überdies unterscheidet sich die therapeutische Antwort der SP-Zellen von jener der Gesamtzellpopulationen.

Innerhalb von 49 Stunden reduzierte die GSI-IX/DAPT-Therapie die eCC-SP-Zellfraktionen signifikant und zeigt einen zytotoxischen Effekt auf die gesamten eCC-Zellpopulationen. Die Experimente von El Khatib et al. untermauern und komplettieren diese Ergebnisse: Sie zeigten eine Reduktion von Zellviabilität, Proliferation, Migration und Invasion der EGI und TFK-Zelllinien unter der GSI-IX/ DAPT-Therapie (38). Unsere TUNEL-Ergebnisse bestätigend, zeigte sich auch in dieser Studie eine Zunahme der apoptotischen TFK-Zellen (38).

Im Gegensatz dazu sind die SP-Fractionen der PDAC-Zelllinien, welche jene der eCC-Zelllinien quantitativ unterlegen sind, refraktär zur GSI-IX/DAPT-Behandlung. Dessen ungeachtet weist GSI-IX/DAPT einen zytotoxischen Effekt auf die ASPC-Gesamtzellpopulation auf. Dies kann auf die in 1.2 und 4.1 beschriebenen, ausgeprägten Abwehrmechanismen der PDAC-SP-Zellen zurück zu führen sein.

In einem weiteren Schritt wurde die therapeutische Wirkung des etablierten Chemotherapeutikums Gemcitabin auf die eCC- und PDAC-SP-Fraktion untersucht, um sie mit der Wirksamkeit der Notch-Inhibition zu vergleichen. Die eCC-SP-Zellen betreffend, konnte eine Therapie mit Gemcitabin eine signifikante Reduktion dieser Subpopulation erzielen. Auch die Gesamtzellpopulationen zeigten ein deutliches Ansprechen auf die Gemcitabintherapie. Dahingegen ist der therapeutische Effekt von Gemcitabin auf lediglich eine der PDAC-SP-Zelllinien begrenzt: Nach 48 stündiger Gemcitabin-Behandlung konnte eine signifikante Reduktion einzig der Panc1-SP-Zellen erzielt werden. Diese Ergebnisse werden von aktuellen Studien bestätigt: So konnte eine applizierte Gemcitabintherapie im Xenograft-Modell von

Yabuuchi et al. keine Reduktion der untersuchten CD24- positiven sowie CD44-positiven Tumorstammzellen erreichen (33). Kombiniert mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor PF-03084014 konnte jedoch ein antiangiogenetischer, apoptotischer und antiproliferativer Effekt auf die Stammzellen *in vivo* beobachtet werden (33).

Weitere Veröffentlichungen legen darüber hinaus nahe, dass die Stammzellpopulation einiger Pankreaskarzinomzelllinien durch eine Gemcitabinbehandlung sogar vergrößert wird und bezeichnen den Notch-Signalweg als Urheber dieses Phänomens (33, 37). Diese Hypothese wurde in unseren Experimenten nicht untersucht, sie könnte jedoch als Hinweis auf die Aggressivität der CSCs im Pankreaskarzinom hindeuten und die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen unterstreichen.

Zusammenfassend implizieren unsere Ergebnisse, dass die Gemcitabin- und GSI-IX/DAPT-Behandlung am effektivsten in den untersuchten Zelllinien mit verhältnismäßig großen SP-Fraktionen wirkt. In den hier absolvierten Experimenten steht die Menge der jeweiligen SP-Zellen also nicht in Zusammenhang mit deren Chemoresistenz. Dementsprechend ist es denkbar, dass die CSCs verschiedener Tumorentitäten in ihrer Aggressivität variieren, da sie nicht nur Unterschiede hinsichtlich ihrer Populationsgröße, sondern auch bezüglich ihrer Chemoresistenz aufweisen.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Aktivität der CSCs neben dem Notch-Signalweg von einer Vielzahl molekularer Prozesse beeinflusst wird. Die in 4.2. erläuterten Signalkaskaden, wie Hedgehog oder mTOR, werden ebenfalls für die Selbsterneuerungs-, Metastasierungs- und Invasionsfähigkeit von CSCs des Pankreaskarzinoms verantwortlich gemacht (69).

Interessanterweise konnte durch die alleinige Blockierung dieser Signalwege in den Untersuchungen von Müller et al. keine Reduktion der CD133-positiven Pankreaskarzinomstammzellen erreicht werden (69). Wurden jedoch Inhibitoren des Hedgehog- und mTOR-Signalwegs mit Gemcitabin kombiniert, konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Abnahme des Pankreaskarzinom-Stammzellpools als auch ihrer Migrationsfähigkeit festgestellt werden (69). Demnach muss die Blockade des Notch-Signalwegs innerhalb der vorliegenden Studie ebenfalls in Kombination mit anderen Signalwegsinhibitoren in Betracht gezogen werden, um einen umfassenderen therapeutischen Ansatz in Hinblick auf die CSCs zu finden.

Des Weiteren muss bei der Interpretation unserer Ergebnisse beachtet werden, dass Gamma-Sekretase-Inhibitoren neben der Apoptoseinduktion und einer generellen Zytotoxizität eine

Vielzahl potentiell antitumoröser Effekten innehaben (35, 64, 73, 75, 76). Dementsprechend wurde der Einfluss von GSI-IX/DAPT auf die Migrations-, Proliferations-, und Invasionsfähigkeit der CSCs, welche deren malignes Potential grundsätzlich beeinflusst, in den hier absolvierten Experimenten nicht untersucht.

Die von Mullendore et al. durchgeführten Versuche zeigen, dass eine GSI-18 Therapie zu einer signifikanten Reduktion der Panc1- und Capan-Kolonieformation in weichem Agar führt, jedoch keine Auswirkungen auf das Zellwachstum und -viabilität hat (35).

Cook et al. zeigen weiterhin, dass die Kombination des GSIs MRK-003 mit Gemcitabin zu einer Nekrose im PDAC-Mausmodell führt (77). Dieser Ansatz definiert das vaskuläre System des Pankreaskarzinoms als vulnerablen Ansatzpunkt für eine Notch-Inhibition durch die Gamma-Sekretase. Dabei soll der nekrotische Effekt der GSI durch hypoxische Bedingungen gesteigert werden (77). Darüber hinaus ist bekannt, dass oxidativer Stress über die Aktivierung des Enzyms iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) die Stammzellaktivität innerhalb eCC-Zelllinien anregt (27, 59). Es ist aber problematisch, die Formation einer Nekrose und hypoxische Effekte durch die GSI-Therapie *in vitro* zu reproduzieren.

4.4. Schlussfolgerung

Die in dieser Studie erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung der selektiven Notch-Blockade und des Chemotherapeutikums Gemcitabin innerhalb der Tumorstammzellen des PDACs und eCCs zeit-, konzentrations- und zelllinienabhängig variiert. Obwohl die molekulare Komplexität der Tumoren in ihrer Gänze schwer zu erfassen ist, kann eine Therapieoptimierung nur durch ein übergreifendes, translationales Konzept erfolgen, das die Mikroumgebung eines Tumors und das Zusammenspiel verschiedener physiologischer Signalwege umfasst. Die hier erfolgte, präklinische Untersuchung des Notch-Signalweges in Tumorstammzellen trägt zur molekularen Charakterisierung pankreatobiliärer Tumoren bei und stellt ein vielversprechendes potentiell Behandlungsziel im Rahmen der „Targeted Therapies“ dar.

4.5. Limitationen

Die bedeutendste Limitation dieser Studie ist der Gebrauch von einschichtigen Zellkulturen, welche die Pathophysiologie des PDACs und eCCs nicht vollends abbilden können. Durch das Fehlen einer 3D-Struktur kann kein umfassender Rückschluss auf die in 4.2. genannten Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und den stromalen sowie vaskulären Komponenten,

als auch dem Immunsystem des Wirtsorganismus erfolgen. Da das maligne Potential eines Tumors maßgeblich von dessen Metastasierungsfähigkeit abhängt, welches wiederum durch das molekulare Umfeld mitbestimmt wird, ist die Anwendung einer durch Gewebezüchtung und -konstruktion, Mikrostrukturierung, Mikrofluidik und Biomaterialien modifizierten Matrix sinnvoll (78). Folglich können grundlegende physiologische Prozesse, wie die EMT, Angiogenese und Zell-Matrix-Interaktionen genauer abgebildet werden (53). Außerdem können auch unterschiedliche biophysikalische Zustände wie beispielsweise die in 4.1. und 4.3. beschriebene Hypoxie oder verschiedene pH-Milieus rekonstruiert werden (78). Dies könnte einen möglichen nächsten Schritt im Versuchsaufbau darstellen.

Parallel zum Verlauf der Experimente wurde angestrebt, primäre Zelllinien aus Pankreasresektaten unserer Klinik zu kultivieren. Diese sollten im Vergleich zu den etablierten Zelllinien ein konkreteres Modell von der PDAC- und eCC-Pathophysiologie demonstrieren und durch ihren patientenbezogenen Ansatz die klinische Relevanz der Notch-Blockade in CSCs verdeutlichen. Leider konnte trotz einer umfassenden Modifikation vorliegender Versuchsprotokolle keine langfristige Etablierung realisiert werden, so dass unsere Untersuchungen nicht in einem Primärkultur- oder gar Xenograftmodell durchgeführt werden konnten. Nach Abschluss der durchgeführten Versuche gelang die Kultivierung der Primärzellen schließlich. Die durch unsere Etablierung gewonnenen Erkenntnisse dienten als Grundlage nachfolgender Experimente (Daten noch nicht veröffentlicht, (58)).

Einige Studien zeigen, dass Gemcitabin in der initialen Phase der Behandlung zu einer Inhibition des PDAC-Tumorwachstums führt, die Zellen nach Elimination des Therapeutikums jedoch zu regenerieren scheinen. Konkreter demonstrieren die Experimente von Lee et al. drei Tage nach der Gemcitabinapplikation einen massiven Zelltod innerhalb der PDAC-Zelllinien BxP3 und HPAC, stellten nach drei bis vier Wochen posttherapeutisch jedoch eine erneute Konfluenz von 80 Prozent fest (37). Überdies zeigen diese Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Zunahme der Stammzellfraktion, einen höheren Anteil der Notch-Signalwegskomponenten Notch1 und Hes1 sowie steigende Migrations- und Invasionsraten (37). Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich eine zelluläre Regeneration sowie die Aktivität von Resistenzmechanismen, die scheinbar erst durch einen zurückliegenden toxischen Reiz induziert werden, vermuten. Ferner bewirkte eine anschließende GSI-IX/DAPT-Therapie der mit Gemcitabin behandelten Zelllinien wiederum eine erneute Reduktion der Stammzellfraktion, der Proteine Hes1 und der Migrations- sowie Invasionsfähigkeit (37).

Zweifelsohne besteht also ein Zusammenspiel zwischen dem zeitlichen Verlauf der Gemcitabintherapie, den Notch-Signalwegskomponenten und den Tumorstammzellen zu bestehen. Yabuuchi et al. bestätigen diese Beobachtungen im Tiermodell (33). Nach 28 Tagen konnten die PDAC-Tumormassen in Mäusen, die mit Gemcitabin und dem Gammasekretaseinhibitor PF-03084014 behandelt wurden, signifikant reduziert werden (33). Nach der Ausschwemmung der Substanzen wurde in der Mehrzahl der Versuche jedoch ein erneutes Tumorwachstum beobachtet (33). Es ist dementsprechend denkbar, dass ein Unterschied zwischen der kurz- und langfristigen Wirkung der Notch-Inhibition und Gemcitabin auf die CSCs besteht.

Auf diese interessante Fragestellung konnte in der hier vorliegenden Studie aufgrund des begrenzten Zeitfensters nicht eingegangen werden. Infolgedessen konnten in den absolvierten Versuchen keine Langzeiteffekte der Therapeutika auf die SP-Zellen evaluiert werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit liegt in der vorwiegend angewandten Methode, die FACS-Analyse. Grundlegend sind FACS-basierte Experimente lediglich eine Momentaufnahme eines komplexen molekularen Hintergrunds. Dementsprechend ist eine methodische Ausweitung durch anschließende Versuche erforderlich.

Die Höchst-Färbung wird aufgrund ihrer Abhängigkeit von der Zell- und Farbstoffkonzentration des Färbemediums, der Färbezeit und der Umgebungstemperatur als leicht störanfällig beschrieben (50-52, 54, 79). Insofern bedingt eine geringe Färbezeit eine nur unzureichende Diffusion des Farbstoffs durch die Zellmembran (50-52). Diese Fehlerquelle, ebenso das Auftreten erhöhter Zellkonzentrationen in Relation zu niedrigen Farbstoffkonzentrationen, bedingt das Auftreten falsch-negativer Ergebnisse (50-52). Dies ist auf einen Mangel der für die Färbung benötigten Moleküle zurückzuführen (50-52). Dahingegen kann eine niedrige Zellkonzentration und eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration falsch-positive Ergebnisse bedingen (50-52). Dementsprechend kann die SP-Fraktion mehr oder weniger visualisiert werden (50-52). Aufgrund dessen wurde das in unserer Arbeitsgruppe etablierte und schon mehrfach durchgeführte Färbungsprotokoll genau eingehalten. Wurde vom Protokoll abgewichen oder gab es instrumentenbezogene Probleme, wurden die Ergebnisse verworfen und nicht in die Auswertung einbezogen.

Die FACS-Analyse wird aufgrund des individuellen Gatings und der daraus resultierenden Häufung falsch-positiver oder falsch-negativer Ergebnissen oftmals als subjektiv beschrieben (53, 54, 79). In den hier beschriebenen Versuchen wurde durch die einheitliche Kalibrierung der

UV-Laser, der angewandten PJ-Färbung und dem kontinuierlichen Vergleich der Gates zwischen den Zelllinien stets angestrebt, die Versuche nachvollziehbar und normiert durchzuführen.

4.6. Ausblick und weitere Forschung

Wie in 4.5 erläutert, konnte nach Abschluss der Versuche eine Kultivierung primärer Zelllinien aus Pankreasresektaten erzielt werden. Das Nachfolgeprojekt dieser Arbeit befasst sich mit der Korrelation von CSC-Oberflächenmarkern und Notch-Signalwegskomponenten innerhalb des PDAC- und eCC-Primärmaterials mit klinischen und pathologischen Variablen, wie der TNM-Klassifikation, einer Perineural-, Venen-, und Lymphgefäßinvasion sowie der Durchführung einer Neoadjuvanten Therapie (Daten noch nicht veröffentlicht). Dieser translationale Ansatz kann die klinische Relevanz des Notch-Signalweges und der CSCs im PDAC und eCC akkurater darstellen als das zunächst angewandte Zelllinienmodell.

Auch die Forschungsgruppe um Lee et al. befasste sich mit dem Zusammenhang klinischer Parameter mit Notch-Proteinen und legten eine Korrelation zwischen einer hohen Hes1-Expression und einem schlechteren Outcome von PDAC-Patienten dar (37).

Darüber hinaus diskutierte die Forschungsgruppe Notch-assoziierte Proteine wie DLL4, Notch3 und Hey1 als potentielle prognostische Biomarker (37). Aufgrund der Tatsache, dass neben den gängigen Tumormarkern CEA, CA19-9, CK7 und CK20 keine neuen prognostischen- und diagnostischen Biomarker in den klinischen Alltag integriert werden konnten, kommt diesem Ansatz eine besondere Bedeutung zu (6). Könnten Notch-Proteine und CSCs langfristig als sinnvolle Biomarker im klinischen Kontext des PDACs und eCCs validiert werden, würden die bestehenden diagnostischen Schwierigkeiten eingegrenzt werden können.

Diesbezüglich weisen sowohl das PDAC als auch eCC ausgeprägte diagnostische Herausforderungen auf, die eine verzögerte Diagnosestellung der Patienten bedingen. Demnach gründet die hohe Anzahl der PDACs, die sich bereits bei Diagnosestellung als irresektabel herausstellen, unter anderem in den unzureichenden Screening- und Frühdiagnostikmethoden (6). Die Durchführung beispielsweise einer Abdomensonografie, Magnetresonanztomographie, Computertomographie, ERC, Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) oder eines endoskopischen Ultraschalls (EUS) basieren bisher überwiegend auf dem Auftreten cholestatischer Symptome, die tendenziell eher in einem späteren Krankheitsstadium auftreten (3, 6). Die Identifizierung weiterer Biomarker und Screeningmethoden könnten die Hürden einer frühzeitigen PDAC- und eCC-Diagnosestellung überwinden.

Als eine zusätzliche methodische Ausweitung kann die Anwendung eines *in vivo*-Modells diskutiert werden. Nach der Trennung der SP-Zellen von der Gesamtzellpopulation durch das FACS-basierte SP-Sorting können PDAC- und eCC-SP- sowie NSP-Zellen aus den Zelllinien oder dem Primärmaterial auf immundefiziente Mäuse übertragen werden. Anschließend kann eine Gemcitabin- und GSI-IX/DAPT-Behandlung erfolgen. Nach Finalisierung der Versuchstiere können histopathologische Parameter bezüglich des Tumorwachstums und der Metastasierungsfähigkeit sowie die Ausprägung Notch-spezifischer Oberflächenmarker in SP- und NSP-Tumoren erhoben und verglichen werden. Demzufolge kann die Charakterisierung der CSCs und das Therapieansprechen der Tumoren auf eine selektive Notch-Inhibition in einem lebenden Organismus reproduziert und deren Wechselwirkung analysiert werden. Auch wenn diesem Modell methodische, transplantat- und speziesbedingte Schwierigkeiten anhaften, sollte dessen Durchführung angestrebt werden, um das Verständnis über die Rolle des Notch-Signalwegs und der CSCs in der eCC- und PDAC-Tumorbiologie zu präzisieren.

Um die Komplexität der eCC- und PDAC-Pathophysiologie zu erfassen, wurden zuletzt auch genetisch modifizierte Mausmodelle angewandt (53). Bisher gestaltete es sich im Allgemeinen schwierig, dahingehend reproduzierbare und quantitativ verwertbare Ergebnisse zu erlangen. Die Annahme, dass genetische Alterationen die Tumorbiologie PDACs und eCCs beeinflussen, wurde jedoch schon durch diverse Publikationen vorbeschrieben (80). Die erste, das komplette PDAC-Exom sequenzierende Studie wurde 2008 durchgeführt (80). Diese enthüllte den Einfluss zahlreicher Genalterationen in Form von Copy Number Variations (CNVs) auf die Funktion bedeutender Tumorsuppressor- und Onkogene, darunter Kras, TGF- β sowie EMT- und mTOR-assoziierte Proteine (80).

2017 erstellte das *Cancer Genome Atlas Research Network* daraufhin genomische, transkriptionelle und proteomische Profile von 150 PDAC-Patienten, um die Existenz weiterer DNA-Alterationen und Mutationen der Proteinexpressionen nachzuweisen (80). Durch diese Studie wurden vorher unbekannte Keimbahnmutationen und neue Onkogene identifiziert, welche die Tumorabwehr des Wirtsmechanismus schwächen (80). Darüber hinaus wurden Zusammenhänge zwischen nicht-kodierenden RNA-Abschnitten mit verschiedenen, tumorspezifischen mRNA-Subtypen aufgedeckt, die durch beispielsweise DNA-Methylierungen modifiziert werden (80).

Diese molekulare Analyse der genetischen Patientenprofile kann in der Folge genutzt werden, um jene Mutationen als potentielle therapeutische Angriffspunkte zu detektieren und somit eine effektivere und individuelle Behandlungsstrategie zu ermöglichen. Dass die Mehrzahl der

Targeted Therapies nur erfolgreich sind, wenn das molekulare Ziel auch wirklich dysreguliert ist, ist vielfältig vorbeschrieben (46). Durch die Detektion der Mutationen und die darauf gründende, selektive Behandlung der Zielpopulationen könnten unwirksame Anwendungen und die daraus resultierenden Nebenwirkungen vermieden werden (46).

Dieser komplexe molekulare Hintergrund kann perspektivisch durch die Analyse Notch-spezifischer Gene ergänzt werden. Die variierenden Expressionen der Notch-Proteine könnten zukünftig durch den Nachweis von somatischen Mutationen, CNVs oder Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), also der jeweilig modifizierten Gene oder Basenpaare, begründet werden. Daraus kann abgeleitet werden, ob möglicherweise auch in Hinblick der Notch-Gene somatische- beziehungsweise Keimbahnmutationen oder eine Beeinflussung durch epigenetische Mechanismen wie die DNA-Methylierung vorliegen. In einem weiteren Schritt kann die Ausprägung der Notch-Gene innerhalb des PDACs und eCCs mit klinischen Parametern korreliert werden und ein Vergleich der jeweiligen Genexpressionen beider Tumorentitäten erfolgen. Somit in könnten die in 4.3. beschriebenen, molekularen Charakteristika beider Tumorentitäten weiter determiniert werden.

Außerdem können Polymorphismen solcher Gene detektiert werden, welche die Pharmokokinetik- und -dynamik eines Medikaments beeinflussen. Die ausgeprägte Chemoresistenz des PDAC und eCCs ließe sich demnach auf die Genpolymorphismen, welche eine geringere Bioverfügbarkeit der Substanzen verursachen, zurück führen.

Die Relevanz dieses Ansatzes zeigte sich bereits in der Anwendung von Gamma-Sekretase-Inhibitoren. Tolcher et al. konnten die CYP3A4-abhängige Metabolisierung der Substanzen demonstrieren und dementsprechend eine starke Wechselwirkung mit anderen Medikamenten wie Midazolam detektieren (73). Es ist bekannt, dass die Aktivität der CYP-Enzyme aufgrund genetischer Variationen von Patient zu Patient divergiert und damit eine beschleunigte oder abgeschwächte Metabolisierung einiger Medikamente bedingt (73).

Diese Erkenntnisse deuten auf eine starke interindividuelle Heterogenität der betroffenen Patienten hin und rechtfertigen die Suche nach weiteren genetischen Aberrationen.

Dementsprechend ist bezüglich des klinischen Einsatzes von Notch-Inhibitoren der genetische Hintergrund eines jeden Patienten, sowie externe Faktoren wie die Einnahme zusätzlicher Medikamente zu beachten.

Dabei stellt der Sprung von der experimentellen Erforschung zum klinischen Einsatz eine bedeutende Limitation der neuen Behandlungsstrategien dar. Die hohe individuelle molekulare Diversität sowie unzureichende Kohortengrößen bedingen eine langwierige Erforschung der

Präparate und erschweren die Durchführung umfassender *in vivo*- Experimente (46). Auch in den laufenden Phase-I-Studien mit Gamma-Sekretase-Inhibitoren ist eine Erweiterung der Patientenkohorten zukünftig von großem Wert, um diffundierte Aussagen über das Patientenoutcome treffen zu können und deren breite Anwendung im klinischen Alltag zu ermöglichen.

Weiterhin verkompliziert die mangelnde Patientenakzeptanz gegenüber genetischer Testung dessen klinischen Einsatz (45, 81). Diesbezüglich muss eine umfassende Aufklärung über die Durchführung und Bedeutung der molekularen Analyse erfolgen, um das Verständnis der Patienten diesbezüglich zu festigen (81).

Zusammenfassend scheint aufgrund der Fortschritte in der personalisierten Medizin ein Paradigmenwechsel in der Onkologie bevorzuzustehen. Dieser ermöglicht wichtige Einblicke in die vielschichtige und individuell variierende Pathophysiologie pankreatobiliärer Tumoren und eröffnet damit neue Perspektiven für eine frühe Detektion der Krankheiten. Um eine konsequente Therapieoptimierung zu erreichen, müssen auf lange Sicht genetische Ansätze mit der zellulären Heterogenität und dem komplexen Signalwegsmosaik eines Tumors integriert und in einem validierten klinischen Versuchsaufbau rekonstruiert werden. Die Erkenntnisse aus den einzelnen Teilbereichen können folgend die breite Anwendung der individualisierten, patientenzentrierten Krebstherapie ermöglichen.

Referenzen

1. Lévy C, Amirache F, Girard-Gagnepain A, Frecha C, Costa C, Bernadin O, Negre D, Didier G, Rik Cosset F, Verhoeyen E. 1. Measles Virus Glycoprotein Pseudotyped Lentiviral Vectors Transduce Cytokine Stimulated and Resting Hematopoietic Stem Cells at an Efficiency Without Precedent. *Molecular Therapy*. 2015;23:S1.
2. Bailey JM, DelGiorno KE, Crawford HC. The secret origins and surprising fates of pancreas tumors. *Carcinogenesis*. 2014;35(7):1436-40.
3. Razumilava N, Gores GJ. Classification, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013;11(1):13-21 e1; quiz e3-4.
4. Seufferlein T, Porzner M, Heinemann V, Tannapfel A, Stuschke M, Uhl W. Ductal pancreatic adenocarcinoma. *Deutsches Arzteblatt international*. 2014;111(22):396-402.
5. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e VaZfKaRK-I. Krebs in Deutschland 2007/2008. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, ed R Koch-Institut. 2012;8.
6. Schmuck RB, de Carvalho-Fischer CV, Neumann C, Pratschke J, Bahra M. Distal bile duct carcinomas and pancreatic ductal adenocarcinomas: postulating a common tumor entity. *Cancer medicine*. 2016;5(1):88-99.
7. Königsrainer A. Pankreaskarzinom: State of the Art 2015. 112(39). 2015:4.
8. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zulke C, Fahlke J, Arning M.B, Sinn M, Hinke A, Riess H. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *Jama*. 2013;310(14):1473-81.
9. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul J.L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C, Bennouna J, Bachet J.B, Khemissa-Akouz F, Pere-Verge D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;364(19):1817-25.
10. Neoptolemos JP, Palmer DH, Ghaneh P, Psarelli EE, Valle JW, Halloran CM, Faluyi O, O'Reilly D.A, Cunningham D, Wadsley J, Darby S, Meyer T, Gillmore R, Anthony A, Lind P, Glimelius B, Falk S, Izbicki J, Middleton G.W, Cummins S, Ross P.J, Wasan H, McDonald A, Crosby T, Ma Y.T, Patel K, Sherriff D, Soomal R, Borg D, Sothi S, Hammel P, Hackert T, Jackson R, Büchler M.W. Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with

gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017;389(10073):1011-24.

11. Ouaiissi M, Hubert C, Verhelst R, Astarci P, Sempoux C, Jouret-Mourin A, Loundou A, Gigot JF. Vascular reconstruction during pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas improves resectability but does not achieve cure. *World J Surg*. 2010;34(11):2648-61.
12. Mollberg N, Rahbari NN, Koch M, Hartwig W, Hoeger Y, Buchler MW, Weitz J. Arterial resection during pancreatectomy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Annals of surgery*. 2011;254(6):882-93.
13. Wu YL, Yan HC, Chen LR, Gao SL, Chen J, Dong X. Extended Appleby's operation for pancreatic cancer involving celiac axis. *J Surg Oncol*. 2007;96(5):442-6; discussion 7.
14. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin S. A, Ma W. W, Saleh M. N., Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan R. K, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler M. F. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine*. 2013;369(18):1691-703.
15. Wong G.Y, Schroeder D.R, Carns P.E, Wilson J.L, Martin D.P, Kinney M.O, Mantilla C.B, Warner D.O. Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *Jama*. 2004;291(9):1092-9.
16. Moss AC, E. Morris, P. Mac Mathuna. Palliative biliary stents for obstructing pancreatic carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(2006(1)):CD004200.
17. Speer AG, Cotton P.B, Russell R.C, Mason R.R, Hatfield A.R, Leung J.W, MacRae K.D, Houghton J, Lennon C.A. Randomised trial of endoscopic versus percutaneous stent insertion in malignant obstructive jaundice. *Lancet*. 1987(2(8550)):57-62.
18. DiFronzo LA, S. Egrari, T.X. O'Connell. Choledochoduodenostomy for palliation in unresectable pancreatic cancer. *Arch Surg*. 1998(133(8):):820-5.
19. Aranha GV, R.A. Prinz, H.B. Greenlee. Biliary enteric bypass for benign and malignant disease. *Am Surg*. 1987 (53(7)):403-6.
20. Blechacz B, Gores GJ. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology*. 2008;48(1):308-21.
21. Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1215-29.

22. Vogel AW, H.; Caca.; Nashan, B.; Neumann, U. Diagnostik und Therapie von Cholangiokarzinomen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2014;111(44):748-54.
23. Blehacz B, Komuta M, Roskams T, Gores GJ. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(9):512-22.
24. Bahra M JD, Langrehr JM, Neumann UP, Neuhaus P. Carcinoma of the distal and middle bile duct: surgical results, prognostic factors, and long-term follow-up. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*.15(5):501-7.
25. Hezel AF, Deshpande V, Zhu AX. Genetics of biliary tract cancers and emerging targeted therapies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(21):3531-40.
26. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M, Laino L, De Francesco F, Papaccio G, Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(1):13-24.
27. Greaves M. Cancer stem cells as 'units of selection'. *Evolutionary applications*. 2013;6(1):102-8.
28. Wang X, Liu Q, Hou B, Zhang W, Yan M, Jia H, Li H, Yan D, Zheng F, Ding W, Yi C, Hai W. Concomitant targeting of multiple key transcription factors effectively disrupts cancer stem cells enriched in side population of human pancreatic cancer cells. *PloS one*. 2013;8(9):e73942.
29. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*. 2011;17(3):313-9.
30. Lagadec C, Vlashi E, Frohnen P, Alhiyari Y, Chan M, Pajonk F. The RNA-binding protein Musashi-1 regulates proteasome subunit expression in breast cancer- and glioma-initiating cells. *Stem cells*. 2014;32(1):135-44.
31. Zhou Q, Wang Y, Peng B, Liang L, Li J. The roles of Notch1 expression in the migration of intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC cancer*. 2013;13:244.
32. Zender S, Nickeleit I, Wuestefeld T, Sorensen I, Dauch D, Bozko P, El-Khatib M, Geffers R, Bektas H, Manns M. P, Gossler A, Wilkens L, Plentz R, Zender L, Malek N. P.A. critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer cell*. 2013;23(6):784-95.
33. Yabuuchi S, Pai SG, Campbell NR, de Wilde RF, De Oliveira E, Korangath P, Streppel M. M, Rasheed Z. A., Hidalgo M, Maitra A, Rajeshkumar N. V. Notch signaling pathway

targeted therapy suppresses tumor progression and metastatic spread in pancreatic cancer. *Cancer letters*. 2013;335(1):41-51.

34. Ristorcelli E, Lombardo D. Targeting Notch signaling in pancreatic cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2010;14(5):541-52.

35. Mullendore ME, Koorstra JB, Li YM, Offerhaus GJ, Fan X, Henderson CM, Matsui W, Eberhart C. G, Maitra A, Feldmann, G. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(7):2291-301.

36. Mazur PK, Einwachter H, Lee M, Sipos B, Nakhai H, Rad R, Zimber-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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(30):13438-43.

37. Lee JY, Song SY, Park JY. Notch pathway activation is associated with pancreatic cancer treatment failure. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*. 2014;14(1):48-53.

38. El Khatib M, Bozko P, Palagani V, Malek NP, Wilkens L, Plentz RR. Activation of Notch signaling is required for cholangiocarcinoma progression and is enhanced by inactivation of p53 in vivo. *PloS one*. 2013;8(10):e77433.

39. Bolos V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocrine reviews*. 2007;28(3):339-63.

40. Avila JL, Kissil JL. Notch signaling in pancreatic cancer: oncogene or tumor suppressor? *Trends in molecular medicine*. 2013;19(5):320-7.

41. Abel EV, Kim EJ, Wu J, Hynes M, Bednar F, Proctor E, Wang L, Dziubinski M. L., Simeone D. M. The Notch pathway is important in maintaining the cancer stem cell population in pancreatic cancer. *PloS one*. 2014;9(3):e91983.

42. Vaccaro V, Melisi D, Bria E, Cuppone F, Ciuffreda L, Pino MS, Gelibter A, Tortora G, Cognetti F, Milella M. Emerging pathways and future targets for the molecular therapy of pancreatic cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011;15(10):1183-96.

43. Nakanuma Y. A novel approach to biliary tract pathology based on similarities to pancreatic counterparts: is the biliary tract an incomplete pancreas? *Pathology international*. 2010;60(6):419-29.

44. Lammert E BJ, Melton DA. Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech Dev*. 2000;94(1-2):199-203.

45. Le Tourneau C, Delord J.P, Gonçalves A, Gavaille C, Dubot C, Isambert N, Campone M, Trédan O, Massiani MA, Mauborgne C, Armanet S, Servant N, Bièche I, Bernard V, Gentien D, Jezequel P, Attignon V, Boyault S, Vincent-Salomon A, Servois V, Sablin MP, Kamal M, Paoletti X; Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial *Lancet Oncol.* 2015;16: 1324–34.
46. Catenacci DV. Next-generation clinical trials: Novel strategies to address the challenge of tumor molecular heterogeneity. *Molecular oncology.* 2015;9(5):967-96.
47. Tsimberidou AM, Iskander NG, Hong DS, Wheler JJ, Falchook GS, Fu S, Piha-Paul S, Naing A, Janku F, Luthra R, Ye Y, Wen S, Berry D, Kurzrock R. Personalized medicine in a phase I clinical trials program: the MD Anderson Cancer Center initiative. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2012;18(22):6373-83.
48. Deshpande V, Konstantinidis IT, Castillo CF, Hezel AF, Haigis KM, Ting DT, Bardeesy N, Goyal L, Zhu A. X, Warshaw A. L, Lillemoe K. D, Ferrone, C. R. Intra-pancreatic Distal Bile Duct Carcinoma is Morphologically, Genetically, and Clinically Distinct from Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract.* 2016.
49. I B. Tumorstammzellen: Wie man die Basis ausschalten will. *Deutsches Ärzteblatt.* 2012;109(49).
50. Goodell MA. Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP). *Current protocols in cytometry.* 2005;Chapter 9:Unit9 18.
51. Steen HB, Stokke, T. Fluorescence Spectra of Cells Stained With a DNA-Specific Dye, Measured by Flow Cytometry. *Cytometry.* 1986;7:104- 6.
52. Steen HB, Stokke, T. Binding of Hoechst 33258 to Chromatin In Situ'. *Cytometry.* 1986;7:227-34
53. Han Y, Gu Y, Zhang AC, Lo YH. Review: imaging technologies for flow cytometry. *Lab on a chip.* 2016;16(24):4639-47.
54. Barteneva NS, Fasler-Kan E, Vorobjev IA. Imaging flow cytometry: coping with heterogeneity in biological systems. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 2012;60(10):723-33.
55. Van den broeck A. Vankelecom H, Van Delm W, Gremeaux L, Wouters J, Allemeersch J, Govaere O, Roskams T, Topal B. Human pancreatic cancer contains a side population expressing cancer stem cell-associated and prognostic genes. *PloS one.* 2013;8(9):e73968

56. Wang M, Xiao J, Shen M, Yahong Y, Tian R, Zhu F, Jiang J, Du Z, Hu J, Liu W, Qin R. Isolation and characterization of tumorigenic extrahepatic. *International Journal of Cancer*. 2011;128:72–81.
57. Qu C. Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Cancer: Should They Be Deleted or Reeducated? *Integr Cancer Ther*. 2018;17(4):1016–9.
58. Neumann CCM vHE, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB. Tumor–stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2018;17(5):461-72.
59. Mancinelli R, Mammola C, Sferra R, Pompili S, Vetuschi A, Pannarale L. Role of the Angiogenic Factors in Cholangiocarcinoma. *Applied Sciences*. 2019;9(7):1393.
60. von Ahrens D, Bhagat TD, Nagrath D, Maitra A, Verma A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2017;10(1):76.
61. Torphy RJ, Zhu Y, Schulick RD. Immunotherapy for pancreatic cancer: Barriers and breakthroughs. *Annals of gastroenterological surgery*. 2018;2(4):274-81.
62. Schmidt P. Successful immunotherapy of cancer stem cells requires memory and the adaptive immune system of the host. *Cancer Immunology Research*. 2016;4(1):B067-B.
63. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer cell*. 2012;21(6):836-47.
64. Plentz R, Park JS, Rhim AD, Abravanel D, Hezel AF, Sharma SV, Gurumurthy S, Deshpande V, Kenific C, Settleman J, Majumder PK, Stanger BZ, Bardeesy N. Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1741-9 e6.
65. Kang M, Jiang B, Xu B, Lu W, Guo Q, Xie Q, Zhang B, Dong X, Chen D, Wu Y. Delta like ligand 4 induces impaired chemo-drug delivery and enhanced chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer letters*. 2013;330(1):11-21.
66. Riedlinger D, Bahra M, Boas-Knoop S, Lippert S, Bradtmoller M, Guse K, Seehofer D, Bova R, Sauer IM, Neuhaus P, Koch A, Kamphues C. Hedgehog pathway as a potential treatment target in human cholangiocarcinoma. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2014;21(8):607-15.
67. Hao K, Tian XD, Qin CF, Xie XH, Yang YM. Hedgehog signaling pathway regulates human pancreatic cancer cell proliferation and metastasis. *Oncology reports*. 2013;29(3):1124-32.

68. El Khatib M, Kalnytska A, Palagani V, Kossatz U, Manns MP, Malek NP, Wilkens L, Plentz RR. Inhibition of hedgehog signaling attenuates carcinogenesis in vitro and increases necrosis of cholangiocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013;57(3):1035-45.
69. Mueller MT, Hermann PC, Witthauer J, Rubio-Viqueira B, Leicht SF, Huber S, Ellwart JW, Mustafa M, Bartenstein P, D'Haese JG, Schoenberg MH, Berger F, Jauch KW, Hidalgo M, Heeschen C. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2009;137(3):1102-13.
70. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. *British journal of cancer*. 2008;98(2):418-25.
71. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
72. Krop I, Demuth T, Guthrie T, Wen PY, Mason WP, Chinnaiyan P, Butowski N, Groves MD, Kesari S, Freedman SJ, Blackman S, Watters J, Loboda A, Podtelezhnikov A, Lunceford J, Chen C, Giannotti M, Hing J, Beckman R, Lorusso P. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(19):2307-13.
73. Tolcher AW, Messersmith WA, Mikulski SM, Papadopoulos KP, Kwak EL, Gibbon DG, Patnaik A, Falchook GS, Dasari A, Shapiro GI, Boylan JF, Xu ZX, Wang K, Koehler A, Song J, Middleton SA, Deutsch J, Demario M, Kurzrock R, Wheler JJ. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(19):2348-53.
74. Messersmith WA, Shapiro GI, Cleary JM, Jimeno A, Dasari A, Huang B, Huang B, Shaik MN, Cesari R, Zheng X, Reynolds JM, English PA, McLachlan KR, Kern KA, LoRusso PM. A Phase I, dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral gamma-secretase inhibitor PF-03084014. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(1):60-7.
75. Ostroukhova M, Qi Z, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Ray P, Ray A. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(4):996-1004.

76. Kared H, Adle-Biassette H, Fois E, Masson A, Bach JF, Chatenoud L, Schneider E, Zavala F. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity*. 2006;25(5):823-34.
77. Cook N, Frese KK, Bapiro TE, Jacobetz MA, Gopinathan A, Miller JL, Rao SS, Demuth T, Howat WJ, Jodrell DI, Tuveson DA. Gamma secretase inhibition promotes hypoxic necrosis in mouse pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(3):437-44.
78. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front Bioeng Biotechnol* 2016;4(12).
79. Aghaeepour N, Finak G, Flow CAPC, Consortium D, Hoos H, Mosmann TR, Brinkman R, Gottardo R, Scheuermann RH. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nature methods*. 2013;10(3):228-38.
80. Cancer Genome Atlas Research Network. Electronic address aadhe, Cancer Genome Atlas Research N. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer cell*. 2017;32(2):185-203 e13.
81. Gray SW, Hicks-Courant K, Lathan CS, Garraway L, Park ER, Weeks JC. Attitudes of patients with cancer about personalized medicine and somatic genetic testing. *Journal of oncology practice*. 2012;8(6):329-35, 2 p following 35.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elisabeth Seidel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung von Tumorstammzellen in pankreatobiliären Karzinomen: Der Notch-Signalweg als potentielles Therapieziel“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Elisabeth Seidel hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: "Characterization of the Stem Cell Fraction in Pancreatobiliary Carcinomas: The Notch Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Target", Journal of Cancer Therapy, Special Issue zum Thema "Cancer Stem Cells", Seidel E, de Carvalho Fischer C, Neumann CCM, Reutzel-Selke A, Andreou A, Gassner J, Gogolok J, Tang P, Schirmeier A, Klein F, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB 09(06):480-502, Januar 2018; DOI: 10.4236/jct.2018.96040:

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Ausarbeitung der Studie gemeinsam mit Prof. Dr. med. Marcus Bahra und Dr. Rosa Schmuck. Planung und Durchführung der Zellkultur- und FACS-Versuche. Etablierung des CellToxGreen Cytotoxicity Assays. Testen des in Situ Cell Death Detection Kits mit Durchführung der TUNEL-Versuche. Hauptanteil an der Aufarbeitung und Auswertung der erhobenen Daten in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren. Selbstständige graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen. Wesentlicher Beitrag zur kritischen Würdigung der Resultate mit Identifikation der relevanten Aussagen der Studie einschließlich ihrer Limitationen. Erarbeitung des zur Publikation führenden Manuskripts gemeinsam mit den Ko-Autoren sowie Hauptanteil an der Revision und Umsetzung der Reviewer- Kommentare.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1) "Characterization of the Stem Cell Fraction in Pancreatobiliary Carcinomas: The Notch Signaling Pathway as a Potential Therapeutic Target", Journal of Cancer Therapy, Special Issue zum Thema "Cancer Stem Cells", Seidel E, de Carvalho Fischer C, Neumann CCM, Reutzel-Selke A, Andreou A, Gassner J, Gogolok J, Tang P, Schirmeier A, Klein F, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB 09(06):480-502, Januar 2018; DOI: 10.4236/jct.2018.96040

2) „Tumor–stromal cross-talk modulating the therapeutic response in pancreatic cancer“, Neumann CCM, von Hörschelmann E, Reutzel-Selke A, Seidel E, Sauer IM, Pratschke J, Bahra M, Schmuck RB, Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International 17(5): 461-472.

Danksagung

Mein Dank gilt folgenden Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben: Dr. Rosa Schmuck, Prof. Marcus Bahra, Prof. Igor Sauer, Cynthia de Carvalho Fischer, Anja Reutzel-Selke, Anja Schirmeier, Peter Tang und Joseph Gassner. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Dr. Katrin und Hans-Ulrich Seidel, meiner Großmutter Lisa Seidel, meinem Bruder Adrian Seidel sowie Lukas Ernst, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben.