

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Klinikum Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch

# **Gezielte Kombinationstherapie zur Eliminierung von Tumorstammzellen im humanen Pankreaskarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Maria-Theresa Müller**

aus

Donauwörth

Jahr

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christopher Heeschen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres

Mitberichtersteller: Priv.-Doz. Dr. Marcus Hentrich

Prof. Dr. Klaus Hallfeldt

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

**Diese Promotion widme ich meinen Eltern,  
welchen ich dieses Studium  
zu verdanken habe**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Das Pankreaskarzinom	6
1.2	Therapie des Pankreaskarzinoms	7
1.2.1	Gemcitabin	7
1.3	Tumorstammzellhypothese	8
1.4	Identifizierung von Tumorstammzellen	10
1.5	Tumorstammzellen und Standard (Chemo) Therapie	13
1.6	Für das Pankreaskarzinom relevante Signaltransduktionswege	16
1.6.1	Der Hedgehog Signalweg	16
1.6.2	Der mTOR Signalweg	18
1.7	Fragestellung	21
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>22</b>
2.1	Kulturbedingungen und Tumorzelllinien	22
2.1.1	Zellkultur	22
2.1.2	Sphärenbildung	22
2.1.3	Humane Pankreaskarzinomzelllinien	23
2.2	Verarbeitung von primärem humanen Pankreaskarzinomgewebe	24
2.3	Analyse von Zellen mittels Antikörpern und Farbstoffen	24
2.3.1	Durchflusszytometrie und Antikörper	24
2.3.2	Side Population	25
2.3.3	Bestimmung der mTOR Aktivität	25
2.4	Migrationsassay	27
2.5	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	27
2.6	Orthotopes Pankreaskarzinom-Modell	27
2.7	<i>In vivo</i> Expansion von Primärgewebe	28
2.8	<i>In vitro</i> Behandlung pankreatischer Tumorzelllinien	29
2.9	<i>In vivo</i> Behandlung bereits bestehender Pankreaskarzinome	30
2.10	Bildgebung	30
2.10.1	Positronen-Emissions-Tomographie	30
2.10.2	Magnetresonanztomographie	31

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>32</b>
3.1	<i>In vitro</i> Effekte nach Shh und mTOR Signalweg Blockade.....	32
3.1.1	Behandlungseffekte auf CD133 <sup>+</sup> L3.6pl Zellen .....	32
3.1.2	Inhibition der Aktivität des mTOR und Shh Signalweges.....	34
3.1.3	Behandlungseffekte auf die Zelllinie AsPC1 .....	40
3.1.4	Behandlungseffekte auf Tumorsphären.....	42
3.1.5	Side Population.....	44
3.2	Behandlungsauswirkungen auf primäre Pankreaskarzinomzellen .....	46
3.3	Verlust der metastatischen Aktivität nach Shh Inhibition .....	48
3.4	Verlust der Tumorigenität nach <i>in vitro</i> Vorbehandlung .....	52
3.5	Verbessertes Langzeitüberleben nach gezielter <i>in vivo</i> Behandlung .....	54
3.5.1	Tiere nach orthotoper Implantation von L3.6pl Zellen.....	54
3.5.2	Tiere nach subkutaner Implantation von Primärgewebe.....	59
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>62</b>
4.1	Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	62
4.1.1	Sonic hedgehog Signaltransduktionsweg.....	62
4.1.2	mTOR Signaltransduktionsweg .....	64
4.1.3	Tumorstammzellmarker und Heterogenität der Pankreastumorzellen .. .....	65
4.1.4	Side Population.....	69
4.1.5	Kombinationstherapie .....	71
4.2	Hat das Tumorstammzellkonzept allgemeine Gültigkeit?.....	75
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>83</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige Neubildung der Bauchspeicheldrüse, bei der es sich überwiegend um Adenokarzinome handelt, die im Großteil der Fälle den Pankreaskopf betreffen (70% der Fälle). Ausgangspunkt ist in 90% das Epithel der kleinen Pankreasgänge (duktales Karzinom) und in 10% das Azinusepithel (azinäres Karzinom). Etwa 3,5% aller Krebserkrankungen sind Pankreaskarzinome. Sie sind für etwa 5,8% aller Krebstodesfälle verantwortlich und sind die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und fünfhäufigste bei Männern (Jemal, Siegel et al. 2008). Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist in den letzten Jahren steigend und liegt für Männer bei 14,4 und für Frauen bei 18,3 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Der Altersgipfel liegt in der 7. bis 8. Lebensdekade, wobei 2/3 aller Patienten älter als 60 Jahre sind. Damit stellt das Pankreaskarzinom in zunehmendem Maße ein öffentliches Gesundheitsproblem dar. Die Erkrankung ist charakterisiert durch ein ausgeprägtes lokal invasives Wachstum, sowie eine frühzeitige lymphatische und hämatogene Metastasierung (Wanebo und Vezeridis 1996; Brand und Tempero 1998). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die Erkrankung nur bei 20% der Patienten auf die Bauchspeicheldrüse beschränkt, bei 40% der Patienten ist die Tumorerkrankung bereits lokal fortgeschritten und bei den übrigen 40% der Patienten liegen bereits viszerale Metastasen vor (Wanebo und Vezeridis 1996; Burris, Moore et al. 1997; Brand und Tempero 1998). Mangels adäquater Möglichkeiten zur Frühdiagnose aufgrund fehlender Frühsymptome, unzureichender bildgebender Verfahren und der Aggressivität der Erkrankung, zusammen mit der offensichtlichen Ineffektivität bisheriger Therapieansätze ist die Inzidenzrate beim Pankreasadenokarzinom weitgehend gleichzusetzen mit der Mortalitätsrate. Die 5-Jahres-Überlebensrate für exokrine Pankreasadenokarzinome liegt nach wie vor nur bei maximal 5% (Ahlgren 1996; Rothenberg, Moore et al. 1996; Jemal, Siegel et al. 2008) und die mediane Überlebenszeit im metastasierten Stadium trotz Einsatz unterschiedlichster palliativer Therapiekonzepte bei 5 Monaten (Warshaw und Fernandez-del Castillo 1992; Rosewicz und Wiedenmann 1997; Hedberg, Borgstrom et al. 1998). Damit gehört das Pankreaskarzinom zu den Tumorentitäten, bei denen sich im Laufe der letzten 25

Jahre keine wesentlichen Verbesserungen in der Überlebenszeit ergeben haben (Jemal, Siegel et al. 2008).

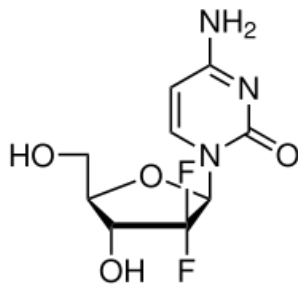
## **1.2 Therapie des Pankreaskarzinoms**

Trotz bedeutendem Erkenntnisgewinn in der Tumorbiologie ist die Effizienz der Behandlung von Pankreaskarzinomen im Laufe der letzten Jahrzehnte nicht signifikant gestiegen (Jemal, Siegel et al. 2008) und im Hinblick auf klinische Endpunkte wurden kaum Fortschritte erzielt. Die operative Entfernung des Tumors stellt nach wie vor die einzige Therapie mit kurativem Ansatz beim Pankreaskarzinom dar. Therapie der Wahl ist die En-bloc-Resektion von Pankreaskopf, Duodenum, Gallenblase mit distalem Ductus choledochus sowie der benachbarten Lymphknotenstationen (pyloruserhaltende partielle Duodeno-pankreatektomie). Die klassische Whipple-Operation unter zusätzlicher Resektion des distalen Magens ist nur noch bei Infiltration im Bereich des Bulbus duodeni indiziert. Allerdings beinhaltet die Chirurgie ein hohes Maß an Radikalität, ist nur in 10-20% der Fälle durchführbar und eine R0-Situation wird davon wiederum nur in 50% erreicht. Die Heilungsrate liegt dann bei 10% und die mediane Überlebenszeit trotz R0-Resektion bei nur 14 Monaten (Henne-Bruns, Vogel et al. 1998). Bedingt durch verbesserte loko-regionäre Tumorkontrolle nach chirurgischer Resektion ist die Lebermetastasierung die dominierende Form der Rezidivkrankung und tritt bei 50% – 70% der Patienten auch nach potenziell kurativer Behandlung auf.

### *1.2.1 Gemcitabin*

Im Feld der chemotherapeutischen Mono- und Kombinationstherapie, die ihr bisher häufigstes Einsatzgebiet im Bereich der fortgeschrittenen und metastasierten Erkrankung fand, waren die Erfolge bisher eher gering. Seit Anfang 1996 ist in Deutschland Gemcitabin (Difluordesoxycytidin) für die Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms zugelassen und hat sich inzwischen auch in der adjuvanten Situation bei operablen Tumorstadien als wirksam erwiesen. Gemcitabin erzielte bei guter Verträglichkeit deutlich bessere Ergebnisse als eine Therapie mit 5-Fluorouracil (5-FU), die bis Ende der Neunzigerjahre zum Einsatz kam. In einer Palliativ-Studie von 1997 zeigte sich ein klinischer Benefit bei 23,8% der untersuchten Patienten unter Therapie mit Gemcitabin im Vergleich zu 4,8% in der 5-FU Gruppe. Die mittlere Überlebenszeit betrug 5,65 respektive 4,41 Monate

bei einer 1-Jahres-Überlebensrate von 18% im Vergleich zu 2% (Rothenberg, Abbruzzese et al. 1996; Burris, Moore et al. 1997).



**Abb. 1** Strukturformel  
Gemcitabin  
(PubChem 60750)

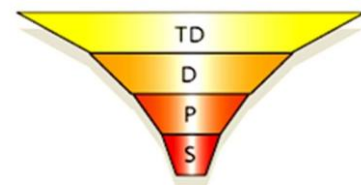
Das Pyrimidinanalogon Gemcitabin (Difluordesoxycytidin) (Abb. 1) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetaboliten. Intrazellulär wird Gemcitabin zu den aktiven Diphosphat- und Triphosphat-Nukleotiden metabolisiert, welche die DNA-Synthese hemmen. Statt des menschlichen Nucleosids Cytidin wird Gemcitabin-triphosphat in die DNA eingebaut, was schließlich zur Apoptose, einem programmierten Zelltod führt. Aus diesem Grund wirkt die Substanz Gemcitabin primär während der DNA-Synthese und damit in besonderem Maße auf stark proliferierende Zellen. Obwohl die Einführung dieses Anti-Metaboliten durch Reduktion von Schmerzen und Gewichtsverlust die klinische Response verbesserte (Matano, Tagliaferri et al. 2000), bleibt die Prognose mit einer 5 Jahres-Überlebens-Rate von 3-4% und einer medianen Überlebenszeit von 4-6 Monaten äußerst schlecht (Warshaw und Fernandez-del Castillo 1992; Ahlgren 1996; Rothenberg, Moore et al. 1996; Jemal, Murray et al. 2005). Die kürzliche Zulassung des Tyrosinkinase-Inhibitors Erlotinib in Kombination mit Gemcitabin für die Erstlinientherapie des metastasierten Pankreaskarzinoms eröffnet – nach über zehnjährigem Therapiestillstand – Betroffenen eine neue Therapieoption (Moore, Goldstein et al. 2007; Welch und Moore 2007). Aufgrund der nach wie vor infausten Prognose stellt sich jedoch die Frage nach klinischen und tumorbiologischen Faktoren, die es ermöglichen, durch gezielte Anwendung die enttäuschenden Ergebnisse der bisherigen adjuvanten Therapien zu verbessern.

### 1.3 Tumorstammzellhypothese

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe des Körpers ausdifferenzieren können. Eine für Stammzellen typische Eigenschaft ist die Fähigkeit, sich asymmetrisch zu teilen: so entsteht jeweils eine neue Stammzelle und ein Vorläufer (Progenitorzelle) des benötigten Zelltyps (Lin und Schagat 1997). Dank ihres nahezu unerschöpflichen Potenzials zur Selbsterneuerung und Generierung von Progenitorzellen erhofft man sich, dass Stammzellen bei der Therapie geschädigter Organe zur Regeneration eingesetzt werden können (Weissman 2000). Neueste wissenschaftliche Erkenntnisse lassen diesen



ehemals normalen Stammzellen jedoch infolge genetischer Veränderungen eine wichtige Rolle bei Krebserkrankungen zukommen. Bisher ging man davon aus, dass alle Zellen eines Tumors vergleichbare tumorigene Eigenschaften besitzen und so gleichermaßen zu Tumorwachstum und Metastasierung beitragen können (sogenanntes stochastisches Modell). Von lichtmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass sowohl normales Gewebe als auch Tumorgewebe aus einer heterogenen Ansammlung von Zelltypen wie Immunzellen, Stroma mit mesenchymalen und endothelialen Zellen und einer Reihe normaler beziehungsweise maligner gewebespezifischer Zellen besteht (Brabletz, Jung et al. 2005; Dick 2005; Dalerba, Cho et al. 2006; McDonald, Preston et al. 2006). Letztere Zellen in einem Tumor scheinen oftmals unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu entsprechen. Beispielsweise enthalten epitheliale Tumoren Zellen mit divergenten, nukleären Morphologien und Zeichen der Differenzierung. Diese beobachtete Tumorerheterogenität kann über eine neue Theorie zur Krebsentstehung erklärt werden (Visvader und Lindeman 2008): demnach repräsentieren die malignen Zellpopulationen eine durch die Entwicklung definierte Hierarchie an heterogenen Zelltypen und stammen von einer Subpopulation sogenannter Tumorstammzellen ab. Eine Tumorstammzelle ist definiert als eine Zelle, die exklusiv tumorigen ist, sich selbst erneuern kann und die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Tumorzellen generieren kann (Clarke, Dick et al. 2006). Ein Tumor besteht folglich aus einer sehr kleinen Population Tumorstammzellen, aus Progenitorzellen, differenzierten Zellen und terminal differenzierten Zellen (Abb.2).



**Abb. 2 Hierarchischer Aufbau eines Tumors**

*S=(Tumor)Stammzellen*

*P=Progenitorzellen*

*D=differenzierte Zellen*

*TD=terminal diff. Zellen*

*(Huntly und Gilliland 2005)*

Da Tumorstammzellen derzeit nur experimentell über ihre Fähigkeit, einen kontinuierlich wachsenden Tumor vollständig zu rekapitulieren, definiert werden können, sind in der Literatur synonyme Bezeichnungen wie „tumorigenitierende Zellen“ und „tumorigene Zellen“ zur Beschreibung möglicher Tumorstammzellen anzutreffen (Al-Hajj, Wicha et al. 2003; Singh, Hawkins et al. 2004; Kim, Jackson et al. 2005; Hermann, Huber et al. 2007; Ho, Ng et al. 2007; Li, Heidt et al. 2007; O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007). Ungeklärt ist hierbei noch der Ursprung der Tumorstammzellen. Grundsätzlich sind mindestens

zwei Szenarien denkbar: einerseits könnte es sich um einen De-differenzierungsprozess von bereits „zugewiesenen“ Vorläuferzellen oder sogar differenzierten Zellen handeln (Vicente-Duenas, Gutierrez de Diego et al. 2009), andererseits könnten Tumorstammzellen auch direkt von Gewebestammzellen abstammen. Für letztere Theorie spricht die Überlegung, dass 3 bis 6 genetische Schlüsselereignisse notwendig sind, um eine normale menschliche Zelle in eine Tumorzelle zu transformieren. Entsprechend des Tumorprogressionsmodells, das beispielhaft von Fearon und Vogelstein an den Stadien der Kolonkarzinomentwicklung etabliert wurde, handelt es sich bei der Krebsentstehung nicht um die Mutation nur eines Gens, sondern um eine sukzessive Akkumulation von Veränderungen in unterschiedlichen Genen (Fearon und Vogelstein 1990). Damit sollte die Entwicklung maligner Zellen mindestens Monate, wenn nicht sogar Jahre in Anspruch nehmen. Da viele differenzierte Zellen sich jedoch nur über wenige Wochen erneuern können, existieren sie vermutlich nicht lange genug, um entsprechenden genetischen Veränderungen zu akkumulieren.

#### **1.4 Identifizierung von Tumorstammzellen**

Den Anfang beim Nachweis potenzieller Krebsstammzellen machten Hämatologen, die sich mit den Krebserkrankungen des Blutsystems befassen und deren Untersuchungsobjekte – z.B. Leukämiezellen – vergleichsweise leicht isoliert werden können. Während erste Hinweise für das Tumorstammzellkonzept schon sehr früh gezeigt wurden (Bruce und Van Der Gaag 1963; Park, Bergsagel et al. 1971), gelang es den Wissenschaftlern Lapidot, Bonnet und Dick im Jahre 1997 bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), Zellen mit sehr hohem tumorigen Potenzial zu isolieren. Diese mutmaßlichen leukämischen Stammzellen wurden anhand von Oberflächenmarkern selektiert, die von primitiven Stammzellen der Hämatopoese bekannt waren: „cluster of differentiation“ CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> (Bonnet und Dick 1997). Nur circa 1 von 10 000 Leukämiezellen trug diese Oberflächenproteine und ausschließlich diese Subpopulation konnte nach Transplantation in immundefiziente Mäuse leukämische Vorläuferzellen und Blasten hervorbringen, die den gleichen Krankheits-Phänotyp wie beim Spender aufwiesen (exklusive Tumorigenität).

## Tumorstammzellen in soliden Tumoren

Seit dieser ersten Beschreibung sind Tumorstammzellen bei weiteren Leukämieformen und auch bei einer Vielzahl solider Tumoren nachgewiesen worden. Einen Überblick über die verschiedenen Tumorentitäten und das große Spektrum an Markern, die zur Identifizierung von Tumorstammzellen etabliert wurden, bietet folgende Tabelle:

**Tabelle 1** Verschiedene Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen in soliden Tumoren

Tumorentität	Marker	Referenz
Mammakarzinom	CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>-low</sup> CD133 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> ALDH-1 <sup>+</sup> CD49F <sup>+</sup> DLL1 <sup>high</sup> DNER <sup>high</sup>	(Al-Hajj, Wicha et al. 2003) (Wright, Calcagno et al. 2008) (Hwang-Verslues, Kuo et al. 2009) (Ginestier, Hur et al. 2007) (Pece, Tosoni et al. 2010)
Glioblastom	CD133 <sup>+</sup> SSEA-1 <sup>+</sup>	(Singh, Hawkins et al. 2004) (Son, Woolard et al. 2009)
Prostatakarzinom	CD44 <sup>+</sup> alpha2beta1 <sup>high</sup> CD133 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup>	(Collins, Berry et al. 2005) (Miki, Furusato et al. 2007)
Melanom	CD20 <sup>+</sup> ABC5 <sup>+</sup>	(Fang, Nguyen et al. 2005) (Schatton, Murphy et al. 2008)
Lungenkarzinom	Sca-1 <sup>+</sup> , CD45 <sup>-</sup> , PECAM <sup>-</sup> , CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup>	(Kim, Jackson et al. 2005) (Bertolini, Roz et al. 2009)
Leberkarzinom	CD133 <sup>+</sup> CD90 <sup>+</sup>	(Ma, Chan et al. 2007) (Yang, Ho et al. 2008)
Kolonkarzinom	CD133 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD166 <sup>+</sup>	(O'Brien, Pollett et al. 2007) (Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) (Dalerba, Dylla et al. 2007)
Pankreaskarzinom	EpCAM <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> ALDH-1 <sup>+</sup>	(Li, Heidt et al. 2007) (Hermann, Huber et al. 2007) (Hermann, Huber et al. 2007) (Feldmann, Dhara et al. 2007) (Jimeno, Feldmann et al. 2009) (Rasheed, Yang et al. 2010)

Der CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> und der CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> Phänotyp waren die ersten Zelloberflächenmerkmale, die mit der AML beziehungsweise dem Mammakarzinom in Verbindung gebracht werden konnten. Der erste in diesem Zusammenhang neu beschriebene Marker zur Identifikation von Tumorstammzellen war CD133. CD133 ist ein 120 kDa 5-Helix-Transmembranglykoprotein (Miraglia, Godfrey et al. 1997), das 1997 als neuer Zelloberflächenmarker für hämatopoetische Stammzellen entdeckt wurde (Yin, Miraglia et al. 1997). Es befindet sich außerdem auf Stamm- und Progenitorzellen nicht hämatopoetischer Gewebe wie z.B. neuronalen Stammzellen, embryonalen Stammzellen und adulten mesenchymalen multipotenten Progenitoren (Uchida, Buck et al. 2000; Kaufman, Hanson et al. 2001;

Jiang, Jahagirdar et al. 2002). Obwohl die Funktion von CD133 (AC133; humanes Promonin-1) bisher noch unbekannt ist, wird es bereits klinisch zur Isolation von Stammzellen eingesetzt. CD133<sup>+</sup> Stammzellen finden beispielsweise in der Kardiologie bei Patienten mit länger zurückliegendem (chronischem) Herzinfarkt (Stamm, Kleine et al. 2007; Yerebakan, Kaminski et al. 2007; Pompilio, Steinhoff et al. 2008) oder in der Hepatologie zur Förderung der Leberproliferation (am Esch, Knoefel et al. 2005) klinische Anwendung.

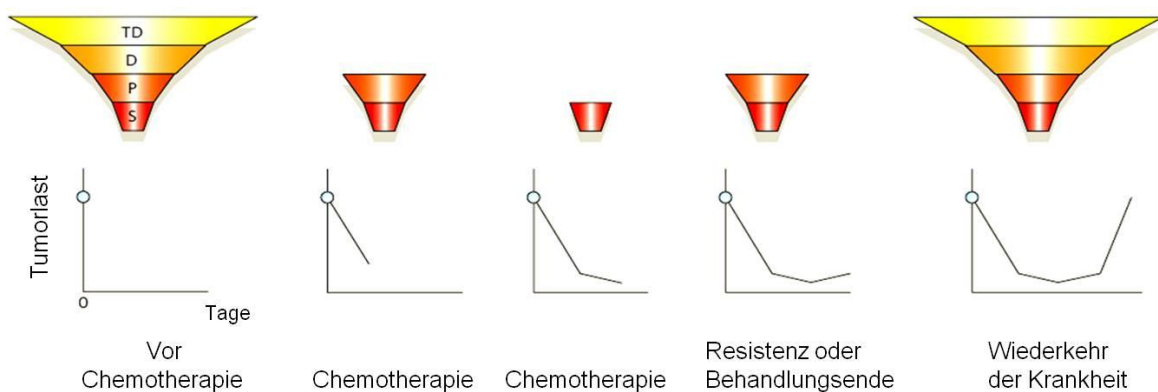
Die CD133<sup>+</sup> Population ist in tumor-initiiierenden Zellen vieler Gewebe angereichert, wie für das Retinoblastom (Miraglia, Godfrey et al. 1997; Maw, Corbeil et al. 2000), das Teratokarzinom (Miraglia, Godfrey et al. 1997), das Nierenzellkarzinom (Bussolati, Bruno et al. 2005), das Prostatakarzinom (Collins, Berry et al. 2005), das hepatozelluläre Karzinom (Yin, Li et al. 2007) das Glioblastom (Singh, Clarke et al. 2003; Singh, Hawkins et al. 2004) und das Kolonkarzinom (O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007) gezeigt werden konnte. Beim Pankreaskarzinom konnte in unseren Vorarbeiten, die den Grundstein für die vorliegende Arbeit legte, CD133 ebenfalls erfolgreich als Marker zur Identifikation und Isolation von Tumorstammzellen sowohl in Primärgewebe als auch in der Tumorzelllinie L3.6pl eingesetzt werden (Hermann, Huber et al. 2007). Es zeigte sich, dass Patientenzellen eine 1 - 3 %ige Subpopulation von Tumorstammzellen enthalten, die hochgradig und exklusiv tumorigen ist. Die orthotope Implantation von lediglich 500 frisch isolierten primären CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellen führte bei einem Großteil der Tiere (80%) zum Tumorwachstum, während bis zu 1 Million CD133<sup>-</sup> Zellen des Primärtumors keinerlei tumorigene Potenz aufwiesen. Dies konnte in seriellen Transplantationen bis zur dritten Generation bestätigt werden. Die aus CD133 positiven Stammzellen entstandenen Tumoren zeigten einen vergleichbaren morphologischen Aufbau wie Tumoren, die aus der gesamten Tumorzellpopulation generiert wurden. Obwohl Tumorstammzellen keine Expression von Zytokeratin als epitheliale Differenzierungsmarker aufweisen, zeigte im Tumor der Großteil der Zellen eine starke Expression von Zytokeratin und somit einen epithelialen Phänotyp.

Pankreatische Tumorstammzellen wurden auch anhand der Oberflächenantigene CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup>, EpCAM identifiziert (Li, Heidt et al. 2007). Da bei beiden Populationen, CD133<sup>+</sup> beziehungsweise CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> Zellen, mehr als eine Zelle implantiert werden musste, zeigen die Experimente, dass die Sub-

populationen stark angereichert an Tumorstammzellen sind, aber nicht ausschließlich aus diesen bestehen. Die eigentlichen Tumorstammzellen dürften sich daher in der Schnittmenge beider Marker befinden. Entsprechend überlappen diese beiden Populationen teilweise, aber nicht vollständig.

### 1.5 Tumorstammzellen und Standard (Chemo) Therapie

Derzeit wird das Ansprechen einer Therapie in erster Linie danach beurteilt, ob es zu einer Verkleinerung des Tumors kommt. Berücksichtigt man aber das Konzept der Tumorstammzellen, wonach theoretisch eine einzige Zelle in der Lage ist, den gesamten Tumor zu generieren (O'Brien, Pollett et al. 2007), muss dieser Endpunkt in Frage gestellt werden. Bei Krebspatienten ist oft zu beobachten, dass trotz guten initialen Therapieansprechens ein Rezidiv auftritt – selbst dann, wenn in den bildgebenden Verfahren kein Tumor mehr erkennbar war. Konventionelle Chemotherapeutika greifen bevorzugt die zahlenmäßig überwiegenden, sich schnell teilenden Zellen an, was das anfängliche Therapieansprechen erklärt, während Tumorstammzellen über eine ausgeprägte Resistenz verfügen. Die eigentliche Wurzel des Tumors, die den Tumor regenerieren kann, bleibt folglich bestehen und ist für ein Rezidiv verantwortlich (Abb. 3).



**Abb. 3 Hierarchische Struktur des Tumors und Therapieresistenz**

*S=(Tumor)Stammzellen, P=Progenitorzellen  
D=differenzierte Zellen, TD=terminal differenzierte Zellen*

*(Huntly und Gilliland 2005)*

Für eine Vielzahl von Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass die konventionelle Chemo- oder Strahlentherapie einen sehr begrenzten bis überhaupt keinen Effekt auf Tumorstammzellen hat (Bao, Wu et al. 2006; Hermann, Huber et al. 2007; Ho, Ng et al. 2007; Ma, Lee et al. 2007). Auch bei primären Pankreastumorzellen hatte eine Behandlung mit dem Standardtherapeutikum Gemcitabin nahezu keinen Einfluss auf die CD133<sup>+</sup> Population, die die tumorigene

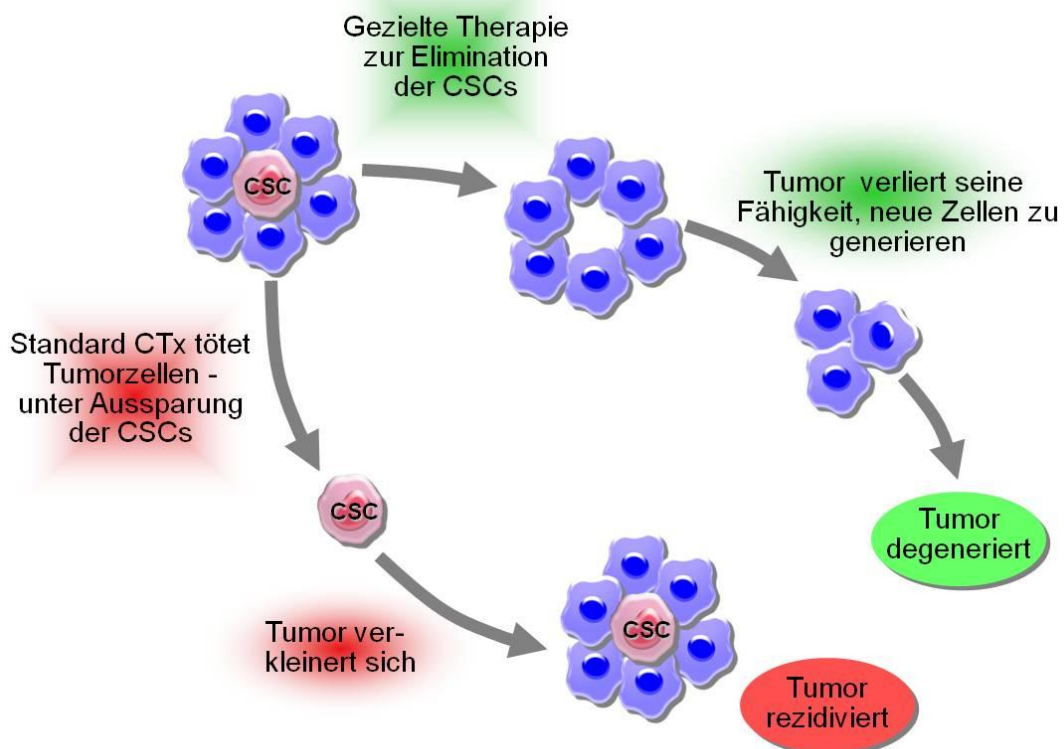
Tumorstammzellfraktion enthält (Hermann, Huber et al. 2007). Die Therapie führte bei Mäusen, die einen orthotop implantierten Tumor trugen, zunächst zu einer Kontrolle des Tumorwachstums, doch in der verbleibenden Tumormasse kam es zu einem Anstieg der CD133<sup>+</sup> Zellen. Dementsprechend wird ein Abbruch der Behandlung zu einem raschen Wiederaufkeimen des Tumorwachstums führen und unter Umständen sogar ein aggressiveres Wachstumsprofil bedingen. Letzteres Szenario wurde für tumorigene Zellen im Gliom nachgewiesen (Bao, Wu et al. 2006): die Strahlentherapie, die in Dosen, die den Großteil aller Zellen eliminierte, appliziert wurde, zeigte keine Wirkung auf die CD133<sup>+</sup> Zellen, sondern steigerte sogar die Aggressivität des Tumors nach serieller Transplantation. Bao et al. konnten zeigen, dass die Resistenz gegenüber der Strahlentherapie über einen DNA Reparaturmechanismus vermittelt wird, der auf die Tumorstammzellen begrenzt ist. Analog hierzu blieben auch CD44<sup>+</sup> Brustkrebsstammzellen von der Strahlentherapie unbeeinflusst (Phillips, McBride et al. 2006). Abgesehen von einer höheren Effektivität in der Reparatur behandlungsinduzierter DNA-Schäden und der Tatsache, dass sich ein Teil der Tumorstammzellen in einer Art Ruhezustand befindet, könnte die Therapieresistenz auch in anderen Eigenschaften ihre Ursache haben: für CD133<sup>+</sup> Glioblastomzellen konnte die Expression anti-apoptischer Proteine gezeigt werden (Liu, Yuan et al. 2006) und für CD133<sup>+</sup> Kolontumorzellen die autokrine Produktion von Interleukin 4. Diese Mechanismen scheinen die Tumorstammzellen vor der Chemotherapie zu schützen (Chemoresistenz) und können beispielsweise im Falle der Kolontumorzellen durch eine Therapie mit IL-4 inhibierenden Antikörpern aufgehoben werden (Todaro, Alea et al. 2007).

Eine weitere Besonderheit von Stammzellen ist die starke Expression spezifischer Transporterproteine, wodurch das Entfernen von Zellgiften, beispielsweise diverser Chemotherapeutika, aus der Zelle ermöglicht wird (Pardal, Clarke et al. 2003). Das bekannteste und am besten charakterisierte Mitglied der ABC Transportproteine ist ABCG2, das unter anderem den fluoreszenten DNA Bindungsfarbstoff Hoechst 33342 aus dem Zellinneren pumpen kann. Dadurch entsteht in durchflusszytometrischen Analysen der charakteristische Phänotyp der sogenannten Side Population, deren Zellen isoliert werden können. Zusammen mit ABCG2 gehören auch die Transporter ABCC1 und ABCB1 zu den sogenannten multi-drug resistance (MDR) Genen, die in Tumorzellen

überexprimiert werden (Doyle, Yang et al. 1998; Pardal, Clarke et al. 2003). Deshalb stellt die Side Population einen neuen Ansatzpunkt zur Erforschung der Chemoresistenz der Tumorstammzellen dar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Medikamente, die nicht zu einer Eliminierung der Tumorstammzellen führen, zunächst zwar eine Verkleinerung des Tumors bewirken, dieser sich aber aufgrund der verbleibenden Tumorstammzellen regenerieren kann. Wenn es gelingt, diese Tumorstammzellen gezielt zu eliminieren oder sie in die Differenzierung zu treiben, um sie einer Chemotherapie zugänglich zu machen, sollte es langfristig zu einer Regression kommen, da dem Tumor die Wurzel entzogen wäre (Abb. 4).

Primäre Endpunkte sollten daher nicht wie bisher allein in einer Verkleinerung des Tumolvolumens bestehen, sondern sollten zumindest um weitere Endpunkte erweitert werden: etwa die progressionsfreie Überlebenszeit, die Zeit bis zum ersten Anzeichen einer Metastasierung oder etwa eine Analyse des verbleibenden Anteils an Tumorstammzellen.



**Abb. 4 Tumorstammzellhypothese**

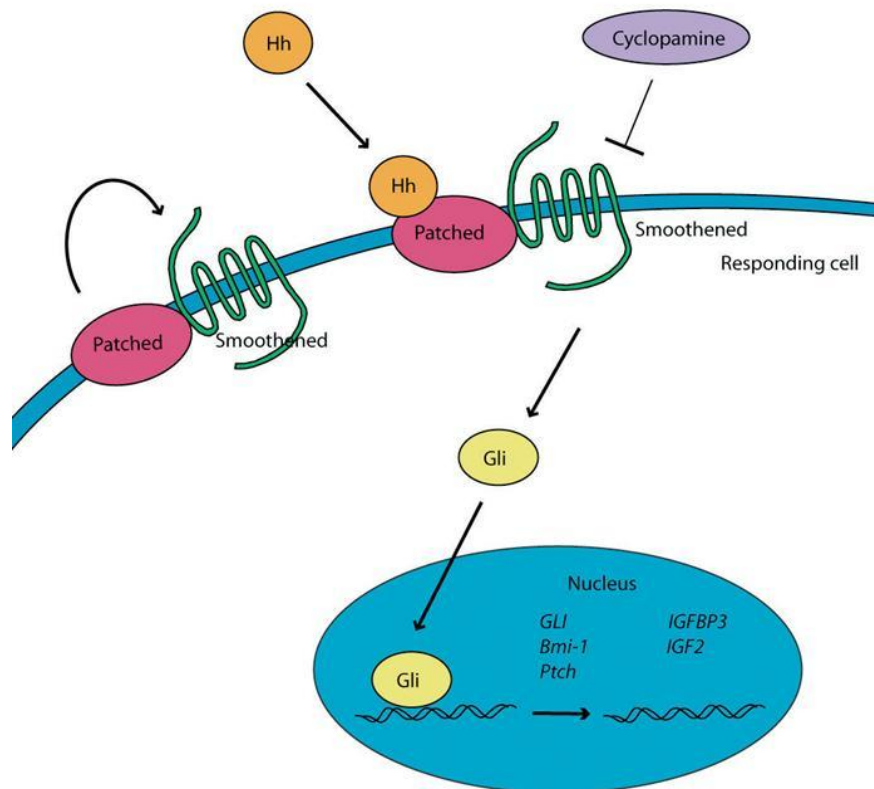
Der therapeutische Angriff auf Tumorstammzellen (CSC) (grün) mag initial wegen der geringen Anzahl wenig eindrucksvoll wirken, verspricht aber langfristig bessere Resultate als die traditionelle Eliminierung „normaler“ Tumorzellen (rot): hier bleibt der Pool regenerierender Tumorstammzellen erhalten und sorgt stets für Nachschub.

Labor Heeschen C.

## 1.6 Für das Pankreaskarzinom relevante Signaltransduktionswege

### 1.6.1 Der Hedgehog Signalweg

Der Hedgehog (Hh) Signalweg ist ein Signaltransduktionsweg, der nach seinem Liganden benannt wurde. In Säugetieren gehören drei Proteine zur Hedgehog Familie: Sonic hedgehog (Shh), Indian (Ihh) und Desert hedgehog (Dhh). Der Sonic hedgehog Signaltransduktionsweg ist am potentesten (Pathi, Pagan-Westphal et al. 2001) und derzeit am besten charakterisiert.



**Abb. 5 Der Hedgehog Signaltransduktionsweg.**

*In der Abwesenheit des Hedgehog Liganden wirkt Patched inhibitorisch auf Smoothened. Durch Bindung von Shh geht die SMO-Inhibition verloren, wodurch die Gli Transkriptionsfaktoren und andere Transkriptionsziele aktiviert werden. Cyclopamin ist ein spezifischer Inhibitor von Smoothened.*

*(Zardawi, O'Toole et al. 2009)*

Bei der Erkennung des Shh-Signals sind die Transmembranproteine Patched (PTC) und Smoothened (Smo) beteiligt (Abb.5). PTC ist ein 12-Transmembranrezeptorprotein, das das Hedgehog Protein binden kann (Marigo, Davey et al. 1996; Stone, Hynes et al. 1996) und als negativer Regulator wirkt, während Smo als positiver Regulator des Hh-Signalweges fungiert. In Abwesenheit von Shh hat



PTC eine inhibitorische Wirkung auf das membranständige Protein Smo. Bei Anwesenheit des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung von PTC, wodurch die SMO-Inhibition verloren geht. In der Folge führt dies zu einer Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren (Gli1, 2 und 3) (Ruiz i Altaba 1999), wodurch wiederum Zielgene transkribiert werden. Während der Embryonalphase ist der Hh-Signalweg maßgeblich an der Spezifizierung des Zellwachstums, sowie der Zelldifferenzierung beteiligt. Er ist aber auch bei einer Reihe von Tumoren konstitutiv aktiviert. Dazu zählen unter anderem das Medulloblastom (Goodrich, Milenkovic et al. 1997; Taylor, Liu et al. 2002; Ellison, Clifford et al. 2003), das kleinzellige Bronchialkarzinom (Watkins, Berman et al. 2003) und das Basalzellkarzinom (BCC) (Fan, Oro et al. 1997; Oro, Higgins et al. 1997; Grachtchouk, Mo et al. 2000; Nilsson, Unden et al. 2000). Bei letzterem stellte sich sogar heraus, dass in beinahe allen Fällen der Hh-Signalweg hyperaktiv ist. Transgene Mäuse, die unter Kontrolle eines Promoters Gli1/Gli2 exprimieren, wiesen eine massive Tumorbildung der Haut auf. Bei der CML konnte in genetischen *loss- and gain-of-function* Experimenten herausgefunden werden, dass die Aktivität des Hh Signalweges Anzahl und Aufrechterhaltung der CML Stammzellen maßgeblich reguliert (Zhao, Chen et al. 2009). Des Weiteren kommt einem aktivierten Shh Signalweg auch im Pankreaskarzinom eine bedeutende Rolle zu (Thayer, di Magliano et al. 2003; Pasca di Magliano, Sekine et al. 2006; Morton, Mongeau et al. 2007). In pankreatischen Tumorstammzellen konnte eine Arbeitsgruppe eine 46fache Anreicherung des Shh Transkripts im Vergleich zu normalen pankreatischen Epithelzellen nachweisen (Li, Heidt et al. 2007).

Der Hedgehog Signalweg kann durch diverse Substanzen inhibiert werden, zu denen Cyclopamin gehört. Diese Substanz wurde entdeckt, nachdem Binns und

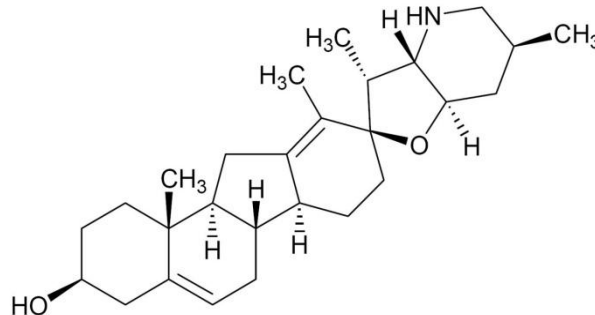


**Abb. 6** *Zyklopeschaf*  
Binns et al.

Mitarbeitern zunächst aufgefallen war, dass im Westen der USA viele Zyklopeschafe (Abb.6), Tiere mit nur einem zentralen Auge, zur Welt kamen (Binns, Thacker et al. 1959). Man stellte fest, dass dies auf den Verzehr der Lilienpflanze *Veratrum californicum* zurückzuführen war, beziehungsweise vielmehr auf ein von dieser Pflanze produziertes steroidales Alkaloid, das deshalb Cyclopamin genannte wurde (Binns, James et al. 1963; Keeler und Binns 1968). Cyclopamin

(Abb.7) greift in den Sonic hedgehog Signaltransduktionsweg ein und blockiert

diesen (Cooper, Porter et al. 1998). In den Embryonen kam es zu einer selektiven Blockade von SMO und dadurch zu einem massiven Mittelliniendefekt, was die einäugigen Nachkommen erklärt.



**Abb. 7** Strukturformel Cyclopamin

PubChem 442972

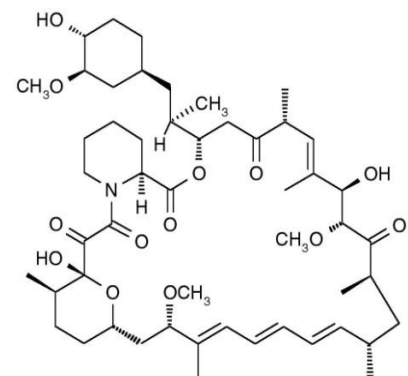
Da der Shh Signalweg in Tumoren konstitutiv aktiviert ist, ist die gezielte Inaktivierung der Shh Signale von hoher Relevanz. Mittlerweile ist eine Vielzahl von SMO-Inhibitoren bekannt, die künstlich synthetisiert werden (u.a. Cur61414, GDC-0449) und teilweise bereits klinisch eingesetzt werden: beispielsweise im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung des BCC (von Hoff 2008; Von Hoff, LoRusso et al. 2009) oder in Einzelfällen bei Therapieversagern (Rudin, Hann et al. 2009). Auch der Small-molecule Inhibitor CUR199691 zählt zu den künstlich synthetisierten SMO Antagonisten, die noch spezifischer an SMO binden und dadurch antagonisieren (Williams, Guicherit et al. 2003).

### 1.6.2 Der mTOR Signalweg

Der PI3-K- (Phosphatidylinositol-3-Kinase-) / Akt / mTOR- (mammalian Target Of Rapamycin-) Signalweg ist ebenfalls bei mehreren Krebsarten fehlreguliert. Krebsauslösende Mutationen werden an Schlüsselstellen dieses Signalweges gefunden und beinhalten sowohl Protoonkogene, als auch Tumorsuppressorgene (Bader, Kang et al. 2005). Durch die Bindung verschiedener Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine an Zellmembranrezeptoren kommt es zur Aktivierung der nachgeschalteten Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), welche über Zwischenschritte mTOR phosphoryliert. Das mTOR-Protein ist ein 289-kDa großes Enzym aus der PIKK-Familie (Phosphoinositid-Kinase assoziierte Kinasen Familie) und fungiert als Serin/Threonin-Kinase (Tee und Blenis 2005). mTOR stellt den Verbund zweier katalytischer Untereinheiten dar: eine Rapamycin-sensitive

Untereinheit (TORC1) und eine nicht-Rapamycin-sensitive Untereinheit (TORC2). Die Rapamycin-insensitive Untereinheit interagiert mit dem Protein Rictor (**R**apamycin **I**nsensitive **C**ompanion of **mTOR**) und ihre Hauptaufgabe scheint die Co-Regulation des Zytoskeletts zu sein. Der Rapamycin-sensitive Komplex interagiert mit dem Protein Raptor (**R**egularly **A**ssociated **P**rotein of **mTOR**). Die beiden am besten charakterisierten Zielproteine, die nach Raptor-Aktivierung phosphoryliert werden, sind die p70 ribosomale S6 Kinase (p70 S6-K) und das an den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E bindende Protein (4E-BP) 1. Die Phosphorylierung der p70s6-Kinase führt wiederum zur Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 und damit zur Translation von Proteinen und Transkriptionsfaktoren. Diese Kaskade molekularer Signale reguliert unter anderem die Zellteilung, die im Krebsgeschehen mit entscheidend ist und so konnte in einer Reihe von Malignomen die Inhibition von mTOR als potenzielles Ziel einer zytostatischen Therapie identifiziert werden (Amornphimoltham, Patel et al. 2005; Lang, Gaumann et al. 2007).

Ein spezifischer Inhibitor des mTOR Signalweges ist Rapamycin (Hay und Sonenberg 2004). Rapamycin (Sirolimus) ist ein Produkt des Bakterienstammes *Streptomyces hygroscopicus*, der im Boden der Osterinsel, die vor Ort Rapa Nui heißt, entdeckt worden war. Nach der erstmaligen Purifizierung der Substanz wurde ihr zunächst eine fungizide Wirkung zugeschrieben (Sehgal, Baker et al. 1975; Vezina, Kudelski et al. 1975) und in weiteren Untersuchungen im Kleintiermodell zeigte sich eine hemmende Wirkung auf Tumorwachstum (Douros und Suffness 1981; Eng, Sehgal et al. 1984). Die anti-tumorale Wirkung konnte bisher vor allem auf die anti-angiogenen Eigenschaften von Rapamycin zurückgeführt werden (Guba, von Breitenbuch et al. 2002; Amornphimoltham, Patel et al. 2008). Die anti-angiogenetische Therapie, die sich gegen die Gefäßneubildung im wachsenden Tumor richtet, ist in der Onkologie ein zunehmend etablierter Therapieansatz (Jain 2001; Lin und Sessa 2004), da die Produktion eines ausreichenden Gefäßnetzwerks ein entscheidender Schritt sowohl für das Tumorwachstum als auch für den Prozess der Tumorstreuung ist. Rapamycin und seine Analoga CCL-



**Abb. 8** Strukturformel  
Rapamycin  
PubChem 5284616

779 (Temsirolimus), RAD001 (Everolimus) und AP23573 werden bereits in klinischen Studien bei fortgeschrittenen Tumorleiden als Mono- und als Kombinationstherapie untersucht (Chan, Scheulen et al. 2005; Chang, Wen et al. 2005). Anti-angiogenetische Substanzen wie Rapamycin könnten gerade auch auf die Tumorstammzellnische großen Einfluss haben. In Hirntumoren konnte gezeigt werden, dass Tumor-stammzellen bevorzugt in der Nähe des Tumor-Gefäßsystems zu finden sind (Calabrese, Poppleton et al. 2007). Infolgedessen führte eine anti-angiogenetische Therapie mit Bevacizumab, einem monoklonalen Antikörper, der sich gegen den Angiogenesefaktor VEGF richtet, zu einer beinahe ausschließlichen Eliminierung des Tumorstammzellpools, während die Hauptmasse des Tumors durch die Therapie kaum beeinflusst wurde. Da bei einem Großteil der Patienten mit Pankreastumoren der mTOR Signalweg überaktiviert ist (Asano, Yao et al. 2004), könnte eine mTOR Inhibition zum einen direkt der hemmungslosen Vermehrung der Krebszellen entgegenwirken und zum anderen über eine gezielte Attackierung der perivaskulären Nische (und damit der tumorigenen Zellen) eine Behandlungs-option darstellen. Aufgrund der bereits erfolgten klinischen Erprobung der antiangiogenen Wirkstoffe ist diese Therapie für die Pankreaskarzinompatienten bereits verfügbar.

## 1.7 Fragestellung

Die Entdeckung der Tumorstammzellen bedeutet ein völlig neues Verständnis der Entstehung von Tumoren und deren Biologie. Interessanterweise stellen sie außerdem eine völlig neue therapeutische Zielstruktur dar. Sei es eine direkte Elimination oder die Möglichkeit, sie über die Differenzierung in die Seneszenz und konsekutiv in den Zelltod zu treiben: gelingt es, die in einem Tumor vorhandenen Tumorstammzellen vollständig zu eliminieren, so sollte dem Tumor langfristig die Wurzel entzogen sein. Für das extrem therapieresistente und letale Pankreaskarzinom bedeutet dies somit zum ersten Mal seit der Einführung von Gemcitabin einen neuen therapeutischen Hoffnungsschimmer.



**Abb. 9 Tumorstammzellen  
Wurzel allen Übels?**

*Labor Heeschen C.*

Gestützt auf die Existenz von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom und die postulierte Aktivierung Stammzell-assoziiierter Signalkaskaden in Tumorstammzellen, formulierten wir folgende Fragestellungen:

1. Kann durch eine alleinige Inhibition der Sonic hedgehog beziehungsweise der mTOR Signalkaskade der Tumorstammzellpool signifikant vermindert werden?
2. Kann eine Kombination mit dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabin die Effekte auf die Tumorstammzellen potenzieren?
3. Führt die jeweilige Behandlung der Tumorzellen zu einem tatsächlichen Verlust der Tumorigenität in *in vivo* Transplantationsversuchen?
4. Führt die Elimination der Tumorstammzellen zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit bei Mäusen mit etablierten Pankreastumoren?
5. Sind die durch Zelllinien gewonnen Ergebnisse auf Primärzellen übertragbar?

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Kulturbedingungen und Tumorzelllinien

#### 2.1.1 Zellkultur

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Einfriermedium setzte sich aus 90% FCS (fetal cow serum) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) zusammen, das durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen verhindert, die die Zellen beim Einfrieren schädigen könnten. Aliquots von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 1ml wurden in sterilen Einfrierröhrchen bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt. Die Zellen wurden in  $\text{CO}_2$  Inkubatoren bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Um eine Kontamination durch Bakterien und Pilze zu minimieren, wurden alle Zellkulturarbeiten an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Zellen höchstens 6-8 Wochen in Kultur gehalten. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe der Farbstoffe Trypanblau beziehungsweise Türk`scher Lösung (beide Sigma). Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der der Bestimmung der Lebendzellzahl dient. Tote Zellen nehmen den Farbstoff sofort auf, so dass sich das Zytoplasma blau färbt, während die Zellmembran vitaler Zellen zunächst nicht durchlässig ist. Türk`sche Lösung hingegen färbt alle Zellkerne blau, was eine Unterscheidung kernhaltiger Zellen (z.B. Tumorzellen, Leukozyten) von kernlosen Zellen (z.B. Erythrozyten) erlaubt. Die Auszählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Adhärente Monolayer-Kulturen wurden in Plastikflaschen (Nunc) gehalten. Die Zelllinien wurden in DMEM Medium (Invitrogen) mit folgenden Zusätzen kultiviert: FCS (Biochrom), Glutamax (Invitrogen), Sodium Pyruvat, nichtessentielle Aminosäuren, Penicillin, Streptomycin (alle: PAN).

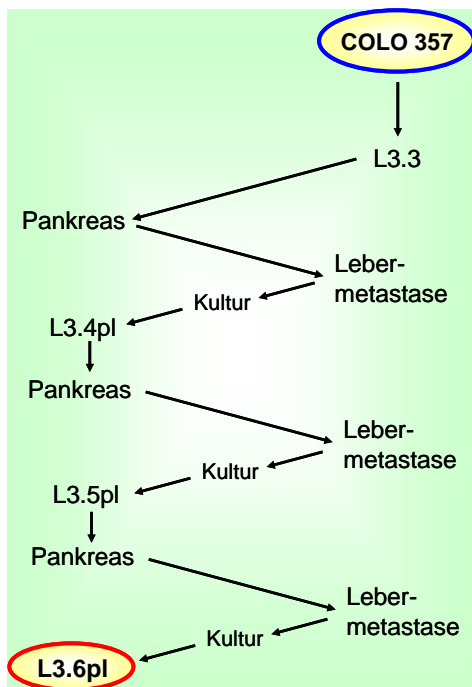
#### 2.1.2 Sphärenbildung

Um die Tumorstammzellfraktion der gesamten Population zu vermehren, wurden Kulturbedingungen gewählt, die die Proliferation undifferenzierter Zellen begünstigen. Um die Adhäsion und die resultierende Differenzierung der Tumorstammzellen zu vermeiden, wurden die Zellen in sogenannten ultra-low adhesion plates kultiviert (Corning). Das Medium bestand aus DMEM-F12 (Invitrogen), versetzt mit 2% eines 50X B27 Konzentrates (Gibco) und 10 ng/ml

FGF-2 (Peprotech EC). Die Zellen wurden nach der jeweiligen Behandlung in 6-well Platten in einer Konzentration von 10.000 Zellen pro ml ausgesät. Unter diesen Kulturbedingungen bilden pankreatische Tumorstammzellen (beispielsweise vergleichbar mit normalen neuralen Stammzellen) dreidimensionale, frei schwimmende Zellaggregate, die Sphären (spheres) genannt werden. Zur Quantifizierung wurden standardisiert vier Gesichtsfelder von mindestens drei wells von zwei Personen unabhängig voneinander ausgezählt. Für jede Gruppe wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

### 2.1.3 Humane Pankreaskarzinomzelllinien

Wir verwendeten die hochmetastatische Zelllinie L3.6pl, die durch fortlaufende *in vivo* Selektionszyklen in Nacktmäusen entstand



**Abb. 10** Entstehung der Zelllinie L3.6pl. Durch Injektions-Selektionszyklen wird aus der ursprünglichen COLO 357 Zelllinie die hoch-metastatische Zelllinie L3.6pl.

(Bruns, Harbison et al. 1999). Die ursprüngliche humane Pankreaskarzinomzelllinie COLO 357, die aus einer abdominalen Lymphknotenmetastase eines differenzierten, mucinhaltigen Pankreaskarzinoms etabliert wurde, wurde in die Milz von Nacktmäusen injiziert, um Zellen aus Lebermetastasen (L3.3 Linie) zu isolieren. Anschließend wurden die L3.3 Zellen orthotop in das Pankreas von athymischen Mäusen implantiert, Lebermetastasen isoliert, und als L3.4pl (**p**ancreas-**l**iver) bezeichnet. Nach zwei weiteren orthotopen Injektions-Selektionszyklen wurden die L3.6pl Zellen isoliert, die mit einer deutlich höheren Inzidenz zu Lebermetastasen führten als die ursprünglichen COLO 357 Zellen. Die für diese Arbeit ebenfalls verwendete

Zelllinie AsPC-1 entstand durch Xeno-Transplantation von Tumorzellen in das Pankreas von Nacktmäusen. Ursprünglich wurden die Zellen aus der Aszitesflüssigkeit einer 62 jährigen Patientin isoliert, die an einem Pankreasadenokarzinom erkrankt war (Chen, Horoszewicz et al. 1982; Tan und Chu 1985).

## **2.2 Verarbeitung von primärem humanen Pankreaskarzinomgewebe**

Die humanen Pankreastumoren wurden vom Ort der Entnahme (OP-Saal) über die Pathologie steril und auf Eis (4°C) ins Labor transportiert. Alle Patienten wurden im Rahmen der Vorgaben der HTCR (Human Tissue Cancer Research) Stiftung aufgeklärt; das schriftliche Einverständnis wurde gegeben. Das Gewebe wurde immer sofort auf folgende Weise verarbeitet: zunächst wurde der Tumor mit zwei Skalpellens in Stücke von höchstens 2-3mm<sup>3</sup> geschnitten. Die Tumorfragmente wurden in ein steriles 50 ml Falcon mit einem 1:1 Gemisch (DMEM pur : FCS) überführt und mithilfe des Geräts Dispomix (Firma MediTools) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat in einem 1:1 Gemisch (DMEM pur : Collagenase 0,25%; Stem Cell Technologies) unter konstanter Intervallumdrehung in einem Rotator 90 Minuten lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> enzymatisch verdaut. Danach wurde die Zellsuspension durch Zellsiebe mit einer Porengröße von 100 µm filtriert, gewaschen und anschließend sieben Minuten bei 1200 g und 4°C zentrifugiert. Dann wurden die Zellen mit Türk'scher Lösung gezählt und für die *in vitro* Therapieversuche in gleicher Anzahl in 6-well-plates ausgesät. Um einer möglichen Kontamination entgegenzuwirken, wurde zusätzlich 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B zugegeben.

## **2.3 Analyse von Zellen mittels Antikörpern und Farbstoffen**

### *2.3.1 Durchflusszytometrie und Antikörper*

Um die Expression bestimmter Zelloberflächenmoleküle auf den Pankreastumorzellen bestimmen zu können, kam die Durchflusszytometrie zum Einsatz. Dies ist ein Immunfluoreszenzverfahren, bei dem nach entsprechender Färbung die Einzelzellen mittels eines polarisierten Lichtstrahls detektiert werden können. Es wurden ausschließlich monoklonale Antikörper verwendet, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren: Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin (PE) oder Fluoreszein Isothiozyanat (FITC). In der vorliegenden Studie wurden zur Charakterisierung der Zellen folgende Antikörper verwendet: anti-CD133/1-APC oder anti-CD133/1-PE (Klon AC133) (beide: Miltenyi); anti-CD24-FITC oder anti-CD44-PE (beide: ebiosciences); anti-EpCAM-APC (=CD326) (Becton Dickinson); anti-CXCR4-PE (R&D systems); anti-ESA-APC (biomeda). Als Negativkontrolle wurden entsprechend konjugierte Isotyp-



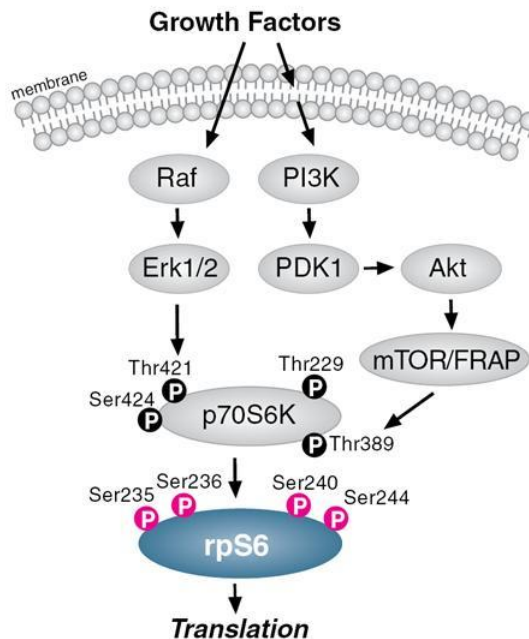
kontrollantikörper eingesetzt. Die Proben wurden an einem FACSCalibur (Becton Dickinson) analysiert und die Daten mittels CELLQuest Pro Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

### *2.3.2 Side Population*

Die Färbung der Side Population (SP) erfolgte nach dem Protokoll, das von Goodell und Mitarbeitern etabliert worden war (Goodell, Brose et al. 1996). Die Zellen werden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (Sigma), einem bis-Benzimid gefärbt, der als Vitalfarbstoff an DNA bindet und so detektiert werden kann. Pro ml werden  $10^6$  Zellen der zu untersuchenden Zelllinie in vorgewärmtem SP Medium (=DMEM + 2% FCS + 10mM HEPES Puffer) resuspendiert. Die gewünschte Endkonzentration von Hoechst 33342 ist 5 µg/ml. Parallel hierzu muss immer ein Probenröhrchen vorbereitet werden, das vor Zugabe des Farbstoffes zusätzlich Verapamil in einer Konzentration von 50µM erhält. Verapamil dient als Negativkontrolle, das als Kalziumkanalblocker das Ausschleusen von Hoechst 33342 aus der Zelle blockiert. Alle Röhrchen sollten mit Aluminiumfolie oder dunklem Klebeband bedeckt sein, da der Hoechst-Farbstoff sehr lichtempfindlich ist. Anschließend folgt eine Inkubationszeit von genau 90 Minuten im 37°C warmen Wasserbad, in der die Reaktionsgefäße alle 20 min geschüttelt werden. Danach werden die Zellen zentrifugiert, in kaltem SP Medium resuspendiert und direkt an einem FACSAria (BD Biosciences) analysiert. Aufgrund der Eigenschaft, den DNA-Bindefarbstoff schneller aus dem Zytoplasma zu pumpen als andere Zelltypen, können die Stammzellen als Side population in einem Dotplot erkannt werden. Sie liegen dann links unterhalb der Hauptpopulation.

### *2.3.3 Bestimmung der mTOR Aktivität*

Um die Aktivität des mTOR Signalweges und den Einfluss der Rapamycin-Behandlung auf die Phosphorylierung der mTOR nachgeschalteten Kinasen zu untersuchen, wurde eine Immunfärbung eines mTOR „downstream target“ durchgeführt. Untersucht wurde spezifisch die von der p70s6 Kinase phosphorylierte Form des ribosomalen Proteins S6 (rPS6) an der Aminosäure Serin 235/236. So kann die aktive Form der p70s6 Kinase und damit die Aktivität des PI3K/Akt/mTOR Signalweges detektiert werden.



**Abb. 11** Signalkaskade, die in Abhängigkeit der p70s6 Kinase zur Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins führt

Um den Versuch durchzuführen, wurden die L3.6pl Zellen in Chamber Slides auf Objektträgern in Standardmedium kultiviert und entweder mit der Trägersubstanz oder mit Rapamycin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Aceton (-20°C) fixiert. Um spezifische Antikörperbindung sicherzustellen, wurde mit 1%BSA-PBS geblockt und zusätzlich ein Avidin-Biotin-Block durchgeführt. Der Primärantikörper (Kaninchen), der an die phosphorylierte Form des S6 ribosomalen Proteins (Ser235/236) bindet (Cell Signaling Technology) inkubierte über Nacht. Dann erfolgte die Inkubation mit einem Ziege-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (BD), der mit Biotin markiert war und an den ersten Antikörper binden kann. Als drittes Reagenz ermöglichte der APC-konjugierte Streptavidin-Komplex (BD) durch die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers letztendlich die Visualisierung des phosphorylierten S6 ribosomalen Proteins. Die Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden. Die Zellkerne wurden mit Sytox (Invitrogen) gefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen mit CD133-PE (Miltenyi) gefärbt, um die Aktivität des mTOR Signalweges speziell in CD133<sup>+</sup> Zellen untersuchen zu können. Die Analyse der Zellen erfolgte an einem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 5).

## **2.4 Migrationsassay**

Für den Migrationsassay wurden  $5 \times 10^5$  Tumorzellen in 250  $\mu$ l DMEM versetzt mit 5% FCS resuspendiert und im oberen Teil einer modifizierten Boyden chamber (mit Matrigelbeschichtung) (BioCoat invasion assay, 8mm Porengröße, Becton Dickinson Labware) aufgebracht. Die obere Kammer wurde in eine 24-well Kulturschale platziert, die mit 500 ml des Standardmediums gefüllt war und zusätzlich 100 ng/ml SDF-1 (PeproTech EC) enthielt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wurden die transmigrierten Zellen mithilfe einer Neubauerkammer gezählt.

## **2.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Um die Genexpression und die Beeinflussung des Hedgehog-Signalweges beurteilen zu können, wurde eine Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion des Hh Zielgens Gli1 durchgeführt. Zur Initiation der DNA Synthese wurde ein Oligo(dT) Primer verwendet, also mehrere Thymin-Basen, welche komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind. Dann wurde die RNA mittels des folgenden Gli1-spezifischen Primers in DNA umgeschrieben: FSequence CTTTCATCAACTCGCGATGC; RSequence: GTCATGGTGCCAATGGAG (Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland). Die semi-quantitative Polymerase-Kettenreaktion des humanen Gens Gli1 (40 Zyklen) erfolgte mithilfe eines light cyclers (Roche). Als Housekeeping-Gen diente GAPDH (25 Zyklen).

## **2.6 Orthotopes Pankreaskarzinom-Modell**

Die verwendeten weiblichen, immunkompromittierten Nacktmäuse (NMRI/nunu) wurden von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen (gemäß Tierversuchsantragsnummer 16-07) und unter speziellen apathogenen Bedingungen unter laminarem Luftstrom gemäß den Vorschriften der Regierung von Oberbayern im Walter-Brendel-Zentrum, München, gehalten. Gemäß den Richtlinien des Institutes wurden die Mäuse im Alter von 8-12 Wochen verwendet. Um das Heranwachsen humaner Pankreaskarzinome zu induzieren, wurden Einzelzellsuspensionen der L3.6pl Zelllinie mit einer Viabilität >90% orthotop in das Pankreas injiziert (Bruns, Harbison et al. 1999). Der auf der rechten Seite liegenden Maus wurde der Oberbauch mit Cutasept desinfiziert. Anschließend wurde am linken Oberbauch unmittelbar unterhalb des Rippenbogens im Bereich der Milz, die durch die Haut schimmert, ein 1mm langer Hautschnitt gesetzt und

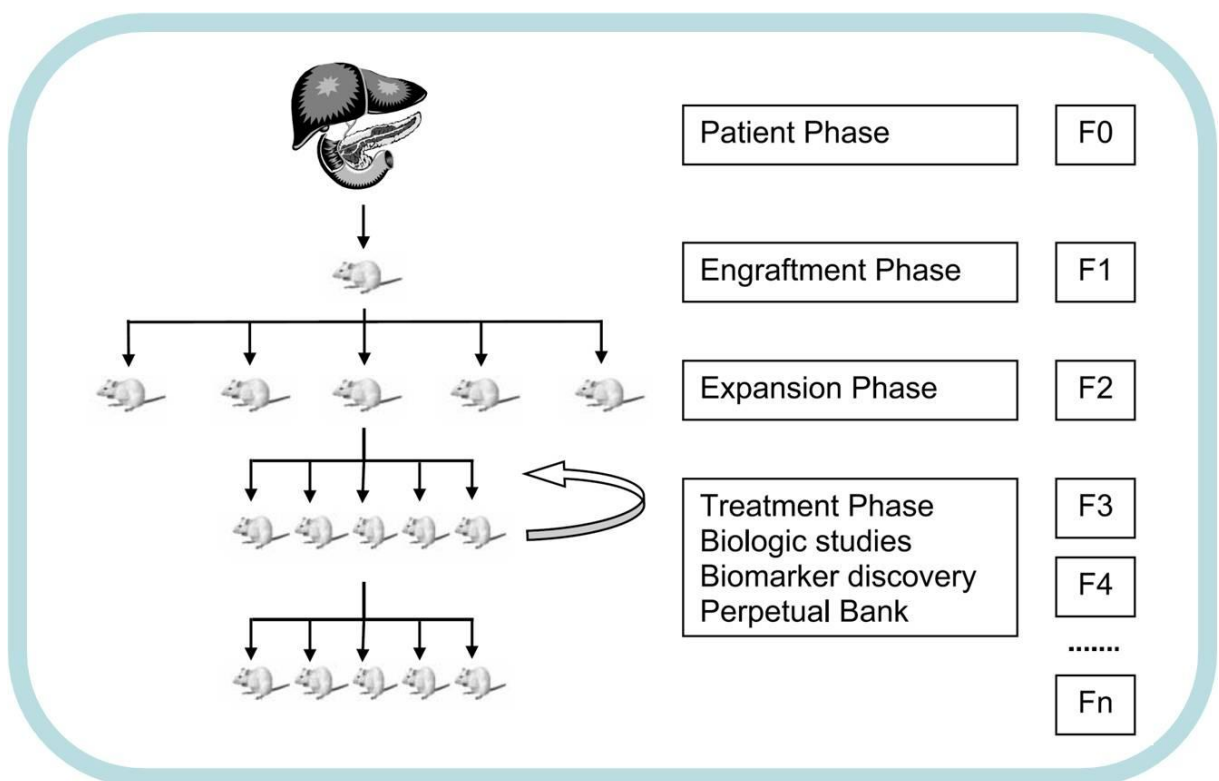
durch Spreizen der Schere auf 0,5cm erweitert. Das Peritoneum wurde in gleicher Weise eröffnet. Pankreas und Milz wurden jetzt vorsichtig mit der Pinzette nach außen mobilisiert und mittels Stieltupfer und Pinzette über dem eröffneten Bauch ausgebreitet, um die nachfolgende Injektion zu erleichtern. Die vorsichtig invertierte Tumorzellsuspension im Injektor wurde unter Sichtkontrolle intrapankreatisch implantiert. Um einen Zellsuspensionsausfluss und damit eine Kontamination der Bauchhöhle zu verhindern, wurde die Einstichstelle circa 30 Sekunden mit einem Stieltupfer unter leichtem Druck verschlossen. Das Pankreas wurde ohne Druck reponiert und das Peritoneum mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Haut wurde abschließend mittels zweier Clips adaptiert. In einigen Experimenten wurden die Tiere im weiteren Verlauf in Gruppen randomisiert und den einzelnen Therapie- bzw. der Kontrollgruppe(n) zugeordnet. Der Tag der operativen Tumordinjektion wird im Folgenden als Tag 0 des jeweiligen Experiments geführt.

Am Ende des Versuchs wurde das normale Pankreasgewebe und die Pankreas-tumoren einschließlich der Milz zur histologischen Analyse in 4% Formaldehyd fixiert, nach 24 Stunden eine Stunde lang in fließendem Leitungswasser gewaschen und in Paraffin eingebettet. Die histologische Färbung erfolgte mit Zytokeratin 5, 6, 8, 17, 19 (Dako) und Hämalaun (Sigma).

## **2.7 *In vivo* Expansion von Primärgewebe**

Die Versuche zur *in vivo* Expansion von Primärgewebe wurden am Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) in Madrid durchgeführt. Hierfür wurde ein subkutanes Xenograft-Modell verwendet, das von Manuel Hidalgo für das Pankreaskarzinom etabliert worden war und das eine hervorragende *in vivo* Plattform für translationale Medikamentenstudien darstellt (Rubio-Viqueira, Jimeno et al. 2006): nicht-nekrotisches Pankreastumorgewebe der Whipple Operation, das nicht für klinische Untersuchungszwecke benötigt wird, wird zu diesem Zwecke in Kombination mit Matrigel in weibliche Nacktmäuse implantiert. An beiden Flanken wird eine subkutane Tasche geschaffen, in die jeweils ein 2-3 mm<sup>3</sup> großes humanes Tumorstück eingepflanzt wird. Die Tumoren werden ab einer Größe von 1500mm<sup>3</sup> weiterverarbeitet. Von dieser sogenannten F1 Generation an kann der Zyklus wiederholt werden, wodurch F2 und F3 Generationen entstehen. Auf diese Weise kann der ursprünglich sehr kleine

Primärtumor erfolgreich expandiert werden und es entstehen größere Kohorten an Mäusen, an denen Medikamentenstudien durchgeführt werden können.



**Abb. 12 In vivo Expansion von Primärgewebe**

Das Primärgewebe von Pankreastumoren wird zum Zeitpunkt der Whipple Operation erhalten und in einer Kohorte Nacktmäuse wie beschrieben expandiert.

(Rubio-Viqueira, Jimeno et al. 2006)

## 2.8 In vitro Behandlung pankreatischer Tumorzelllinien

Pankreatische Tumorzellen wurden bis zu 96 Stunden mit folgenden Substanzen behandelt (Mono- oder Kombinationstherapie): Gemcitabin 100ng/ml: max. 24h (Lilly), Cyclopamin 10 $\mu$ M (Biomol) oder Rapamycin 100ng/ml (Wyeth). Um die *in vivo* Tumorigenität beurteilen zu können, wurden 10<sup>6</sup> L3.6pl Zellen mit den jeweiligen Substanzen vorbehandelt und orthotop ins Pankreas von Nacktmäusen implantiert. Die Auswertung erfolgte an Tag 35. Für den Systemic infusion Versuch wurden die Zellen mit dem Qtracker 800 labeling kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben markiert. 5x10<sup>5</sup> L3.6pl Zellen wurden intravenös injiziert und 4 Wochen später wurden die explantierten Lungen mit einer near-infrared imaging platform (Odyssey, Licor, Lincoln, Nebraska) nach Metastasen durchsucht. Positive Signale wurden histologisch mittels H&E Färbung verifiziert.

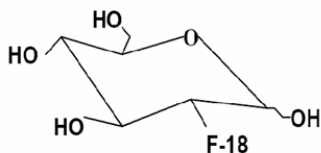
## 2.9 *In vivo* Behandlung bereits bestehender Pankreaskarzinome

Gemcitabin wurde zweimal wöchentlich (Dienstag + Freitag) in einer Konzentration von 125mg/kg intraperitoneal verabreicht. 25mg/kg Cyclopamin wurde zweimal täglich über eine Magensonde gegeben (Feldmann, Dhara et al. 2007). Rapamycin wurde den Tieren über das Trinkwasser zugeführt: 5mg/kg/d (Huber, Bruns et al. 2007).

## 2.10 Bildgebung

### 2.10.1 Positronen-Emissions-Tomographie

Die PET-Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit der nuklearmedizinischen



**Abb. 13** Strukturformel 18F-Fluorodesoxyglucose

Abteilung des Klinikums Großhadern. 20 MBq 18F-Fluorodesoxyglucose (TU München) wurde den Mäusen in einem Volumen von 0,2ml über die Schwanzvene appliziert. Nach einer Aufnahmezeit von 60 Minuten wurden die Bilder über eine Zeitspanne von 20 Minuten aufgenommen.

Gearbeitet wurde an einem Siemens Inveon P 120 Kleintier-PET (Erlangen, Deutschland).



**Abb. 14** Siemens Inveon P 120 Kleintier-PET

### *2.10.2 Magnetresonanztomographie*

Die MRT-Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit der radiologischen Abteilung des Klinikums Großhadern durchgeführt. Die Mäuse wurden in narkotisiertem Zustand an einem 3-Tesla MRI Gerät (Magnetom Tim Trio, Siemens, Erlangen) mithilfe einer Mäusespule analysiert.



**Abb. 15** 3-Tesla MRI - Magnetom Tim Trio

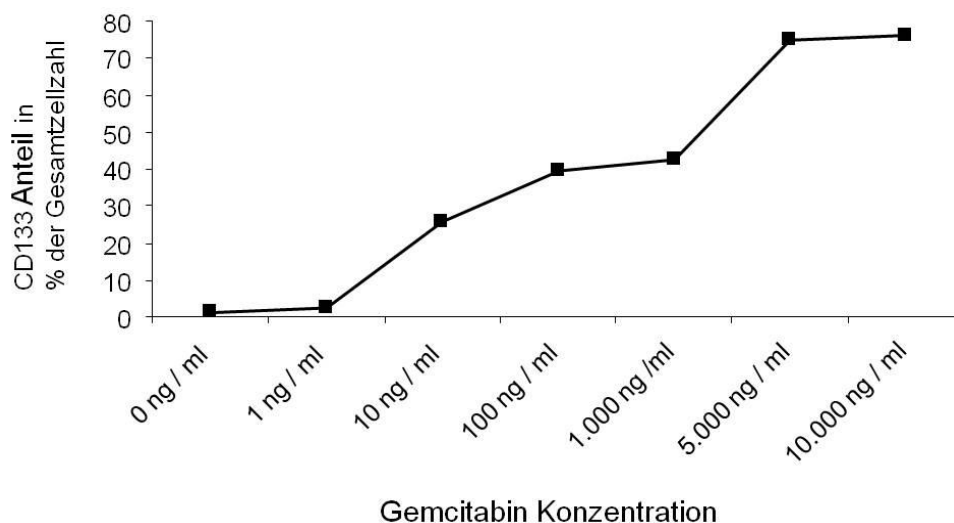
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 *In vitro* Effekte nach Shh und mTOR Signalweg Blockade

##### 3.1.1 Behandlungseffekte auf CD133<sup>+</sup> L3.6pl Zellen

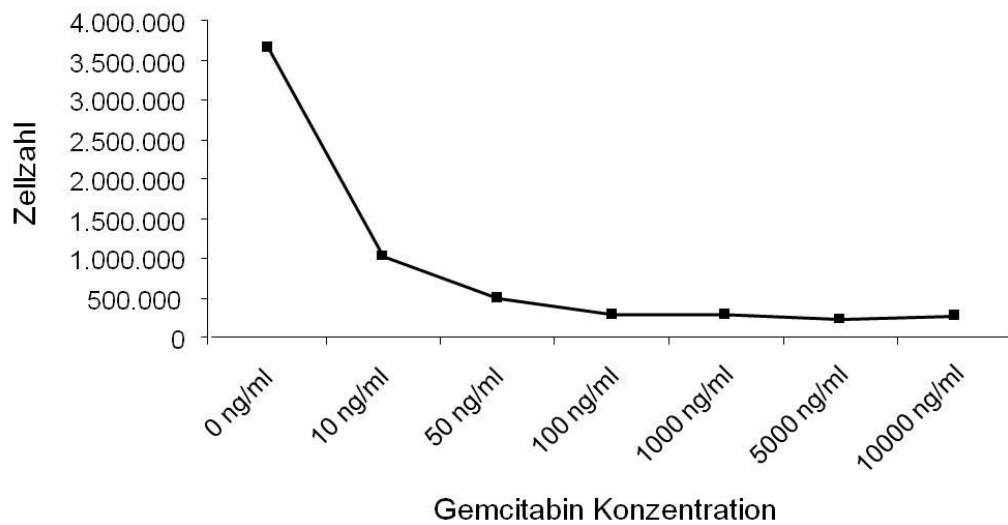
Zunächst interessierte uns der Effekt auf die CD133<sup>+</sup> Pankreastumorstammzellen nach Shh und mTOR Blockade sowie nach Behandlung mit dem Standardtherapeutikum Gemcitabin. Wir behandelten die Zelllinie L3.6pl 48 Stunden lang mit der jeweiligen Substanz und analysierten sie anschließend mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie. Unter Berücksichtigung der Effektivität auf den CD133<sup>+</sup> Anteil der L3.6pl Zellen und der Vitalität der Gesamtzellpopulation entschieden wir uns für alle nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen bei Gemcitabin für die Konzentration 100ng/ml. Wie auch in früheren Projekten führte die Gemcitabin Monotherapie nicht zu einer Eliminierung der CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellen, sondern vielmehr zu deren relativen Anreicherung, was zeigt, dass aktuelle Standardtherapeutika primär auf die differenzierteren und schnell proliferierenden Tumorzellen wirken (Hermann, Huber et al. 2007).

a)





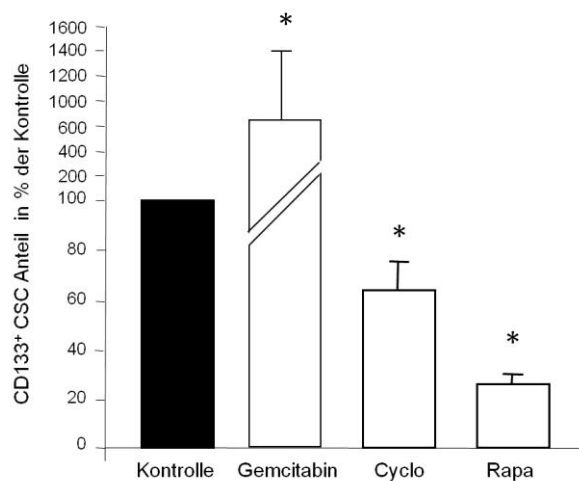
b)



**Abb. 16 Dosisfindung Gemcitabin**

- a) CD 133<sup>+</sup> Anteil in Abhängigkeit der Gemcitabin Konzentration.
- b) Vitalität der Gesamtzellpopulation in Abhängigkeit der Gemcitabin Konzentration.

Nach Monotherapie sowohl mit dem Shh Inhibitor Cyclopamin als auch mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin konnten wir eine signifikante, wenngleich moderate Verminderung der CD133<sup>+</sup> Population feststellen.



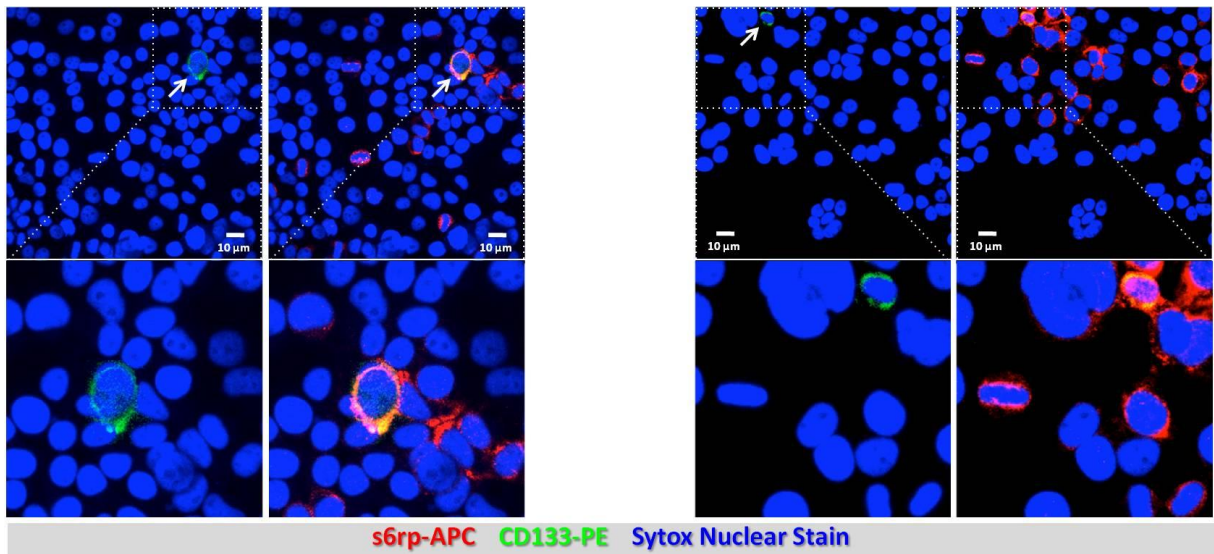
**Abb. 17 CD133 Anteil nach Blockade des Shh und des mTOR Signalweges**

### 3.1.2 *Inhibition der Aktivität des mTOR und Shh Signalweges*

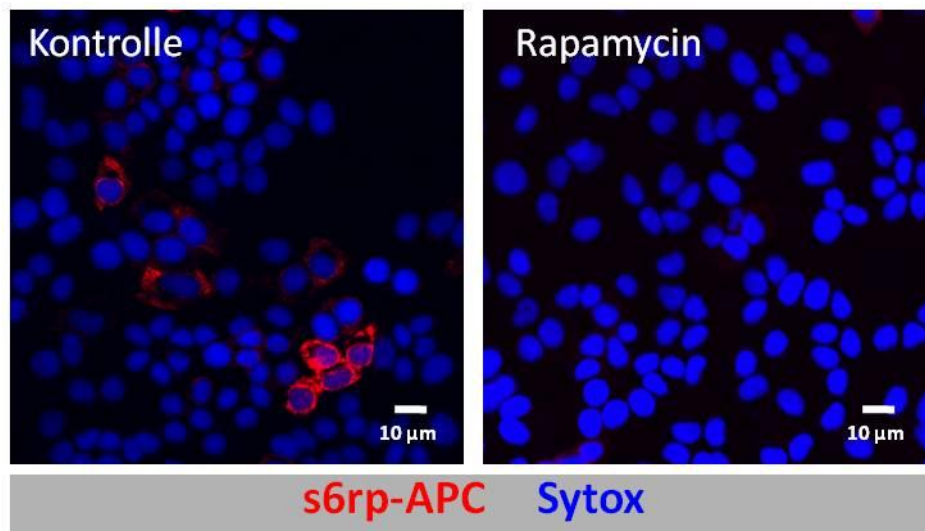
Um herauszufinden ob der mTOR Signalweg tatsächlich in der Subpopulation der Tumorstammzellen aktiv ist, wurden histologische Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Aktivität der p70s6-Kinase detektiert wurde. Für die p70s6-Kinase konnte bereits gezeigt werden, dass sie ein aussagekräftiger Marker für die Aktivität des mTOR Signalweges ist (Aoki, Blazek et al. 2001). Die p70s6-Kinase ist eines der beiden am besten charakterisierten Zielproteine, die downstream der mTOR Signalkaskade sind. Gefärbt wurde der phosphorylierte Status des s6 ribosomalen Proteins (s. Methodenteil). Dies zeigte, dass der mTOR Signalweg nur in einem kleinen Teil der Zellen aktiv war, unter anderem aber in Übereinstimmung mit unserer Hypothese in der CD133<sup>+</sup> Population.

Nach Rapamycin Behandlung war der Anteil des phosphorylierten s6 ribosomalen Proteins deutlich reduziert, so dass von einer erfolgreichen Inaktivierung der mTOR Funktion ausgegangen werden kann.

a)



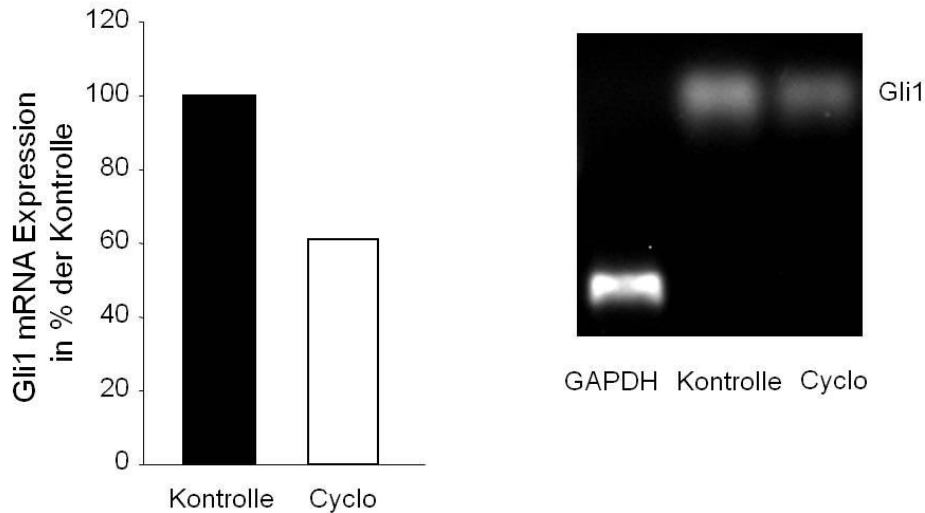
b)



### Abb. 18 Immunhistochemie

- a) Über eine Färbung der phosphorylierten Form des s6 ribosomalen Proteins wird die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase /Akt / mTOR Signalweges in Pankreastumor(stamm)zellen gezeigt.
- b) Dargestellt sind Bilder von unbehandelten Zellen (=Kontrolle) und von mit Rapamycin behandelten Zellen.

Die Blockade des Hh Signalweges überprüften wir mithilfe der PCR Analyse des Zielgenes Gli1. Nach Cyclopamin-Behandlung der Zellen war eine Herunterregulierung von Gli1 um 40% zu sehen.

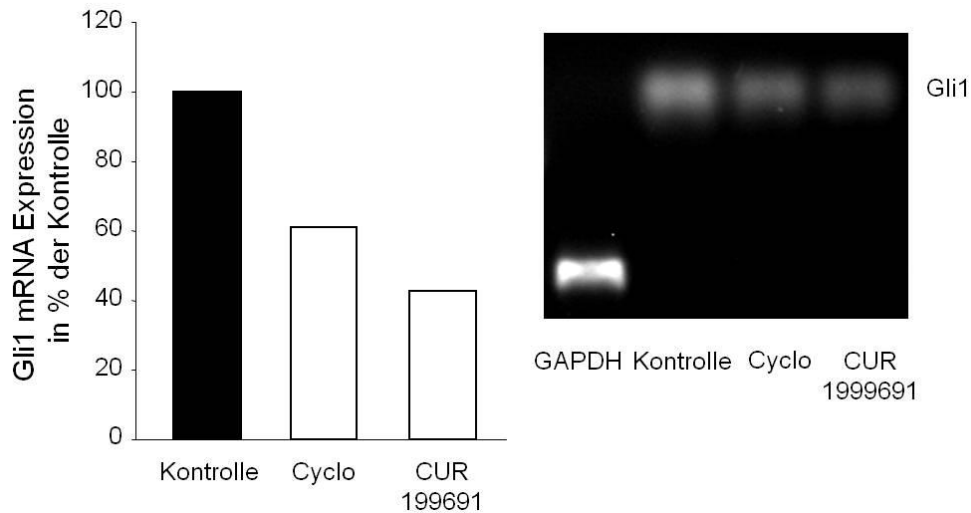


#### **Abb. 19 Shh Inhibition**

*Die PCR zeigt eine Inhibition des Downstream-Shh-Targets Gli1 durch Cyclopamin*

Diese Daten stimmen mit denen einer anderen Arbeitsgruppe überein, die nach Cyclopamin Behandlung eine Reduktion von Aldehyddehydrogenase-positiven Zellen auf etwa 1/3 gezeigt hatte (Feldmann, Dhara et al. 2007). Die Aldehyddehydrogenase wird ebenfalls als Tumorstammzellmarker verwendet, da Zellen mit Stammzeleigenschaften eine hohe Aktivität dieses Enzyms vorweisen.

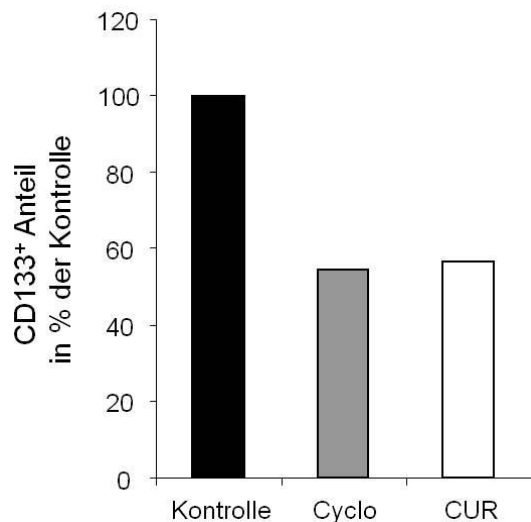
Gleichzeitig stellte sich die Frage, ob ein stärkerer und spezifischer Shh-Inhibitor allein ausreichen würde, die CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellpopulation zu eliminieren. Deshalb testeten wir zusätzlich den Small molecule inhibitor CUR199691, der uns von der Firma Genentech zur Verfügung gestellt wurde. Dass CUR199691 tatsächlich ein potenterer Inhibitor des Hh Signalweges ist, sahen wir in der PCR des Zielgenes Gli1, die nach identischer Dosierung und Behandlungsdauer wie Cyclopamin durchgeführt wurde. Während Cyclopamin zu einer Herunterregulierung von Gli1 um 40% führte, konnte mit CUR199691 eine Reduktion um 60% erreicht werden.



### Abb. 20 Shh Inhibition

Die PCR zeigt eine Inhibition des Downstream-Shh-Targets Gli1 durch Cyclopamin (40%) und stärker noch durch CUR199691 (60%)

Trotz der stärkeren Inhibition des Shh Signalweges war aber in der durchflusszytometrischen Analyse der Tumorzellen keine stärkere Verminderung des CD133<sup>+</sup>Anteils nachzuweisen (55% CD133<sup>+</sup> Anteil nach Cyclopamin Behandlung versus 56% nach CUR199691 Behandlung). Dies bekräftigte unsere Annahme, dass ein Inhibitor eines einzigen stammzellrelevanten Signalweges nicht in der Lage ist, den Tumorstammzellpool vollständig zu eliminieren.



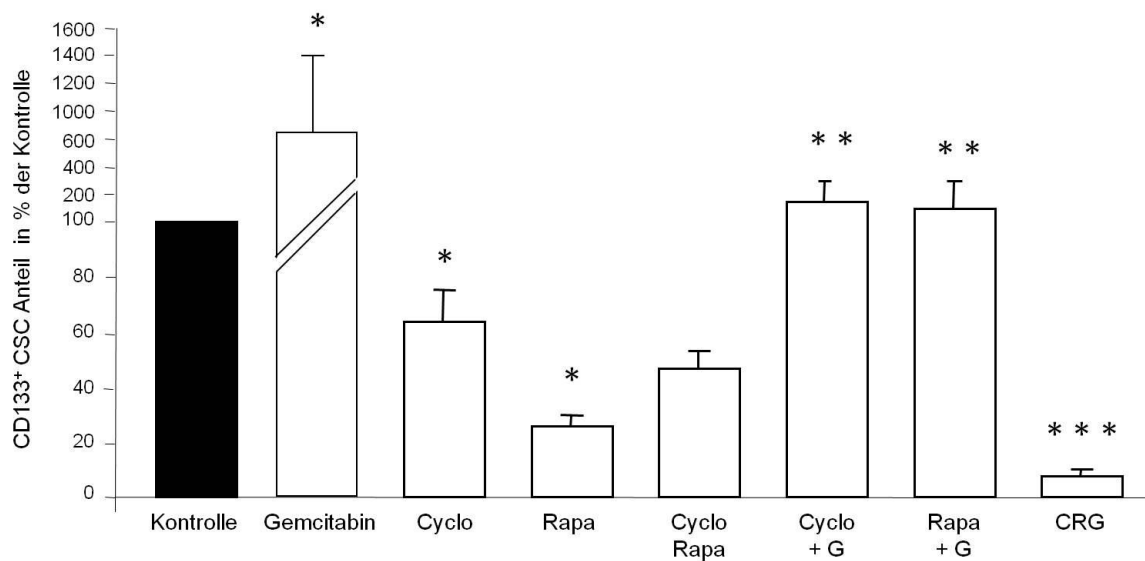
### Abb. 21 Cyclopamin versus CUR199691

Vergleich des CD133<sup>+</sup> Anteils der L3.6pl Zelllinie nach Shh Blockade mit Cyclopamin und CUR199691

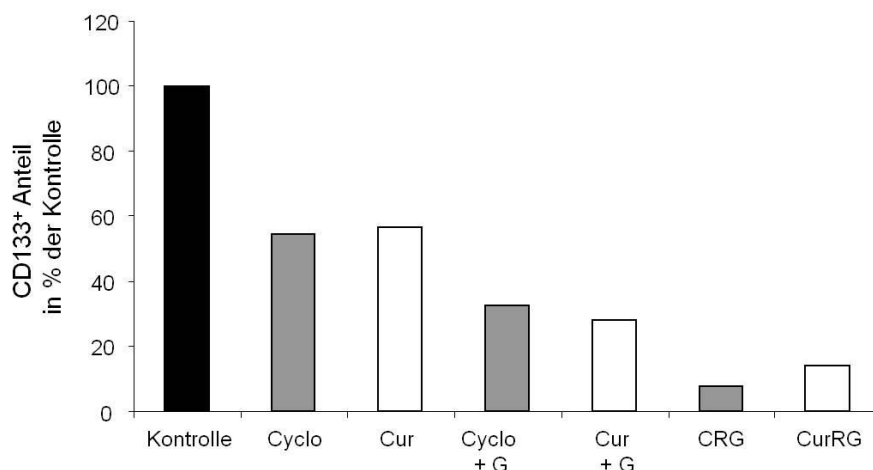
Da immer noch ein beträchtlicher Anteil Tumorstammzellen nachweisbar blieb – auch für die jeweilige Kombination mit Gemcitabin – testeten wir im nächsten Schritt die Kombinationstherapie, bestehend aus einem Shh Inhibitor, einem mTOR Inhibitor und Gemcitabin (**Cyclopamin + Rapamycin + Gemcitabin = CRG**; **CUR199691 + Rapamycin + Gemcitabin = CurRG**). Diese Dreifach-Behandlung der Zellen führte zu dem stärksten Effekt: einer nahezu vollständigen Eliminierung der CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellen.

Gleichzeitig war bei lichtmikroskopischer Beobachtung der Kulturen kein deutlicher Unterschied erkennbar zwischen den Zellen, die mit Gemcitabin allein behandelt wurden und denen, die zusätzlich Cyclopamin und Rapamycin erhielten. Während die Monotherapie mit Gemcitabin einen starken Effekt auf das Gesamtüberleben der Zellen hat, scheint die Zusatzbehandlung mit Cyclopamin und Rapamycin der Gesamtzellpopulation somit nicht weiter zu schaden.

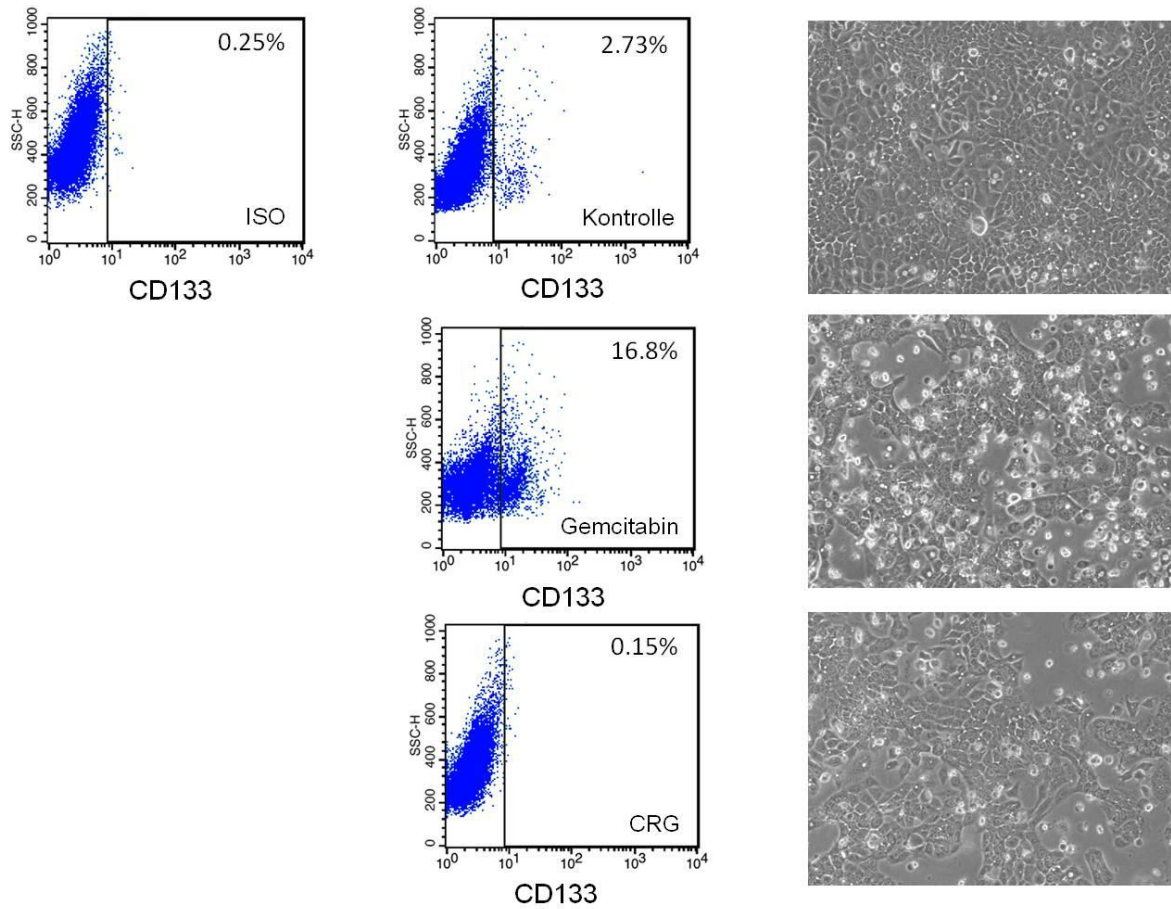
a)



b)



c)



### Abb. 22 CD133<sup>+</sup> Subpopulation

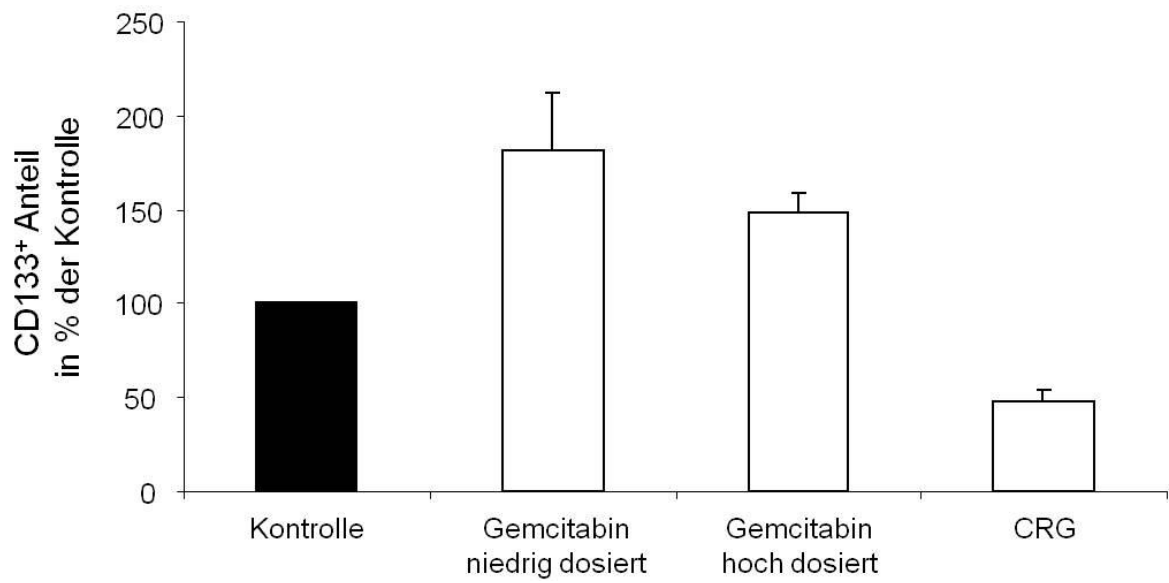
- Der CD133<sup>+</sup> Tumorstammzell-Anteil der L3.6pl Zelllinie wurde nach der jeweiligen *in vitro* Behandlung durchflusszytometrisch bestimmt. Für jede Gruppe gilt  $n \geq 3$  (\* $p < 0,01$  vs Kontrolle, \*\* $p < 0,05$  vs Monosubstanz-Behandlung, \*\*\* $P < 0,05$  vs Behandlung mit zwei Substanzen).
- Vergleich Cyclopamin (+Kombination) versus CUR199691 (+Kombination)
- Repräsentative Bilder der Durchflusszytometrie und Abbildungen der Zellen in Kultur

### 3.1.3 *Behandlungseffekte auf die Zelllinie AsPC1*

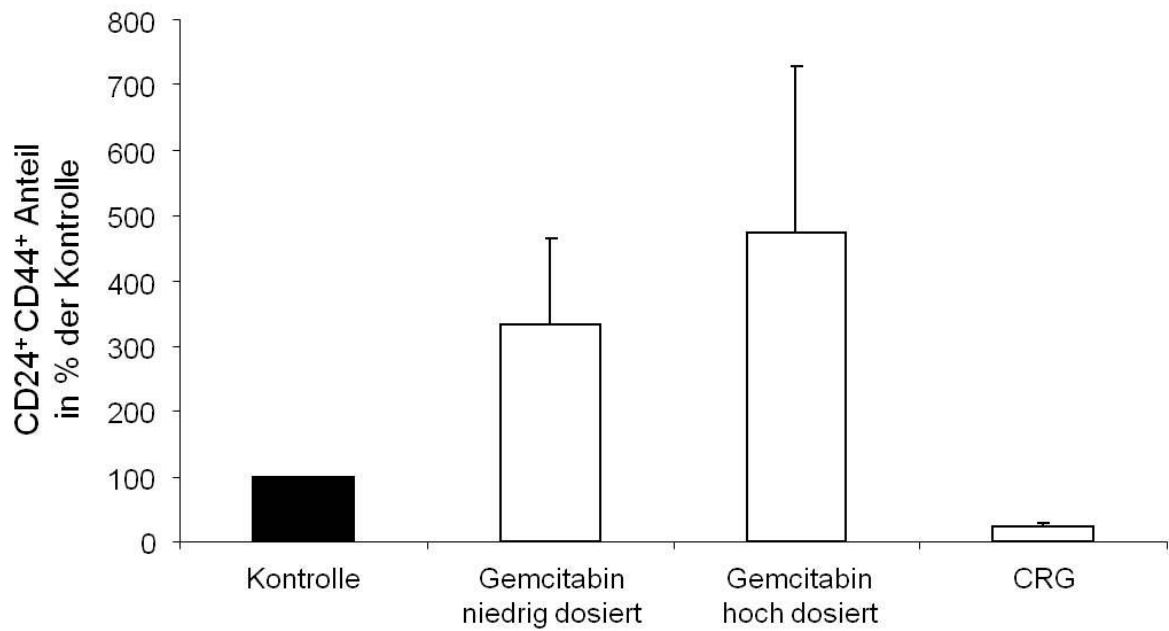
Da Li und Mitarbeiter zeigen konnten, dass in primären Pankreaskarzinomzellen die Subpopulation tumor-initiierender Zellen durch die Expression der Marker CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> und EpCAM<sup>+</sup> charakterisiert ist, führten wir zusätzlich Experimente mit dieser Markerkombination durch (Li, Heidt et al. 2007). Aufgrund der starken Expression dieser Antigene in der Zelllinie L3.6pl, wurde mit der Pankreaskarzinomzelllinie AsPC1 gearbeitet, für die wir bereits gezeigt hatten, dass sie ein adäquates Modell für den Gebrauch von CD44<sup>+</sup> und CD24<sup>+</sup> als mögliche Stammzellmarker ist (Hermann, Huber et al. 2007). Der Oberflächenmarker EpCAM wurde nicht gefärbt, da dieses Antigen, das meist dazu verwendet wird, Zellen epithelialen Ursprungs in Primärtumoren anzureichern, in allen von uns getesteten Pankreaskarzinomzelllinien (MiaPaCa, BXPC3, AsPC1, L3.6pl, Su8686, Panc01) zu 100% exprimiert wurde. Die AsPC1 Zellen sind im Vergleich zu den L3.6pl Zellen resistenter gegen Gemcitabin. Während die IC50 für Gemcitabin in L3.6pl Zellen bei 48,7 ng/ml liegt, ist sie in AsPC Zellen mit 452,6µg/ml 9294 mal höher (Kleespies, Kohl et al. 2005). Selbst in diesen äußerst Gemcitabin-resistenten Zellen war in Analogie zur L3.6pl Zelllinie nach Gemcitabin Behandlung eine relative Anreicherung der Tumorstammzellen nachzuweisen. Durch die CRG Tripletherapie war der Tumorstammzellgehalt auf Isokontrollniveau zu reduzieren – sowohl unter Verwendung von CD133 als auch von CD24/CD44 als Marker.



a)



b)



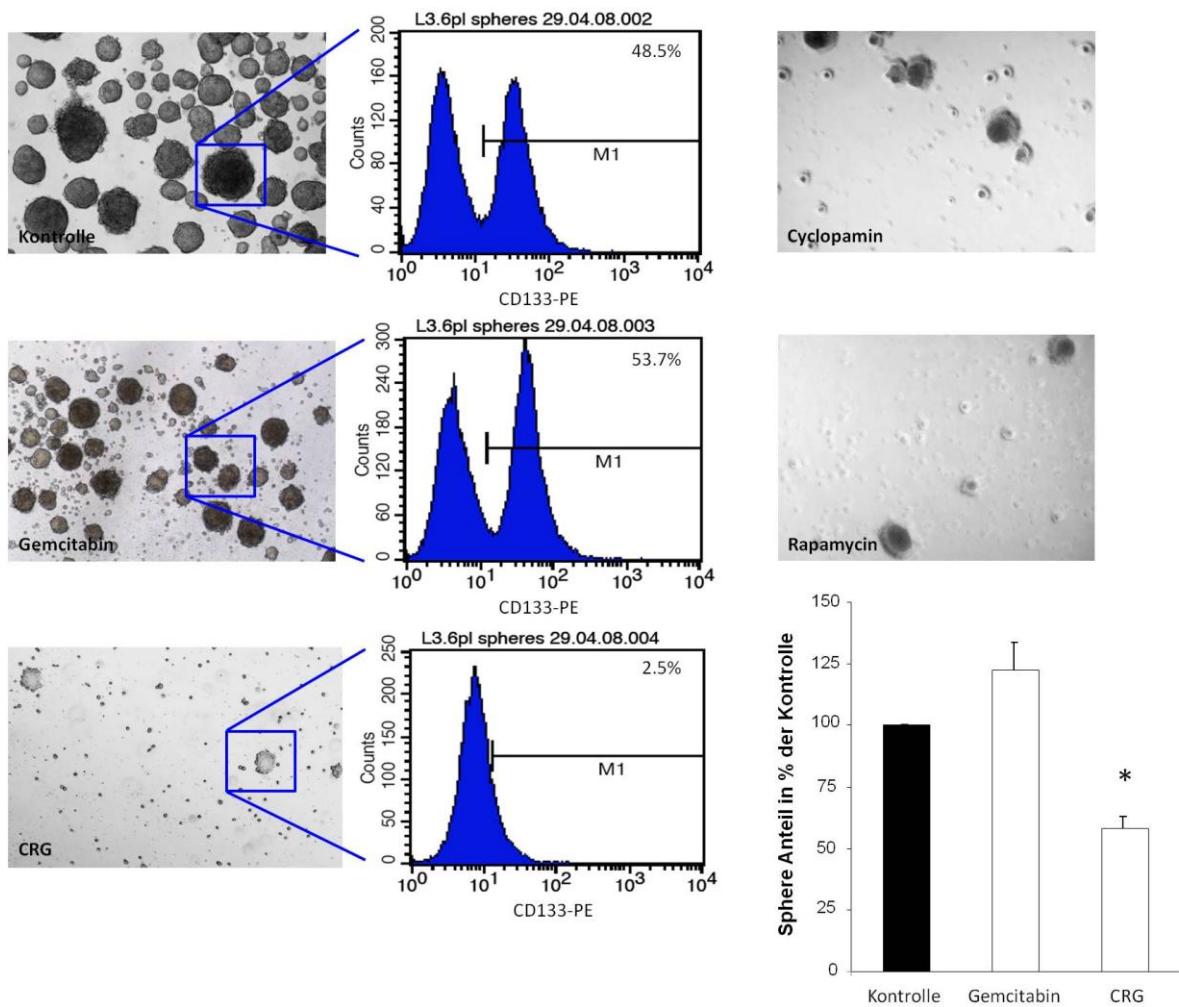
**Abb. 23 Zelllinie AsPC1**

a) CD133<sup>+</sup> Anteil

b) CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> Anteil

### 3.1.4 Behandlungseffekte auf Tumorsphären

Zur Ausweitung unserer *in vitro* Daten benutzten wir parallel zur Durchflusszytometrie den sogenannten „sphere formation assay“ zur Identifizierung einer Zellpopulation, die stark mit Tumorstammzellen angereichert ist (Hermann, Huber et al. 2007). In diesem funktionellen Assay wurden die pankreatischen Tumorstammzellen klonal als Spheres expandiert (s. Methodenteil) und jeweils vor und nach der Behandlung die Anzahl der schwimmenden Spheres ausgezählt. Die Gemcitabin Monotherapie führte zu einem leichten Anstieg der CD133<sup>+</sup> Zellen, was die starke Chemoresistenz dieser Zellen widerspiegelt, während Cyclopamin und Rapamycin als Monotherapie bereits zu einer Verminderung der Sphere-Zahl führten. Der stärkste Effekt war auch in diesem Fall nach CRG Therapie festzustellen.



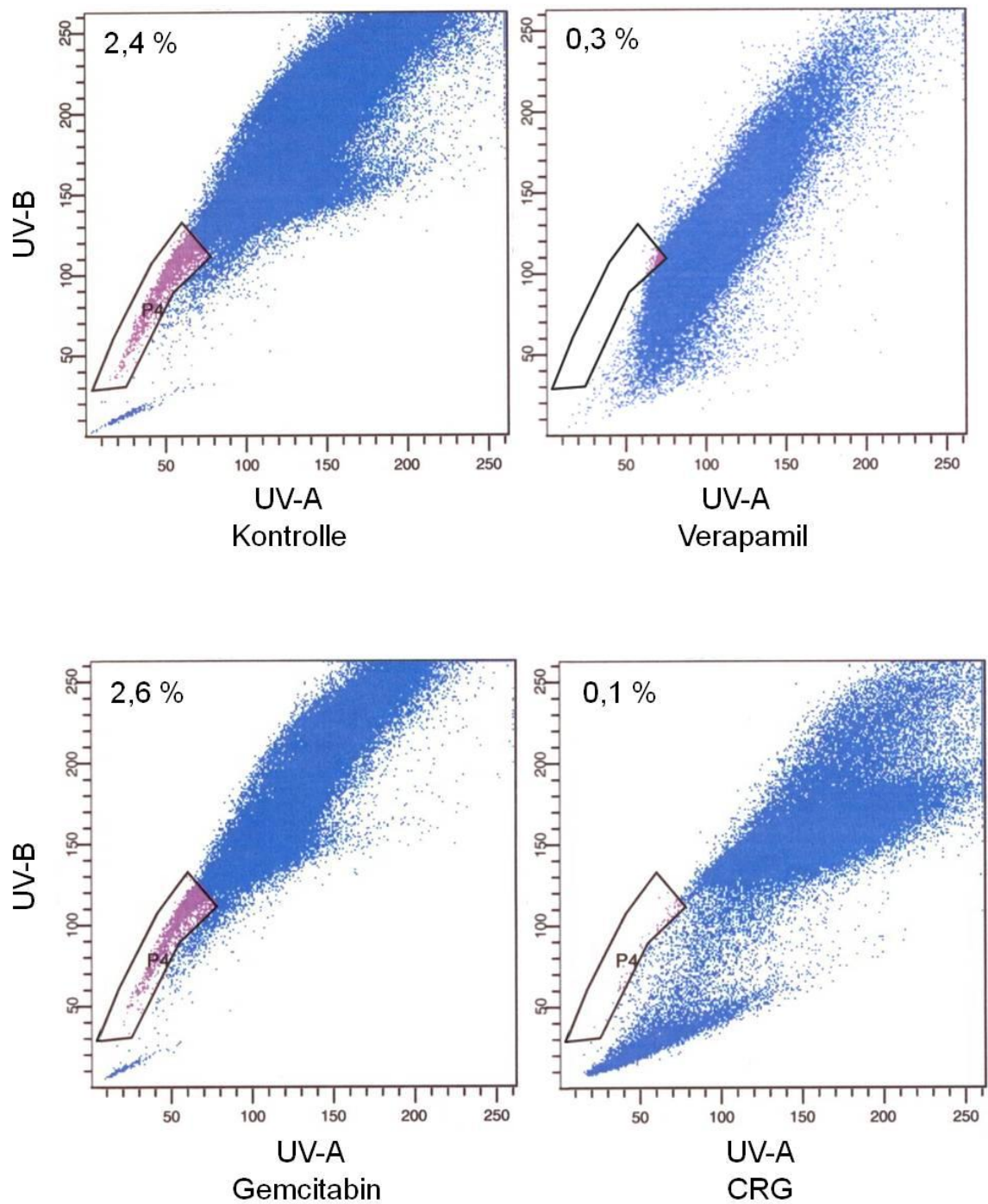
### Abb. 24 Tumorstammzell-Spheres

Pankreatische Tumorstammzell-Spheres wurden entweder mit Gemcitabin als Monosubstanz oder mit der CRG Tripletherapie behandelt ( $n=3$ , \*  $p<0,05$  vs. Kontrolle). Abgebildet sind repräsentative Bilder der Spheres in Kultur und die dazugehörigen durchflusszytometrischen Bilder der dissoziierten Spheres.

### 3.1.5 *Side Population*

Zudem besteht die Möglichkeit, Zellen mit Stammzeleigenschaften über eine Analyse der Side Population (SP) zu identifizieren (Hirschmann-Jax, Foster et al. 2004). In den vorliegenden Untersuchungen zeigt eine Behandlung mit Gemcitabin auch auf diese SP Zellen keinen Effekt.

Da sich Side Population Zellen über ihre vermehrte Expression von Transportpumpen in ihrer Zellmembran auszeichnen, dürfte sich die Gemcitabin Resistenz durch diesen Transportmechanismus erklären lassen. Wie in der abgebildeten Analyse zu sehen ist, kann durch die zusätzliche Applikation von Cyclopamin und Rapamycin diese Resistenz überwunden werden, so dass es zu einer praktisch vollständigen Eliminierung der SP Zellen kommt.



**Abb. 25 Side Population**

Effekt der Gemcitabin Monotherapie versus einer Tripletherapie mit CRG. Als Negativkontrolle diente eine Probe, die mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil behandelt worden war.

### 3.2 Behandlungsauswirkungen auf primäre Pankreaskarzinomzellen

Die bisherigen *in vitro* Untersuchungen wurden überwiegend mit der humanen Zelllinie L3.6pl durchgeführt, für die bereits gezeigt worden war, dass sie sich gut für Tumorstammzelluntersuchungen eignet (Hermann, Huber et al. 2007). Um den klinischen Bezug und die klinische Bedeutung unserer Ergebnisse zu verdeutlichen, folgten Untersuchungen mit Primärzellen, die wir aus humanen Pankreaskarzinomen isolierten. Analog der Zelllinien-Ergebnisse führte die Gemcitabin Monotherapie zu einer leichten Anreicherung der Tumorstammzellpopulation, während die CRG Kombination sowohl die CD133<sup>+</sup> als auch die CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> Population beseitigte.

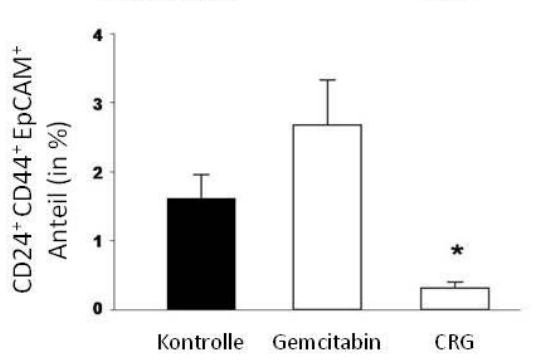
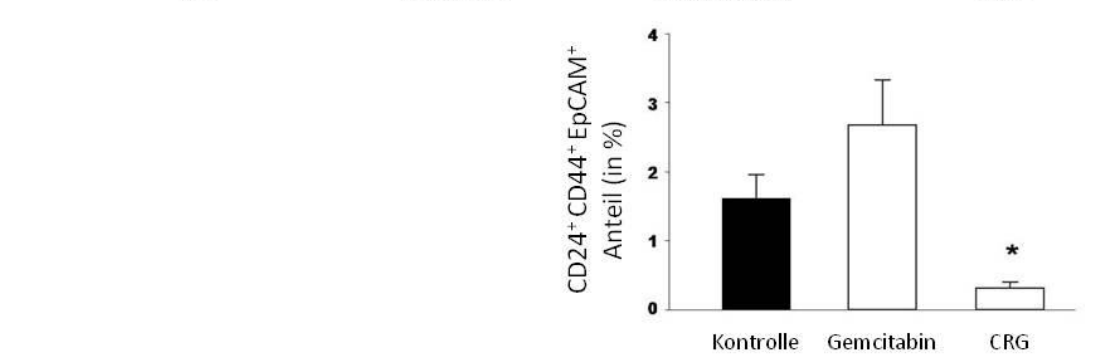
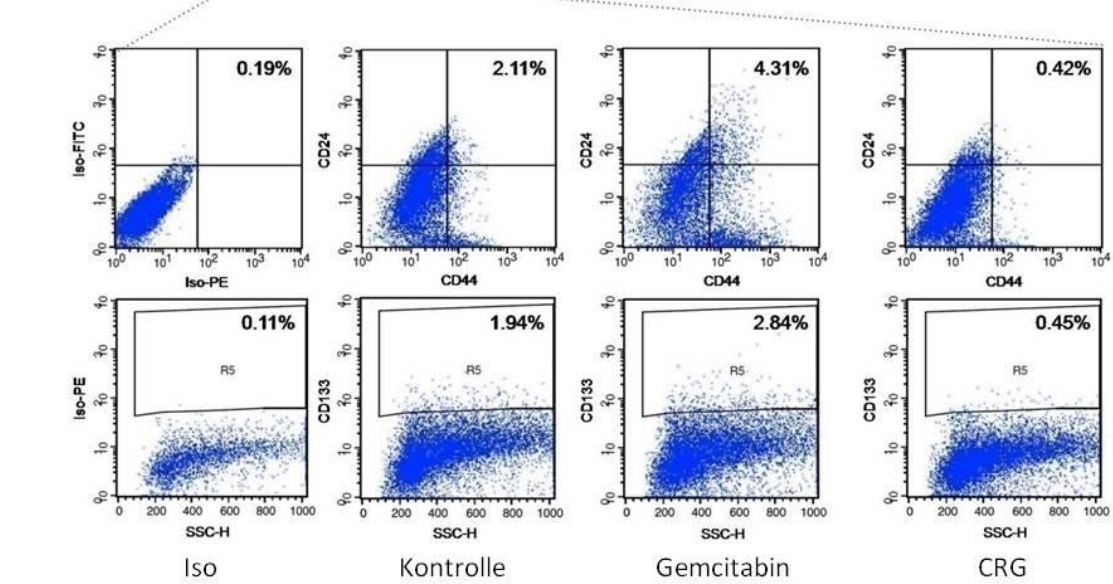
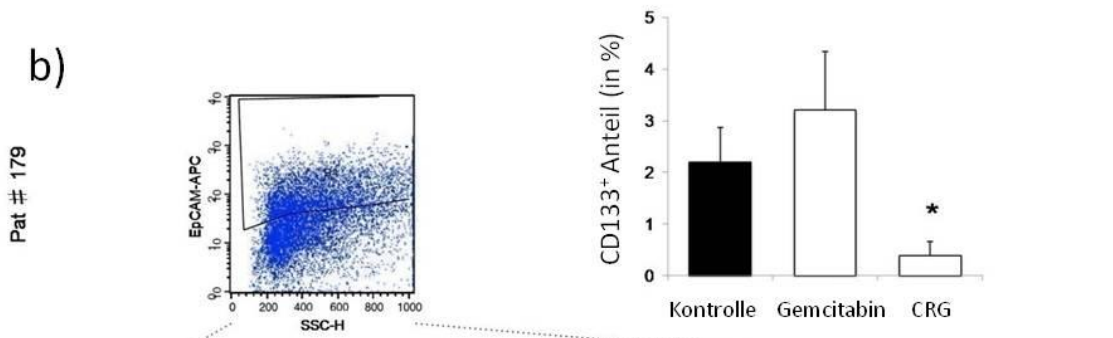
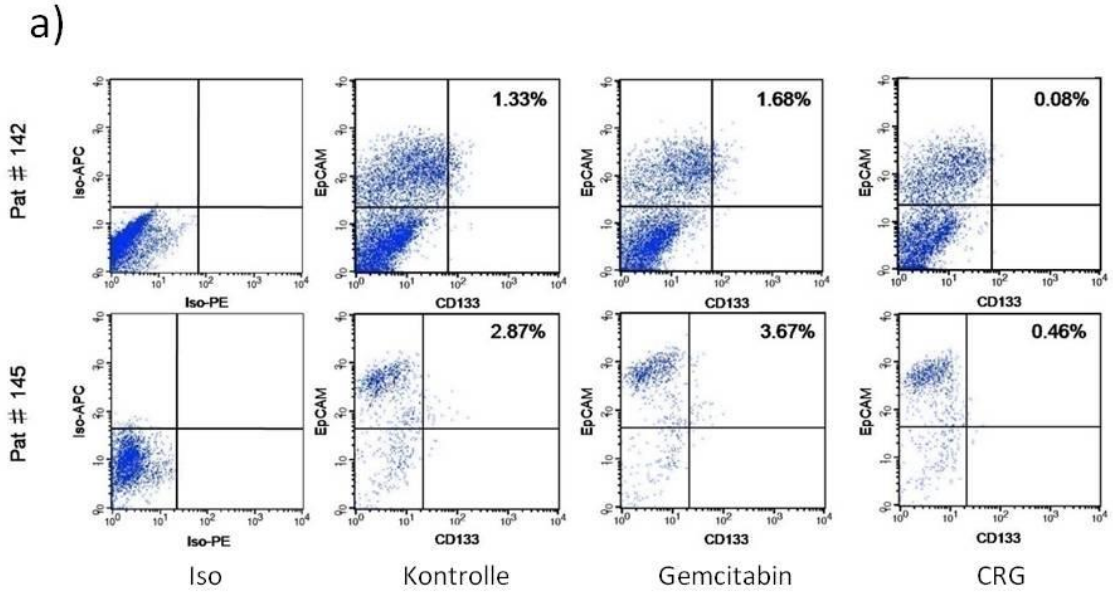
Zu sehen war bei der Analyse der Primärtumoren unter anderem, dass, bezogen auf die jeweilige Behandlung, die Antwort der Primärzellen heterogen war: bei einigen Patientenzellen war ein ähnlich starker Effekt auf die Tumorstammzellen zu beobachten wie in den vorhergehenden Zelllinien-Untersuchungen, andere hingegen zeigten einen verhältnismäßig schwachen Effekt nach CRG Therapie. Interessanterweise korrelierte dieser Effekt mit der individuellen Reaktion der Patientenzellen auf das Standardtherapeutikum Gemcitabin. Das heißt: wenn es zu einer relativen Anreicherung unter Gemcitabin Monotherapie kam, konnte diese Resistenz unter zusätzlicher Cyclopamin und Rapamycin Behandlung beseitigt werden. Zeigten die Primärzellen auf Gemcitabin keine Reaktion, war der Effekt auch nach der Tripletherapie schwach ausgeprägt.

#### **Abb. 26 Primäre Pankreaskarzinomzellen**

*Durchflusszytometrische Analyse frisch isolierter, primärer Pankreastumorzellen bezogen auf die jeweilige Behandlung. Die Analyse des Oberflächenmarkers EpCAM dient der Anreicherung von Zellen epithelialen Ursprungs.*

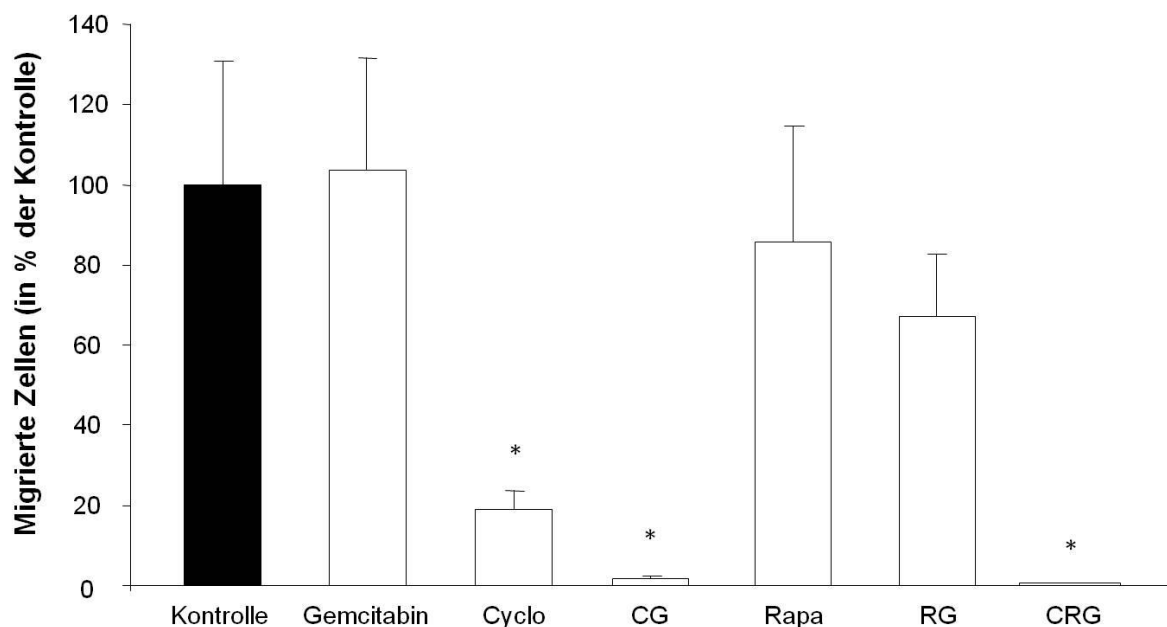
a) CD133<sup>+</sup> Anteil (n=7, \* p<0,001)

b) CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> Anteil (n=4, \* p<0,05)



### 3.3 Verlust der metastatischen Aktivität nach Shh Inhibition

Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Metastasierung beim humanen Pankreaskarzinom speziell das Chemokin SDF-1 (Stromal-Derived Factor-1) mit seinem Rezeptor CXCR4 verantwortlich ist und den CD133<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup> Tumorstammzellen in der invasiven Front eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung des humanen Pankreaskarzinoms zukommt (Hermann, Huber et al. 2007). In einer modifizierten Boyden chamber wurde die migratorische Aktivität behandelter L3.6pl Zellen im Vergleich zu nicht-behandelten untersucht. Als migratorischer Stimulus wurde SDF-1, der spezifische Ligand des Chemokin-Rezeptors CXCR4, benutzt. Weder Rapamycin noch Gemcitabin noch ihre Kombination waren in der Lage, signifikanten Einfluss auf die Migration auszuüben. Cyclopamin dagegen führte *in vitro* bereits allein zu einem signifikanten Verlust der funktionellen migratorischen Kapazität, die in zusätzlicher Kombination mit Gemcitabin vollständig aufgehoben war.

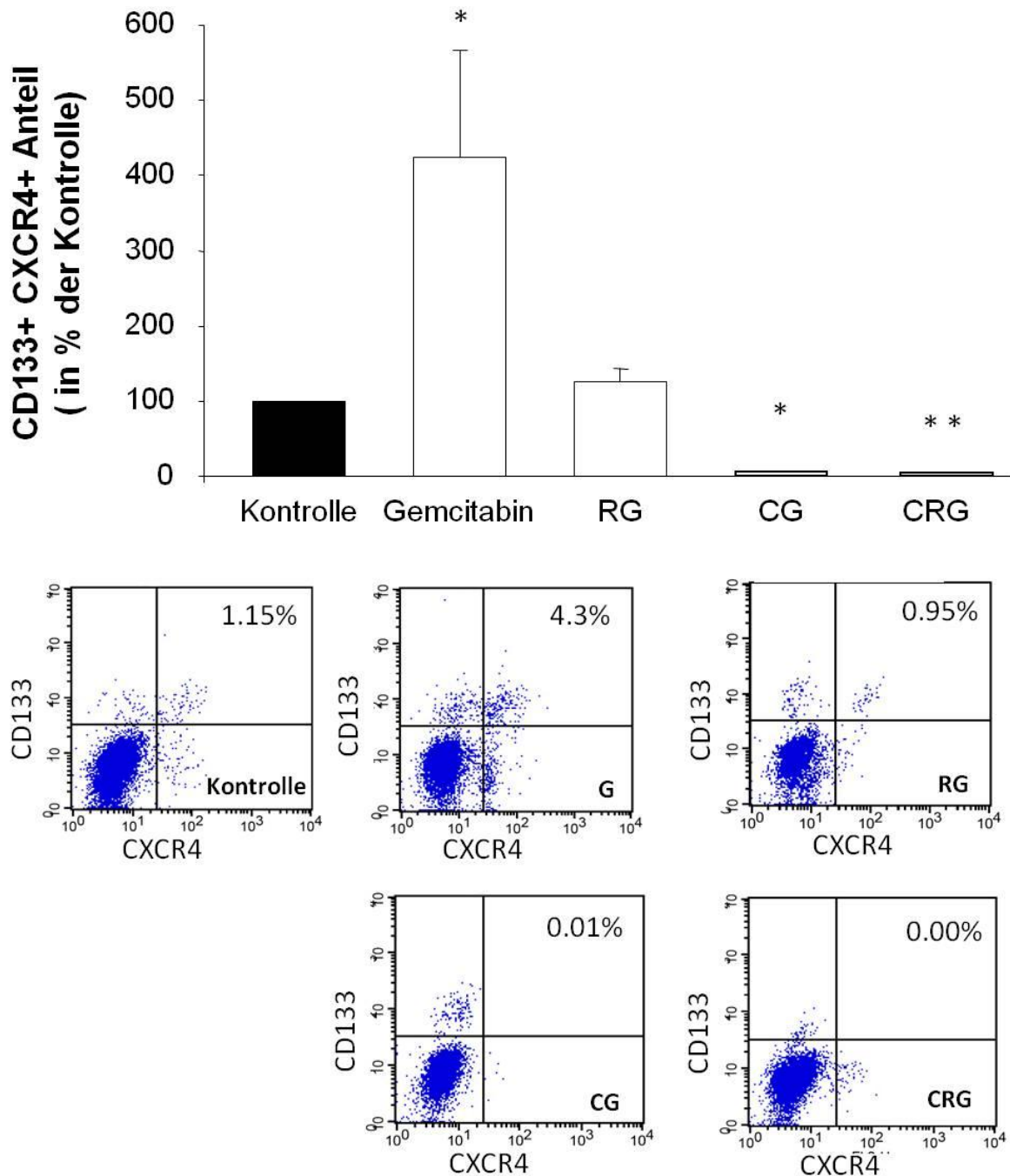


**Abb. 27 Migrationsassay**

Der Effekt verschiedener Behandlungs-Regimes auf die migratorische Kapazität der Zellen wurde mittels einer modifizierten Boyden chamber analysiert (n=3, \* p<0,05 vs. Kontrolle).



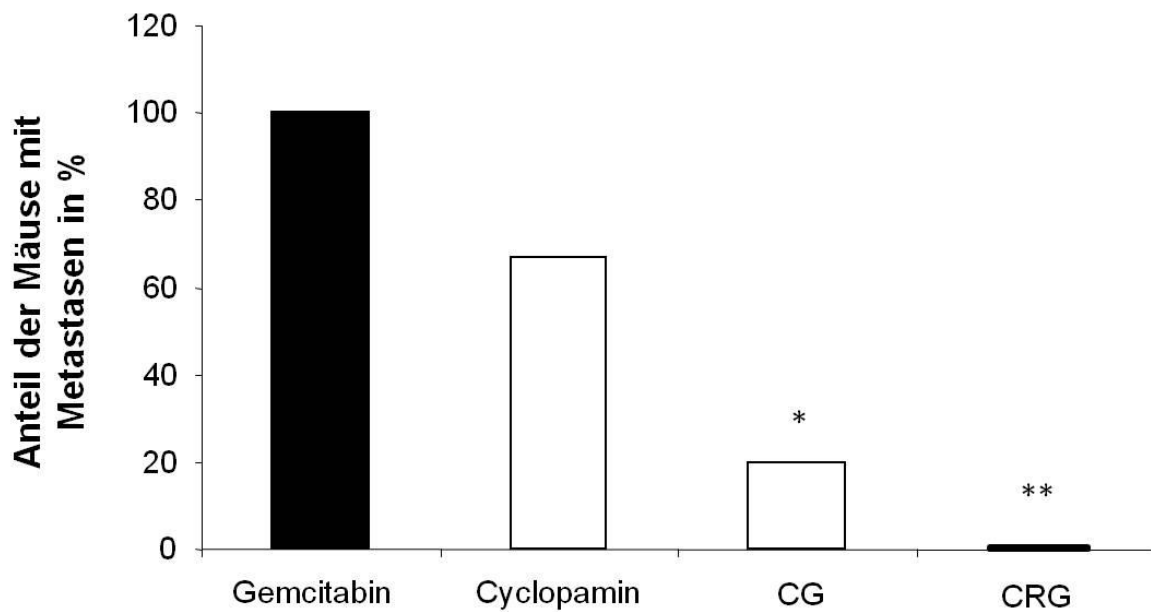
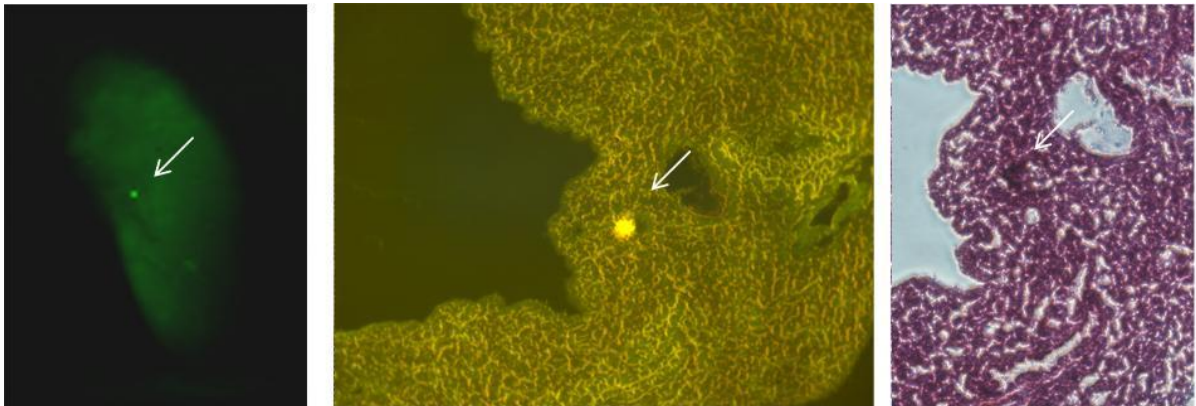
In Einklang mit diesen Ergebnissen war, dass es in der durchflusszytometrischen Analyse nach Behandlung mit Gemcitabin zu einer Anreicherung der für das metastatische Geschehen verantwortlichen Zellen kam, also den CD133 und CXCR4 doppelpositiven Zellen. Die Kombinationen aus Cyclopamin + Gemcitabin (CG) und Cyclopamin + Rapamycin + Gemcitabin (CRG) eliminierten diese Subpopulation vollständig.



**Abb. 28 CD133<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>Subpopulation**

Durchflusszytometrisch wurde der Anteil der besonders migrationsfreudigen CD133<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> Subpopulation bestimmt (\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\* n.s. vs. CG).

Auf diesen Ergebnissen basierend folgte eine Versuchsreihe zur Beurteilung des anti-metastatischen Effekts *in vivo*. Mit den jeweiligen Substanzen vorbehandelte und mit Q-dots markierte L3.6pl Zellen wurden systemisch infundiert und pulmonale Metastasen mittels eines Infrarot Scanners aufgespürt. Die als positiv gewerteten Signale wurden zusätzlich histologisch überprüft. Während alle Mäuse, die Gemcitabin-vorbehandelte Zellen infundiert bekommen hatten, pulmonale Metastasen aufwiesen, war das metastatische Potenzial der allein mit Cyclopamin vorbehandelten Zellen bereits deutlich reduziert. In den CG vorbehandelten Zellen war die metastatische Ansiedlung der Tumorzellen stärker und signifikant reduziert. Interessanterweise wiesen jedoch nur die Mäuse, die CRG behandelte Zellen erhalten hatten, keinerlei metastatische Absiedlungen auf.



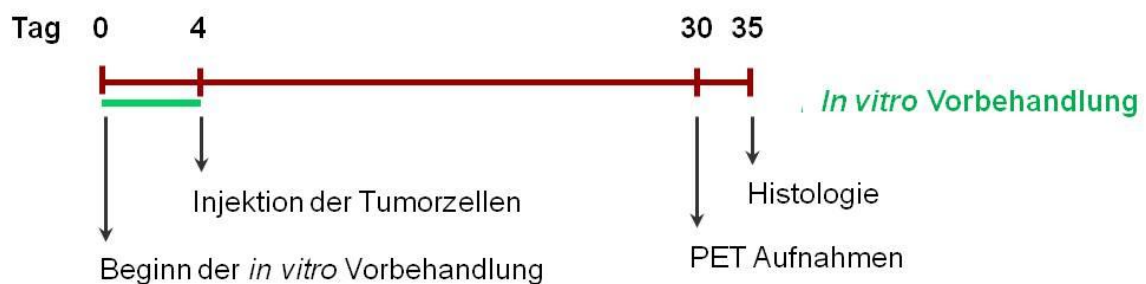
**Abb. 29 Metastasierung**

Das metastatische Potenzial wurde *in vivo* evaluiert, indem *ex vivo* vorbehandelte und mit Q-trackern markierte Tumorzellen intravenös infundiert wurden. Bilder der nearinfrared Kamera und der zugehörige H&E gefärbte Schnitt sind abgebildet (n≥5; \* p<0,05 vs. Gemcitabin, \*\* n.s. vs. CG).

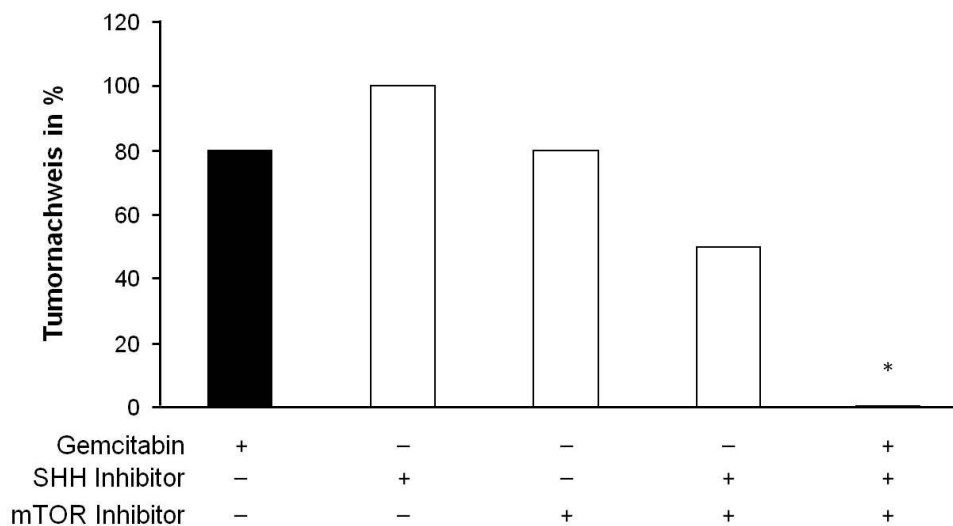
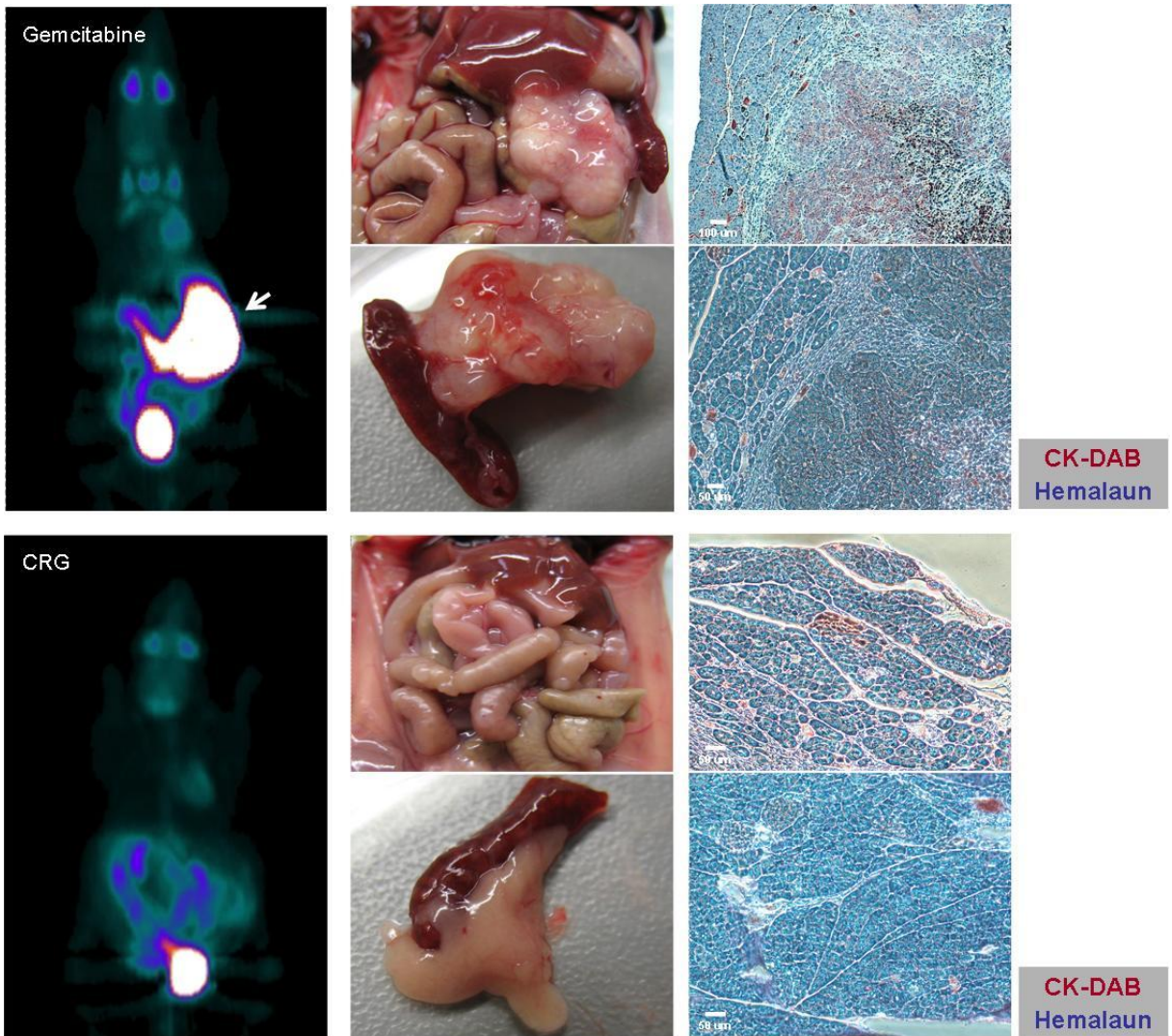
### 3.4 Verlust der Tumorigenität nach *in vitro* Vorbehandlung

Eine Grundeigenschaft von Tumorstammzellen ist ihre Fähigkeit, in Zweitempfängern Tumoren zu bilden. Per definitionem müssen sie in seriellen Passagen in der Lage sein, einen Tumor mit all seinen heterogenen Tumorzellpopulationen zu generieren - theoretisch reicht sogar eine einzige Zelle dazu aus (O'Brien, Pollett et al. 2007). Infolge der begrenzten Anzahl an Tumor(stamm)zellen, die aus Primärgewebe gewonnen werden kann, ist es nahezu unmöglich, reproduzierbar und in adäquater Versuchsgruppengröße *in vivo* Behandlungsexperimente mit Patientenzellen durchzuführen. Deshalb wurden alle nachfolgenden Versuche mit der etablierten Pankreaskarzinomlinie L3.6pl durchgeführt.

#### Versuchsaufbau



Die gleiche Anzahl L3.6pl Zellen wurde der jeweiligen Substanz(kombination) (Gemcitabin, Rapamycin, Cyclopamin, RG, CG, CRG) ausgesetzt. Nach 4 Tagen (Gemcitabin: 24 h) wurden die überlebenden Zellen orthotop ins Pankreas von Nacktmäusen implantiert, die keine weitere *in vivo* Behandlung erhielten. Nach 30 Tagen wurde die tumorigene Potenz der implantierten Zellen mithilfe von PET-Aufnahmen ermittelt und nach 35 Tagen mittels makroskopischer und mikroskopischer Auswertung. Verglichen mit Gemcitabin, waren weder Cyclopamin noch Rapamycin in der Lage, die Tumorigenität zu beeinflussen. Die Kombination aus Cyclopamin und Rapamycin zeigte ein leicht reduziertes tumorigenes Potenzial, was mit den *in vitro* Beobachtungen vereinbar ist, die in dieser Konstellation keine vollständige Eliminierung der Tumorstammzellpopulation gezeigt hatten. Nur die CRG-Kombination führte dazu, dass keines der Tiere einen Pankreastumor entwickelte, was für eine vollständige *in vitro* Eliminierung der tumor-initiiierenden Zellen spricht.



**Abb. 30 Tumorigenität**

Die tumorigene Potenz der *in vitro* vorbehandelten Zellen wurde an Tag 30 mittels PET Verfahren evaluiert und an Tag 35 histologisch verifiziert. Abgebildet sind die PET Aufnahmen, die makroskopischen und die mikroskopischen Bilder (oben) Statistische Auswertung (n=5, \* p<0,05 vs. Gemcitabin) (unten).

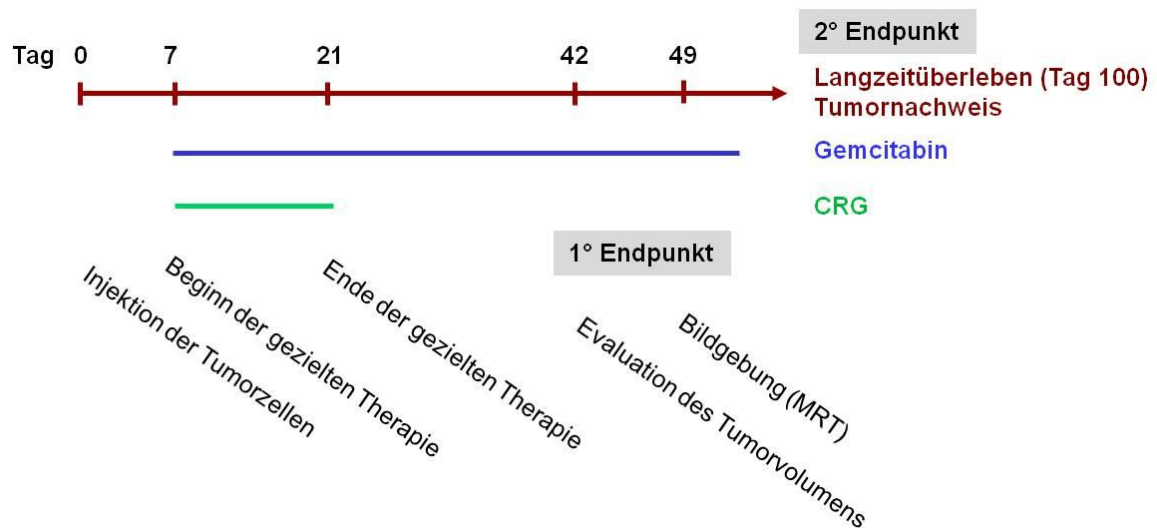


### 3.5 Verbessertes Langzeitüberleben nach gezielter *in vivo* Behandlung

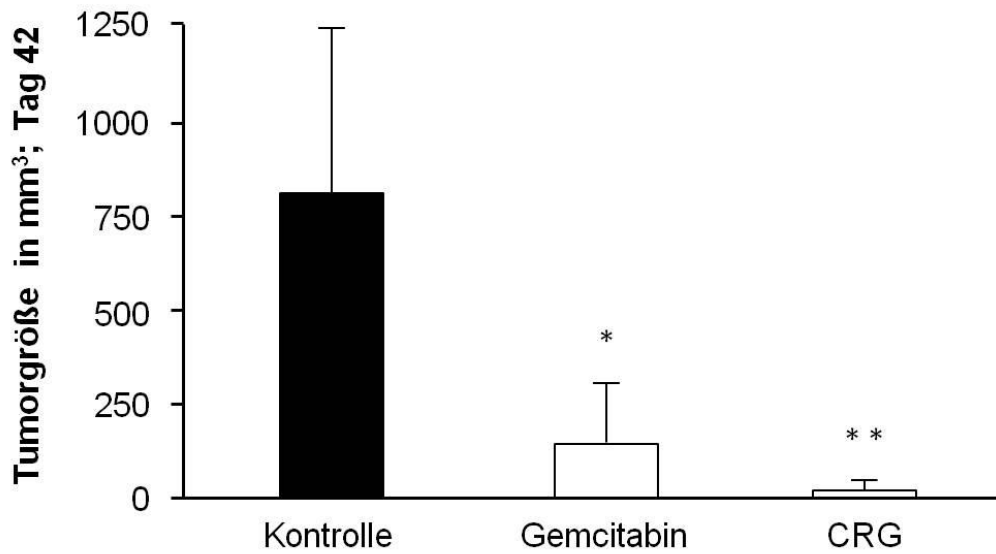
#### 3.5.1 Tiere nach orthotoper Implantation von L3.6pl Zellen

Um die Effektivität der *in vitro* etablierten Kombinationstherapie im klinisch relevantesten Szenario beurteilen zu können, untersuchten wir im Anschluss die Behandlung bereits bestehender Pankreaskarzinome im Mausmodell. Eine Woche nach der Zellimplantation erfolgte die Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Behandlungsgruppen.

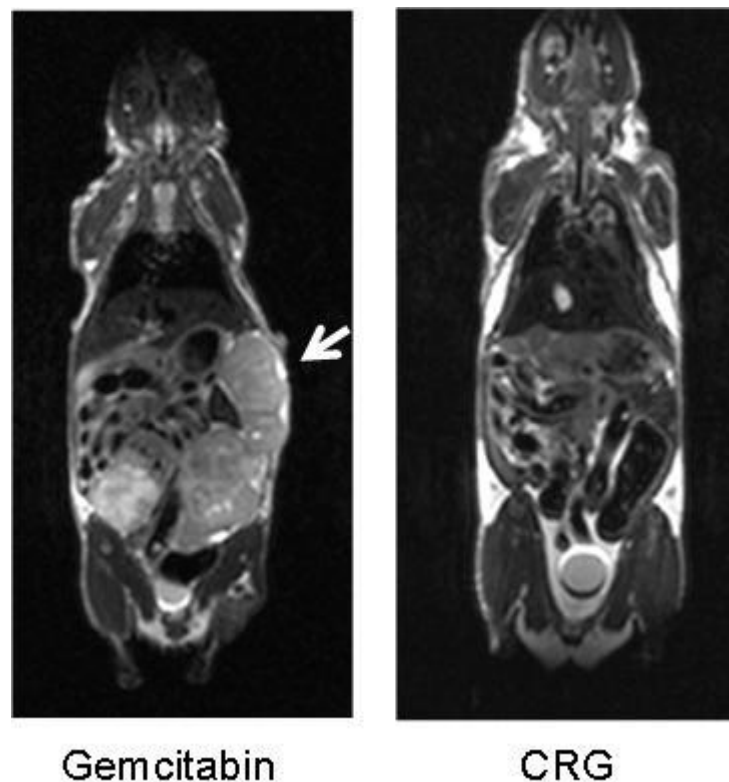
#### Versuchsaufbau



Die Behandlungsdauer von Cyclopamin und Rapamycin betrug zwei Wochen, um mögliche stammzellvermittelte Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Gemcitabin wurde über eine Zeitspanne von 11 Wochen gegeben. Die Tumorgöße wurde nicht-invasiv an Tag 42 mithilfe einer Schieblehre gemessen und gemäß der Formel: Länge x Breite x Tiefe x  $\pi/6$  berechnet. An den Tagen 47 – 51 fanden Kontrollen mittels MRT Aufnahmen statt.



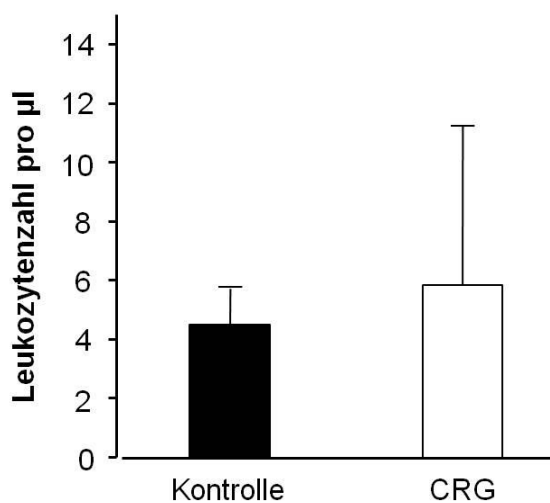
**Abb. 31 TumorgroÙe** an Tag 42 ( $n=5$ , \*  $p<0,005$ , \*\*  $p<0,001$ )



**Abb. 32 MRT**

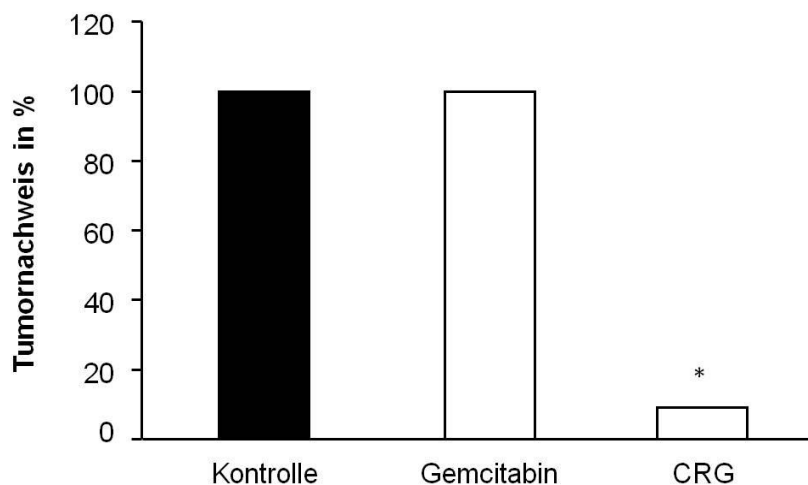
An den Tagen 47 – 51 fanden bildgebende Kontrollen zur Detektion der TumorgroÙe statt. Auf der linken Aufnahme einer mit Gemcitabin behandelten Maus ist deutlich der orthotop wachsende Pankreastumor zu erkennen (Pfeil), wohingegen das Abdomen der CRG behandelten Maus ohne pathologischen Befund ist.

Aufgrund der guten Ergebnisse einschließlich des guten Allgemeinzustandes der Tiere wurde die Studie bis Tag 100 fortgeführt, um mögliche Unterschiede im Langzeitüberleben der Tiere zu untersuchen. Um unerwünschte Nebenwirkungen der Stammzell-Signalweg-Inhibitoren während dieses relativ langen Studienverlaufes auf das hämatopoetische System als wichtigem Stammzellkompartiment festzustellen, wurden am Ende des Experiments die Leukozytenzahlen im Peripherblut bestimmt. Im Vergleich mit Kontrollwerten ergaben sich jedoch keine signifikanten Abweichungen, insbesondere keine Leukopenie als Anzeichen eines möglichen Stammzelldefekts.



**Abb. 33 Leukozytenzahl**

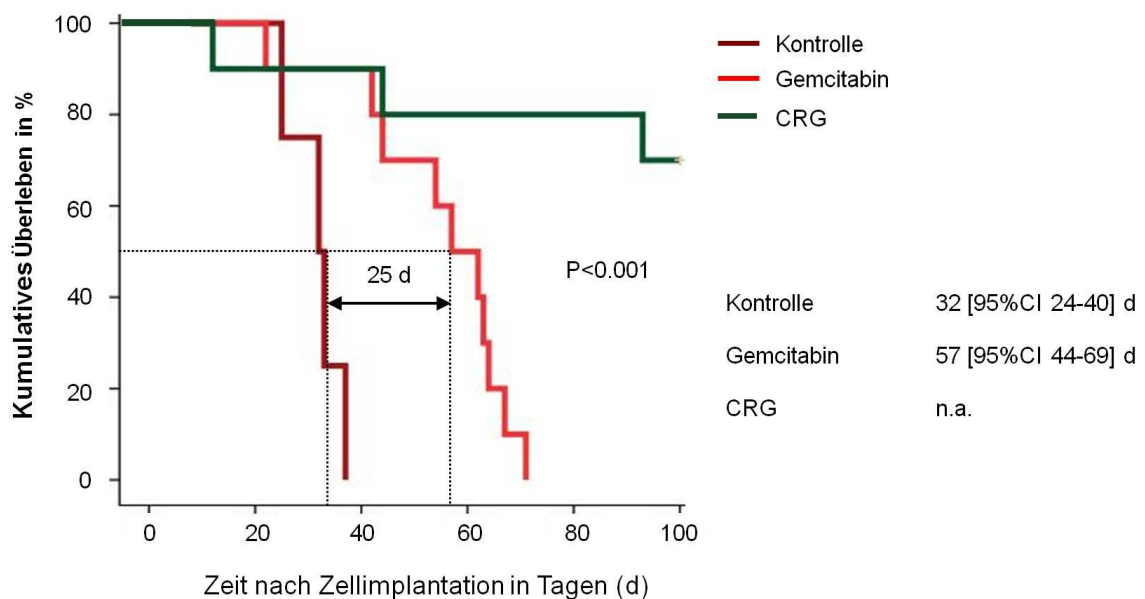
Der Tumornachweis an Tag 100 war in der CRG Gruppe im Vergleich zur alleinigen Gemcitabin Behandlung signifikant vermindert, was in Übereinstimmung mit der *in vitro* beobachteten Elimination der Tumorstammzellen nach CRG Behandlung ist.



**Abb. 34 Tumornachweis** ( $n=5$ , \*  $p<0,005$ )



Alle Kontrolltiere hatten große, lebenslimitierende Tumoren, denen sie erlagen beziehungsweise aufgrund derer sie vorzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten. Keines von ihnen lebte länger als einen Monat nach Tumorzell-implantation. Das Nukleosidanalogen Gemcitabin verbesserte als Monotherapie bereits signifikant die Überlebenszeit der Tiere, was aber nicht auf eine Eliminierung der Tumorstammzellen zurückzuführen ist, sondern auf eine Inhibition des Tumorwachstums aufgrund der zytostatischen Wirkung des Medikaments. Die mittlere Überlebenszeit der Tiere war mit 57 Tagen immer noch stark beeinträchtigt – als Folge der Tumor take rate von 100%. Die Behandlung mit der Kombination Cyclopamin + Rapamycin + Gemcitabin ermöglichte den Tieren ein signifikant verbessertes Langzeitüberleben.



### Abb. 35 Überlebenszeit

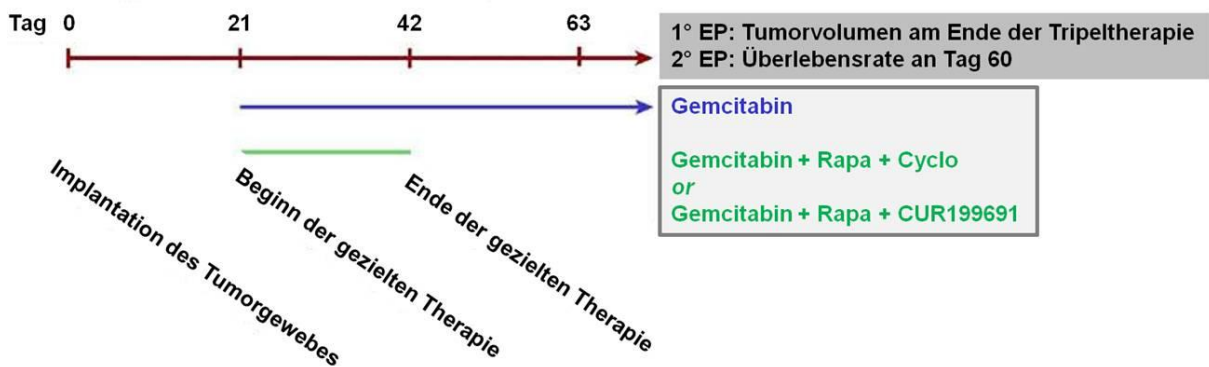
Das kumulative Überleben ist als Kaplan-Meier Kurve dargestellt (Kontrolle n=5, Gemcitabin n=13; CRG n=11;  $p < 0,001$  vs. Gemcitabin).

Ein Tod am achten Tag war auf die Verabreichung der Substanz Cyclopamin mittels Magensonde zurückzuführen und wurde daher zensiert. Ein CRG behandeltes Tier litt unter einem nachweisbaren Tumor und musste an Tag 44 vorzeitig aus dem Versuch genommen werden. Die anderen 2 Todesfälle waren ebenfalls nicht auf Tumorwachstum zurückzuführen, sondern entweder auf eine lokale Infektion (n=1) oder aufgrund ungeklärter Ursache (n=1). Die durchgeführte Obduktion ergab keinen Anhaltspunkt, zeigte aber eine unauffällige weiche Bauchspeicheldrüse. Insgesamt erreichten von den 11 CRG behandelten Tieren 63% den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen, wohingegen keines der Tiere, die mit dem aktuellen Standardtherapeutikum Gemcitabin behandelt wurden, länger als Tag 71 lebte.

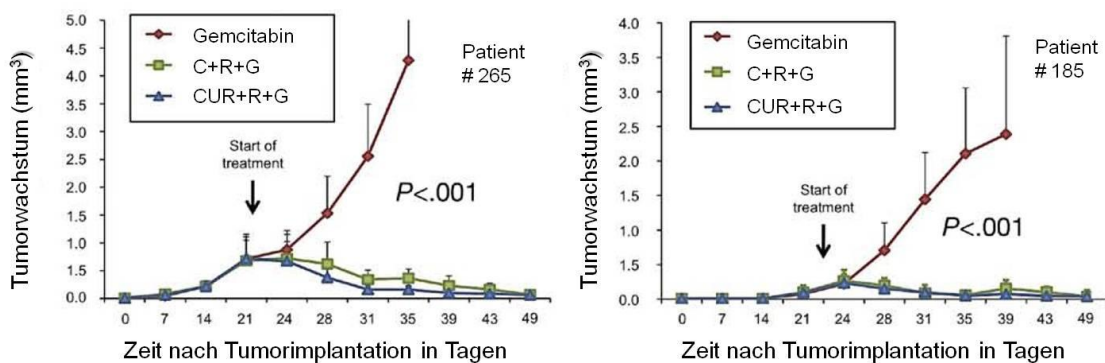
### 3.5.2 Tiere nach subkutaner Implantation von Primärgewebe

In einem weiteren, klinisch extrem relevanten Versuch testeten wir die Kombinationstherapie in einem Mausmodell mit subkutan implantierten Tumoren, die durch *in vivo* expandiertes Primärgewebe von Patienten mit Pankreaskarzinom gewonnen wurden.

#### Versuchsaufbau



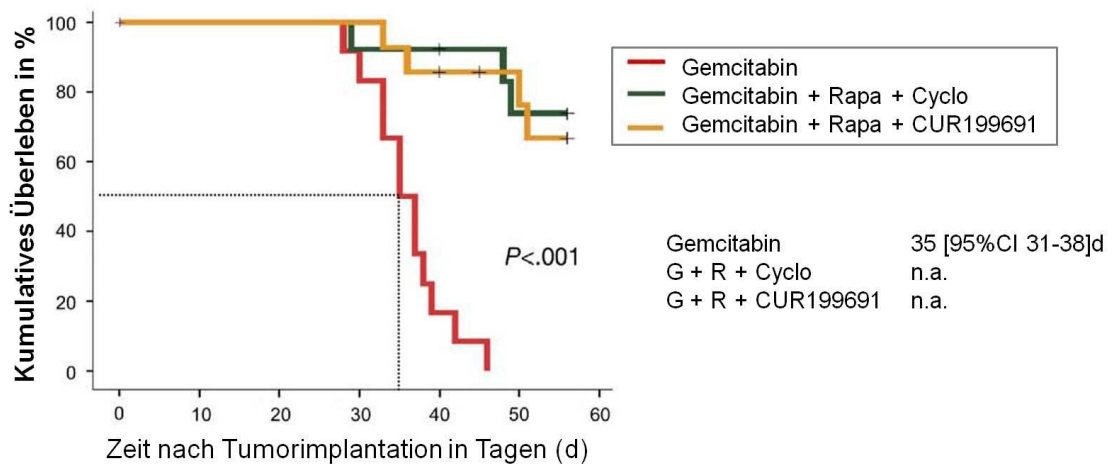
Drei Wochen nach der bilateralen Implantation der Tumoren wurden die tumortragenden Tiere in die jeweiligen Behandlungsgruppen randomisiert: Cyclopamin oder CUR199691 und Rapamycin wurden für eine Dauer von drei Wochen verabreicht, während Gemcitabin bis zum Ende des Experiments gegeben wurde. Das Tumorvolumen wurde mindestens zweimal pro Woche mit einer Schieblehre gemessen:



**Abb. 36 Tumorwachstum**

Dargestellt ist der Verlauf des Tumorwachstums über 49 Tage; zum einen für schnell (linke Abbildung) und zum anderen für langsam (rechte Abbildung) wachsende Tumore

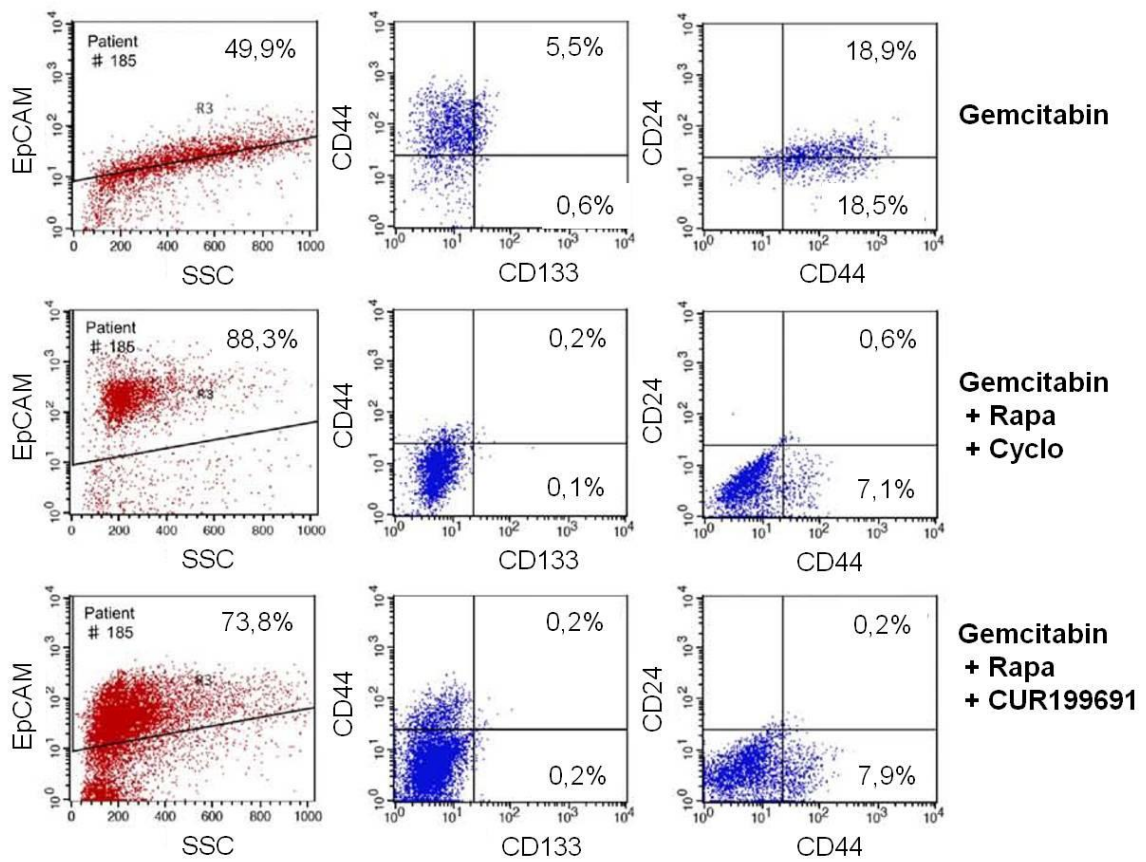
Alle Tiere, die nur mit Gemcitabin therapiert wurden, hatten große, lebenslimitierende Tumoren und starben dadurch innerhalb eines Monats nach Tumorimplantation. Im Gegensatz dazu kamen die Tumoren der Tripletherapie-Behandlungsgruppen (eine Gruppe mit dem Shh Inhibitor Cyclopamin und eine Gruppe mit dem Shh Inhibitor CUR199691) zum Stillstand und das Überleben war signifikant verlängert.



### Abb. 37 Überlebenszeit

Das kumulative Überleben ist für die drei Behandlungsgruppen als Kaplan-Meier Kurve dargestellt (Gemcitabin n=12; CycloRG n=13; CurRG n=14; jeweils  $p < 0,001$  vs. Gemcitabin).

Keines der Tiere aus den dreifach therapierten Gruppen starb aufgrund übermäßigen Tumorwachstums, allerdings starben wenige der Mäuse an Kachexie. Innerhalb der beiden Triple-Gruppen (CRG versus CurRG) war kein Unterschied festzustellen. Es gab Tiere, bei denen es zu einer vollständigen Regression kam, während andere noch kleine Resttumoren hatten. Interessanterweise zeigte der Phänotyp dieser Resttumoren in der Durchflusszytometrie, dass – im Gegensatz zu den Tumoren, die in der Gemcitabin-Gruppe fortschritten – die Tumorstammzellen vollständig eliminiert waren und zugleich der epitheliale Oberflächenmarker EpCAM stark exprimiert wurde.



**Abb. 38 Phänotypisierung**

Der Phänotyp der *in vivo* behandelten Tumoren wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Mithilfe von 7-AAD wurden nur die vitalen Zellen analysiert (nicht abgebildet) und anschließend nur die Zellen, die EpCAM exprimieren. Es folgte eine Doppelfärbung für CD133/CD44 und CD44/CD24

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

#### 4.1.1 *Sonic hedgehog* Signaltransduktionsweg

Unser initiales Augenmerk richtete sich auf die Frage, inwieweit eine Inhibition der Sonic hedgehog Signalkaskade, die insbesondere beim Pankreaskarzinom von Bedeutung ist, den Tumorstammzellpool und infolge die Tumorigenität beeinflussen kann. Derzeit noch nicht hinreichend geklärt ist, auf welches Zellkompartiment eine Inhibition von Shh wirkt. Während eine Hedgehog Inhibition in erster Linie Stromazellen eliminiert könnte, die im Pankreaskarzinom einen Großteil der Tumormasse ausmachen, konnten wir (Mueller, Hermann et al. 2009) und andere (Feldmann, Dhara et al. 2007) einen präferenziellen Effekt auf Tumorstammzellen nachweisen. Bei einer erfolgreichen Elimination des Tumorstammzellpools sollte folglich die Tumorigenität als definierende Eigenschaft von Tumorstammzellen beeinflusst werden können. Auch wenn dieser Signalweg eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung des Pankreastumors spielt, haben unsere Versuche überraschenderweise gezeigt, dass eine alleinige Shh Inhibition nicht zu einem vollständigen Verlust der Tumorigenität der Zellen ausreicht.

Bereits frühere Untersuchungen hatten nahegelegt, dass eine Inhibition des Shh Signalweges in erster Linie die Zellen trifft, die für Invasion und Metastasierung verantwortlich sind (Feldmann, Dhara et al. 2007). Übereinstimmend beobachteten wir nach Cyclopamin Behandlung eine signifikante Verminderung der migratorischen Aktivität der Zellen *in vitro*. Auch eine *ex vivo* Vorbehandlung der Zellen konnte die metastatische Fähigkeit *in vivo* nur teilweise reduzieren, was vermutlich auf die unvollständige Eliminierung der Tumorstammzellen zurückzuführen ist. Dass Feldmann et al. einen stärkeren Effekt beobachteten (Feldmann, Dhara et al. 2007), dürfte an der Wahl des verwendeten Tiermodells liegen: während Feldmann et al. mit einem orthotopen Pankreaskarzinommodell arbeiteten, wählten wir ein „systemic infusion“ Modell, das primär dazu dient, die Fähigkeit von in der Blutbahn befindlichen Zellen zur Extravasation und Bildung von Fernmetastasen zu analysieren. Nur die kombinierte Vorbehandlung der injizierten Zellen mit Cyclopamin und Gemcitabin führte zu einer signifikanten

Reduktion des metastatischen Potenzials. Dementsprechend war in der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenantigene eine Eliminierung der CD133<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> Tumorstammzellen zu sehen, denen eine Schlüsselrolle im Prozess der Metastasierung zukommt und die besonders in der invasiven Front von Pankreastumoren zu finden sind (Hermann, Huber et al. 2007). Diese Daten belegen, dass Cyclopamin erfolgreich die migrierende Subpopulation der Tumorstammzellen angreift und damit die Metastasierungsfähigkeit maßgeblich beeinflusst, aber verdeutlichen gleichzeitig auch, dass selbst die Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin nicht ausreicht, die Tumorigenität zu eliminieren. Übereinstimmende Ergebnisse veröffentlichten kürzlich Jimeno et al., die nach Behandlung mit Gemcitabin und Cyclopamin eine leichte Tumorregression und eine Abnahme der Tumorstammzellmarker beobachteten, aber ebenfalls keinen vollständigen Verlust der Tumorigenität (Jimeno, Feldmann et al. 2009).

Eine weitere Rationale für die eher mäßige Wirkung von Cyclopamin bietet eine jüngst veröffentlichte Studie: Lauth et al. konnten zeigen, dass eine onkogene Mutation in Kras zu einer downstream Aktivierung der Gli-Zielproteine (Gli 1, 2 und 3) des Shh Signalweges führt (Lauth, Bergstrom et al. 2010). Die Kras Mutation ist gerade im humanen Pankreaskarzinom von herausragender Bedeutung: in 85-95% der Fälle lässt sich bei Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs eine Kras Mutation nachweisen (Almoguera, Shibata et al. 1988; Hezel, Kimmelman et al. 2006). Da jedoch die in bisherigen Studien zur Inhibition des Shh Signalweges verwendeten Substanzen den upstream davon gelegenen Membrankomplex Smoothened (Smo) inhibieren (Cyclopamin, GDC-0449, CUR61414, CUR199691), ist eine Abschwächung der Wirkung bislang verwendeter Shh Inhibitoren durch eine onkogene Kras Mutation durchaus vorstellbar.

Unsere *in vitro* Versuche, unter anderem die Herunterregulierung des Zielgenes Gli1 in der Zelllinie L3.6pl nach Blockade des Hh Signalweges, belegen zweifelsfrei die Aktivität des Hh Signalweges in Pankreastumorzellen – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Thayer, di Magliano et al. 2003). Die genaue Funktionsweise des Hh Signalweges ist aber Gegenstand intensiver Diskussionen: obwohl bereits einige Mausmodelle zur Untersuchung einer kausalen Rolle der Hh Signale in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms etabliert wurden (Apelqvist, Ahlgren et al. 1997; Pasca di

Magliano, Sekine et al. 2006), unterschied keines von ihnen zwischen einer parakrinen und autokrinen Wirkungsweise. Yauch et al. konnten jetzt in Xenograft-Versuchen einen parakrinen Sekretionsmodus für den Hh Signalweg nachweisen: die Hh Liganden, die von Tumorzellen produziert werden, wirken demnach auf das Interstitium ihrer unmittelbaren Umgebung, in welchem der Hh Signalweg aktiviert wird und tragen damit indirekt zum Tumorwachstum bei (Yauch, Gould et al. 2008). Des Weiteren zeigten Tian et al., dass pankreatisches Epithelgewebe überhaupt nicht in der Lage ist, das kanonische Hh Signal umzuwandeln und der Shh Signalweg auf Tumorstromazellen begrenzt ist (Tian, Callahan et al. 2009). Unsere *in vitro* Untersuchungen, die größtenteils mit etablierten Zelllinien - in völliger Abwesenheit von Stromazellen - durchgeführt wurden, sind jedoch mit diesen Ergebnissen nicht vereinbar, da wir zweifellos eine Aktivität des Shh Signalweges in epithelialen Tumorzellen nachweisen konnten. Bei unseren Ergebnissen mit Primärgewebe, sowie auch bei den *in vivo* durchgeführten Versuchen, ist aber nicht auszuschließen, dass der Effekt der Shh Inhibition in erster Linie durch Tumorstromazellen vermittelt wurde. Daher sind weitere Untersuchungen zwingend erforderlich, den genauen Wirkungsmechanismus der Aktivierung des Hh Signalweges in Tumorstromazellen zu klären. Denkbar wäre, dass über eine Transduktion des Hh Signals in den Stromazellen eine supportive Mikroumgebung für die Tumorstammzellen generiert wird, so dass die *in vivo* beobachteten Effekte der Shh Inhibitoren über eine Zerstörung der Tumorstammzellnische vermittelt sind.

#### 4.1.2 mTOR Signaltransduktionsweg

Da eine alleinige Shh Inhibition nicht zu einer vollständigen Eliminierung der Tumorstammzellen ausreichte, folgte die Analyse der Aktivität des mTOR Signalweges in Tumorstammzellen. In der durchgeführten immunhistochemischen Analyse war zu sehen, dass der mTOR Signalweg nur in einem Teil der Zellen, vorzugsweise den CD133<sup>+</sup> Tumorstammzellen, aktiv ist und mit Rapamycin inhibiert werden kann.

Interessanterweise konnten Yilmaz et al. im hämatopoetischen System zeigen, dass die Deletion des Signalmoleküls Pten, das oberhalb von mTOR lokalisiert ist, zu einer Depletion normaler hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) führt und zugleich zu einer Expansion leukämie-initiiierender Stammzellen (Yilmaz, Valdez



et al. 2006). Diese Effekte waren überwiegend mTOR vermittelt, da eine Inhibition mit dem prototypischen mTOR Inhibitor Rapamycin nicht nur zur Depletion der Leukämie-induzierenden Zellen, sondern auch zu einer Erholung der normalen hämatopoetischen Stammzellfunktion führte. Das bedeutet, dass das Tumorsuppressorprotein Pten normale hämatopoetische Stammzellen von Leukämie-initiiierenden Zellen unterscheidet. Die Bedeutung der mTOR Signalkaskade konnte darüber hinaus auch für das Überleben und die Proliferation von Tumorstammzellen im Mammakarzinom unterstrichen werden (Zhou, Wulfkühle et al. 2007). Damit scheint erstmals die Identifikation und therapeutische Beeinflussbarkeit von Signalwegen möglich zu sein, die die Selbsterneuerung von normalen versus Tumor-Stammzellen innerhalb des gleichen Gewebes über unterschiedliche Mechanismen steuern. Im besten Falle würde es folglich gelingen, neue Therapien zu entwickeln, die effektiv gegen Tumorstammzellen wirken und zugleich minimale Nebenwirkungen auf die normale Stammzellpopulation haben.

Für pankreatische Tumorstammzellen konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass der Tumorstammzellanteil nach mTOR Inhibition in deutlich größerem Ausmaß als nach Shh Inhibition reduziert war. Trotzdem war aber die alleinige mTOR Inhibition nicht in der Lage, die *in vivo* Tumorigenität zu beeinflussen. Dies unterstreicht, dass in derartigen Fragestellungen die Anwendung funktioneller Versuche – wie in diesem Falle die *in vivo* Tumorigenität – von essentieller Bedeutung ist, um Rückschlüsse auf die Effektivität einer Behandlung ziehen zu können. In Abhängigkeit des eigentlichen Tumorstammzellgehalts der CD133<sup>+</sup> Population wäre zu erwarten, dass nur eine sehr dramatische oder im besten Falle vollständige Eliminierung der Tumorstammzellen einen klinischen Nutzen für die Patienten bewirken würde.

#### 4.1.3 Tumorstammzellmarker und Heterogenität der Pankreastumorzellen

Die Daten, die zur Identifizierung und Isolation von Tumorstammzellen führen, werden zumeist in Versuchen mit etablierten Tumorzelllinien gewonnen. Dies bringt jedoch wichtige Einschränkungen für die Interpretation der Ergebnisse mit sich, da es insbesondere nach mehreren Passagezyklen zu einer Adaptation der Zellen an die *in vitro* Kulturbedingungen gekommen ist und die etablierten Zelllinien dadurch möglicherweise nicht mehr ihren ursprünglichen Pendanten

entsprechen. Zudem führt allein das Aussäen der Zellen vermutlich zur Selektion von Zellen beziehungsweise Klonen, die unter den veränderten Bedingungen einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Tumorzellen haben. Aus praktischen Gesichtspunkten ist aber das Arbeiten mit gut charakterisierten Zelllinien unausweichlich, da - abgesehen von der limitierten Anzahl und Größe des Primär-gewebes - der Umgang mit Primärzellen deutlich erschwert ist (z.B. aufgrund reduzierter Viabilität nach dem Verdauungsprozess und der Isolation von Einzelzellen und unter Kulturbedingungen). Generell sollten (auch bereits vorbeschriebene) Tumorstammzellmarker nie ohne gründliche *in vivo* Validation in etablierten Pankreaszelllinien angewendet werden, da die Identifikation von Tumorstammzellen nur funktionell geschehen kann. Diese Vorgehensweise dient weniger dazu, eine Hypothese zu beweisen, als vielmehr dazu, sie zu generieren. Die Heterogenität der Tumorstammzellmarker innerhalb verschiedener Tumorentitäten ist offensichtlich (siehe Tabelle 1) und interessanterweise zum Teil sogar widersprüchlich: während CD24<sup>+</sup> beispielsweise tumorigene Pankreas-tumorzellen identifiziert (Li, Heidt et al. 2007), waren ursprünglich beim Mamma-karzinom CD24<sup>-low</sup> Zellen exklusiv tumorigen (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Die erste Markerkombination, die für Pankreastumorstammzellen beschrieben wurde, ist die Kombination der Oberflächenantigene CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> und EpCAM<sup>+</sup> (Li, Heidt et al. 2007). Allerdings verglichen die Autoren in dieser Studie die vermeintlichen Tumorstammzellen mit einer Zellpopulation, die keinen der drei Marker exprimiert. Da EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) von epithelialen Tumorzellen exprimiert wird, dürfte die Beschränkung der Kontrollgruppe auf EpCAM negative Zellen deutlich zu restriktiv sein, da es sich bei dieser Population höchstwahrscheinlich in erster Linie um nicht-epitheliale Entzündungs-, Stroma- und Gefäß(endothel)zellen handelt. Davon abgesehen führt die Kombination aus CD44 und CD24 in den meisten Pankreastumorzelllinien nicht zu einer Anreicherung der Tumorstammzellpopulation, da diese Antigene von beinahe allen Tumorzellen exprimiert werden. Eine interessante Ausnahme stellt die Zelllinie ASPC1 dar, die eine sehr kleine Fraktion CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> positiver Zellen enthält, die mit der CRG Dreifachtherapie erfolgreich eliminiert werden konnte. Eine mögliche Interpretation dieser Daten ist, dass die gleichzeitige Expression von CD44 und CD24 in bestimmten Pankreaskarzinomzelllinien auch zur Identifizierung von Tumorstammzellen genutzt werden kann. Aufgrund der

fehlenden *in vivo* Validation (subkutane oder orthotope Implantation unterschiedlicher Zellpopulationen mit exklusiver Tumorigenität) kann dies jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die Ergebnisse aber, die wir anhand des Oberflächenmoleküls CD133 für die *in vivo* passagierte Zelllinie L3.6pl und speziell für Primärzellen generieren konnten, unterstützen nachhaltig das Konzept der Tumorstammzellen und ergaben eine grosse Schnittmenge mit der von Li et al. identifizierten CD44<sup>+</sup>, CD24<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup> Population.

ALDH-1 (Aldehyddehydrogenase 1) wurde ebenfalls erfolgreich als Marker zur Identifizierung von Pankreastumorstammzellen eingesetzt (Feldmann, Dhara et al. 2007; Jimeno, Feldmann et al. 2009; Rasheed, Yang et al. 2010). Wenn die ALDH-1 Expression aber in gesundem humanen Pankreasgewebe deutlich erhöht ist, wie umfassende Untersuchungen kürzlich nahelegten (Deng, Yang et al. 2010), würde dies auch ALDH-1 als geeigneten Tumorstammzellmarker im Mensch ausschließen. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oberflächenantigen CD133 als Tumorstammzellmarker sind die in der Literatur anzutreffenden Daten ebenfalls widersprüchlich und schränken CD133 als alleinigen Marker ein. CD133 wurde 2007 von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen für Kolontumorstammzellen identifiziert (O'Brien, Pollett et al. 2007; Ricci-Vitiani, Lombardi et al. 2007). Dagegen benutzte eine andere Gruppe CD44 und EpCAM und identifizierte CD166 als zusätzlichen möglichen Tumorstammzellmarker für das Kolonkarzinom (Dalerba, Dylla et al. 2007). Shmelkov und Mitarbeiter jedoch stellten CD133 als geeigneten Marker für Kolontumorstammzellen gänzlich in Frage (Shmelkov, Butler et al. 2008). In einem transgenen Mausmodell, bei dem LacZ unter dem CD133 Promoter exprimiert wurde, wurde LacZ stark in Kolonepithel und auf allen Kolontumorzellen exprimiert - was allerdings über eine mögliche Divergenz zwischen CD133 Promoter Aktivität und Oberflächenexpression zu erklären wäre. Die Autoren folgerten daraus, dass CD133 auf Kolontumorzellen unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad exprimiert wird. Sie zeigten darüber hinaus im Widerspruch zu früheren Ergebnissen, dass CD133<sup>+</sup> Zellen nach subkutaner Implantation ebenfalls tumorigen sind. Der Ursprung dieser Zellen bleibt allerdings unklar, da alle EpCAM positiven Tumorzellen in diesen Experimenten CD133 exprimierten. Das überrascht insofern, da wir in humanem Pankreaskarzinomgewebe zwar reproduzierbar CD133 Expression finden, diese jedoch auf eine kleine Zellpopulation beschränkt ist. Diese

Population reicht von 0,5 bis 5% und der Großteil dieser Zellen exprimiert keine epithelialen Differenzierungsmarker und ist nach orthotoper Implantation exklusiv tumorigen. Daher legen diese Daten nahe, dass das murine Modell begrenzte Analogie zu humanem Pankreastumorgewebe hat.

Jüngst konnte für CD133 gezeigt werden, dass es im Laufe der Differenzierung zu einer Konformationsänderung des Moleküls kommt (Kemper, Sprick et al. 2010). Dies könnte die gegensätzlichen Ergebnisse zweier Studien hinsichtlich des CD133 Expressionsmusters erklären, die zur histologischen Beurteilung von Pankreaskarzinomen unterschiedliche CD133 Antikörper verwendeten (Immervoll, Hoem et al. 2008; Maeda, Shinchi et al. 2008). Die Differenzierung von Kolon-Tumorstammzellen führte weder zu einer Veränderung der CD133 Promotoraktivität, noch zu Unterschieden in der mRNA- oder der Proteinexpression. Selbst die Expression von CD133 auf der Zelloberfläche blieb unverändert. Die Autoren konnten jedoch eine veränderte Glykosylierung des Epitops zeigen, die zu einer Konformationsänderung dieses Oberflächenantigens führt. CD133 dürfte folglich sowohl von Tumorstammzellen, als auch von differenzierteren Tumorzellen exprimiert werden, sich aber infolge der unterschiedlichen Glykosylierung und somit in der Proteinfaltung unterscheiden. Das bedeutet, dass Tumorstammzellen zuverlässig durch den AC133 Antikörper identifiziert werden können, der dieses modifiziert glykosylierte extrazelluläre Epitop erkennt. Momentan wird der einzige kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper, der nur an diese glykosylierte Form des CD133 Antigens bindet, von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) produziert. Auch wenn mit CD133 sicherlich noch nicht der ideale Tumorstammzellmarker gefunden ist und Ergebnisse, die mit diesem Antikörper generiert werden auch weiterhin kritisch beurteilt werden sollten, gehört CD133 in verschiedenen Tumorentitäten zu den bisher erfolgreichsten Markern.

Zusammenfassend ist bisher keiner der bereits beschriebenen Marker in der Lage, eine reine Tumorstammzellpopulation zu identifizieren. Hierfür wird vermutlich die Kombination verschiedener Marker vonnöten sein, insbesondere bei der Analyse von sehr heterogenen Primärtumoren. Der Gebrauch solcher Oberflächenmarker ermöglicht aber zum einen genauere (tumor)zellbiologische Analysen und zum anderen konsistente Datensätze zur „Aufkonzentrierung“ von Tumorstammzellen. Gleichzeitig unterstreicht diese Erkenntnis einmal mehr die herausragende Bedeutung und Notwendigkeit funktioneller Assays wie die Untersuchung der

exklusiven Fähigkeit von Tumorstammzellen, Spheres *in vitro* beziehungsweise Tumoren *in vivo* zu bilden.

Die heterogene Expression bestimmter Tumorstammzell-Oberflächenproteine, die in etablierten Tumorzelllinien beschrieben wurde, zeigt sich auch bei aus primären humanen Pankreastumoren isolierten Zellen. Ein kleiner Teil der analysierten Patiententumore war entweder CD44<sup>+</sup> oder CD133<sup>+</sup> oder exprimierte keinen der beiden Marker, was verschiedene Gründe haben kann: zum einen eine zu schwache Expression der Marker, zum anderen eine Änderung des Expressionsprofils. Die Isolierung von Tumorstammzellen aus soliden Primärtumoren erfordert eine mechanische und enzymatische Dissoziation des üblicherweise stark fibrosierten Primärgewebes, und somit den Gebrauch proteolytischer Enzyme wie Trypsin, die unter Umständen manche Oberflächenantigene zerstören oder modulieren. Gerade aufgrund der geringen CD133 Expression, die wir in primärem Tumorgewebe finden, stellt dieser Arbeitsschritt eine technische Herausforderung dar.

Bedeutend könnte diese in Primärtumoren beobachtete Heterogenität aber auch, dass die Tumorstammzellhypothese kein universal gültiges Modell ist, das auf jeden einzelnen Fall angewendet werden kann: Ob ein Tumor dem Tumorstammzellkonzept folgt, könnte theoretisch davon abhängen, ob die auslösende Mutation im Stammzellkompartiment oder möglicherweise erst in weiter differenzierten Progenitorzellen stattfand.

#### 4.1.4 Side Population

Für die Side Population konnte gezeigt werden, dass sich ein Großteil ihrer Zellen im Ruhezustand befindet, der jedoch großes Proliferationspotenzial hat und Stammzeleigenschaften besitzt (Hirschmann-Jax, Foster et al. 2004). Unter anderem für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom konnte der Stammzell-Charakter der Side Population gezeigt werden (Ho, Ng et al. 2007). In der durchflusszytometrischen Untersuchung unserer Tumorzellen sahen wir nach der Kombinationstherapie CRG eine vollständige Elimination der Side Population, wodurch angenommen werden kann, dass pankreatische Tumorstammzellen getroffen wurden. Für Melanomzellen ist bekannt, dass die hoch tumorigenen Zellen ihre Chemoresistenz über die Expression des Proteins ABCB5 vermitteln und dass dieser Mediator darüber hinaus mit einem Fortschreiten der Erkrankung

korreliert (Schatton, Murphy et al. 2008). Der Hypothese, dass die Tumorstammzellen allein in der SP Fraktion enthalten sind, stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von J. Burkert entgegen, die zeigten, dass sowohl SP Zellen als auch nicht-SP Zellen in gleichem Maße tumor-initiiierende Zellen beinhalten (Burkert, Otto et al. 2008). Bei dieser Zellsubpopulation scheint es sich folglich um eine heterogene Population zu handeln, was die synonyme Verwendung der Begriffe SP Zelle und Stammzelle verbietet (Shen, Shen et al. 2008). Basierend auf der Annahme, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Marker – CD133 und die Kombination CD24/CD44 – auch keine exklusiven Tumorstammzellmarker darstellen, untersuchten wir den CRG Effekt auf die Side Population nicht, um die Tumorstammzellen in dieser Population zu beweisen, sondern vielmehr um einen starken Effekt auf Zellen zu zeigen, die nachgewiesenen Stammzelleigenschaften besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Side Population von dem Standardtherapeutikum Gemcitabin unbeeinflusst bleibt – ein Resistenzmechanismus, der sich über die in der Einleitung beschriebene Expression von Transportproteinen erklären lässt. Interessanterweise kann diese Resistenz durch zusätzliche Gabe von Cyclopamin und Rapamycin aufgehoben werden, was zu einer Eliminierung der SP führt.

Ein weiteres Problem beim Untersuchen der Side Population rührt von mechanistischer Seite her: beim Etablieren der Färbung wurde durch das Variieren der Parameter festgestellt, dass die Standardbedingungen laut Färbeprotokoll nicht für alle Tumorzelllinien geeignet sind und die Färbung äußerst anfällig für Störfaktoren ist. Die Inkubationsdauer spielt in einigen Linien eine wesentliche Rolle für die Detektierbarkeit der SP. Auch die Hoechst33342-Konzentration und der Inkubationspuffer beeinflussen die Größe der SP und deren Vitalität. Deshalb muss für jede Zelllinie das optimale Protokoll etabliert und genauestens durchgeführt werden. Dadurch sind für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen streng kontrollierte Bedingungen essentiell und die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen somit nur schwer zu interpretieren.

Des Weiteren muss festgehalten werden, dass, selbst wenn es gelingt über ein Blockieren der ABC Transporter die Tumorstammzellen einer Chemotherapie zugänglich zu machen, dies ebenfalls zu einer Sensibilisierung der normalen Stammzellen führt. Da diese die gleichen Transporter als Schutzfunktion besitzen, könnten parallel verabreichte Anti-Tumor-Medikamente zu deren vorzeitigem Tod

führen. Da ABC Transporter für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle spielen, bergen Therapieansätze, die diese Transporter blockieren, auch in dieser Hinsicht eine große Gefahr (Lou und Dean 2007). Dadurch bringt dieses neue Konzept Tumorstammzellen anzugehen unter dem aktuellen Wissensstand ein großes Risikoprofil mit sich.

#### 4.1.5 Kombinationstherapie

Dass keiner der von uns getesteten Inhibitoren eine vollständige Eliminierung der CD133<sup>+</sup> Zellen erzielte, deutet darauf hin, dass eine erfolgreiche Tumorstammzell-eliminierung die Inhibition multipler stammzellrelevanter Signalkaskaden erfordert. Die Kombination aus Shh und mTOR Signalweg-Inhibition hat jedoch nur in sehr geringem Maße die Tumorigenität beeinflusst. Überraschenderweise bewirkte die zusätzliche Gabe von Gemcitabin, das als Monotherapie keinerlei Effekt auf die Tumorigenität der Zellen hatte, einen vollständigen Verlust des tumorigenen Potenzials. Daher kann spekuliert werden, dass der Hauptwirkungsmechanismus in einem Verlust des Stammzellcharakters besteht und die Zellen in der Folge einer Therapie mit konventionellen Chemotherapeutika zugänglich gemacht werden.

Der ultimative Test neuer Behandlungsregimes bleibt die Analyse frischer primärer Patientenproben, die aus einem repräsentativen, heterogenen Patientengut stammen sollten. Auch bei frisch isolierten primären, humanen Pankreas-karzinomzellen reduzierte die CRG Tripletherapie signifikant sowohl die CD133<sup>+</sup> als auch die CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> Zellen. Zwischen den beiden jeweiligen Populationen gab es eine beträchtliche Schnittmenge, so dass weitere Untersuchungen in der Zukunft durchgeführt werden sollten, um herauszufinden, ob und welche Marker-kombination in der Lage ist, die echten Tumorstammzellen anzureichern. Die Tripletherapie hatte beachtliche Auswirkung auf die CD133<sup>+</sup> Population einiger Patienten – allerdings gab es auch Patientenzellen, bei denen der Effekt sehr schwach ausgeprägt war. Interessanterweise sahen wir in diesen Fällen eine Korrelation mit der relativen CD133<sup>+</sup> Anreicherung nach Gemcitabin-Monotherapie.

Aufgrund der heterogenen Behandlungseffekte sollten idealerweise vor einem möglichen Therapiebeginn *in vitro* Screening Untersuchungen durchgeführt werden, um den Effekt einer gezielten Tumorstammzelltherapie abschätzen zu

können. Es wäre beispielsweise vorstellbar, den hier verwendeten Tumorstammzell-Sphere-Assay mit Primärzellen durchzuführen oder Patientenzellen durchflusszytometrisch auf ihren CD133<sup>+</sup> Anteil zu analysieren. Das könnte dazu beitragen, diejenigen Patienten herauszufiltern, die von diesem neuen Behandlungsregime profitieren, und diejenigen, die keinen signifikanten Vorteil zu erwarten haben, vor unnötigen therapiebedingten Belastungen zu bewahren. Durch diese Vorgehensweise könnte die CRG Kombinationstherapie essentieller Bestandteil einer maßgeschneiderten, individuellen Therapie von Pankreaskarzinom-Patienten werden.

Die CRG Kombinationsbehandlung führte *in vitro* zu einem vollständigen Verlust des tumorigenen Potenzials, wie durch die anschließenden *in vivo* Transplantationsversuche bewiesen werden konnte. Von größter Relevanz der durchgeführten Experimente ist sicherlich, dass in Mäusen mit etablierten Pankreastumoren von kultivierten Zellen oder humanem Primärgewebe die Dreifach-Behandlung (CRG) *in vivo* zu einer Regression der Tumoren, einer Eliminierung der Tumorstammzellen und in der Folge zu einem deutlich verbesserten Langzeitüberleben führte. In Anbetracht dieser vielversprechenden präklinischen Daten stellt sich die Frage:

### **Inwieweit ist dieses Protokoll in die Klinik umsetzbar?**

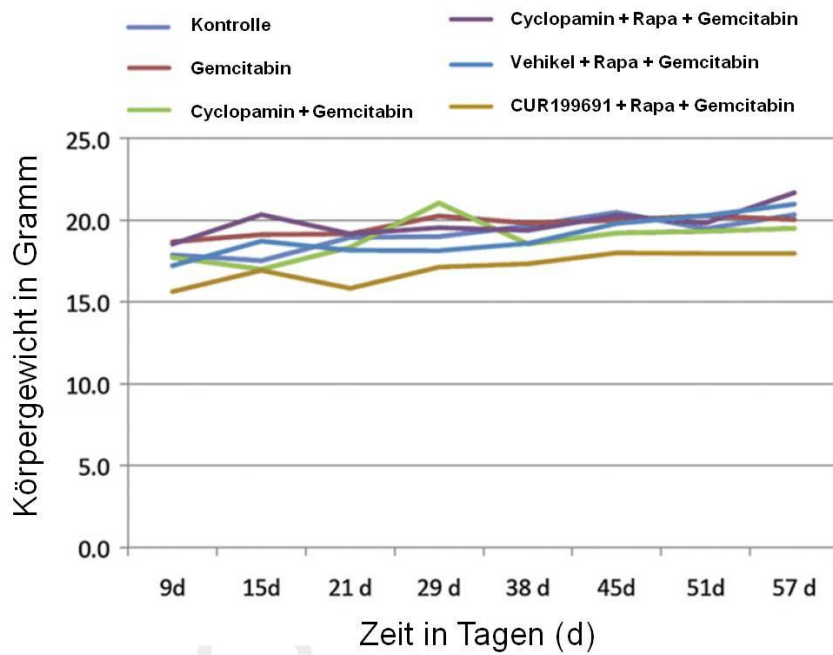
Bei der Evaluation neuer Therapien, insbesondere wenn diese an stammzellrelevanten Signalkaskaden ansetzen, muss potenziellen Nebenwirkungen besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden, da eine Beteiligung gesunder Stammzellen nicht auszuschließen ist. Während manche Organsysteme, wie beispielsweise die Leber derartige Therapien aufgrund ihres hohen regenerativen Potenzials gut tolerieren sollten, sind schwerwiegendere Effekte eher in Organen zu erwarten, die einen hohen Zellumsatz haben, der stark von der jeweiligen Stammzellpopulation abhängig ist (z. B. Haut, Dünndarm, Knochenmark). Eine der relevantesten und auch gefährlichsten unerwünschten Nebenwirkungen wäre eine Knochenmarkdepression mit konsequenter Leukopenie und damit einhergehend einem deutlich erhöhten Infektionsrisiko. Potenziell toxische Nebenwirkungen auf das Knochenmark könnten sogar bis zur Notwendigkeit einer autologen Knochenmarktransplantation führen - ähnlich wie wir das aus der Behandlung von Leukämiepatienten nach Chemotherapie-induzierter Aplasie kennen. Um möglichen Nebenwirkungen entgegenzuwirken, wendeten wir die Inhibitoren nur



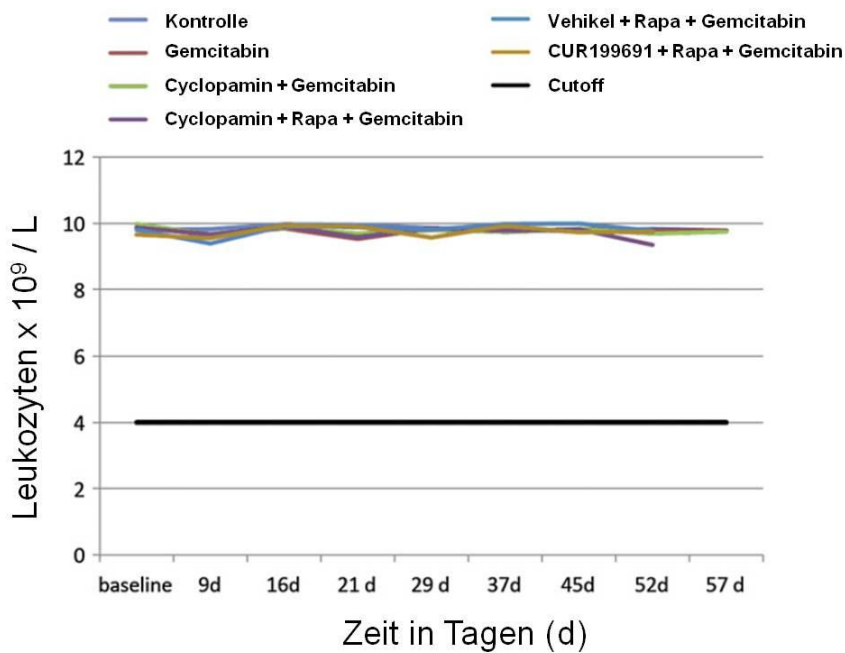
für eine Zeitspanne von 2 – 3 Wochen an. Die CRG therapierten Mäuse zeigten weder klinisch noch laborchemisch Anzeichen einer Leukopenie, was als wahrscheinlichste Nebenwirkung via Depression des hämatopoetischen Systems auftreten könnte. Allerdings verloren wir Tiere aufgrund wiederkehrender Infektionen, Kachexie, oder aus unbekanntem Gründen. Zur weiteren Überprüfung des Sicherheitsprofils wurde mittlerweile eine zusätzliche Versuchsreihe mit C57/Bl6 Wildtypmäusen durchgeführt (Lonardo, Hermann et al. 2010). Die Tiere wurden mit Cyclopamin und Rapamycin über drei Wochen behandelt und mit Gemcitabin über insgesamt sieben Wochen - jede mögliche Substanzkombination wurde getestet. Vor der Applikation der Substanzen wurden Ausgangswerte von Körpergewicht und Leukozytenzahl bestimmt und im weiteren Verlauf wöchentlich kontrolliert. Abgesehen von einem initialen Absinken der Leukozyten konnte langfristig keine Leukopenie als Zeichen einer manifesten Knochenmarkdepression festgestellt werden - auch wenn nicht vergessen werden darf, dass die Leukozytenzahl individuellen Unterschieden und kurzfristigen Änderungen unterliegt.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der die klinische Umsetzbarkeit unseres Behandlungsprotokolls unterstreicht, ist der bereits vorhandene klinische Einsatz der einzelnen Substanzen. Bei unserem vorgeschlagenen Therapieregime sind keine zeitaufwendigen und kostenintensiven Studien notwendig, was die Therapie eines Shh und eines mTOR Inhibitors zusammen mit Gemcitabin in greifbare Nähe rücken lässt.

a)



b)



**Abb. 39 Überwachung der Tripletherapie**

- a) Das Körpergewicht der Mäuse wurde wöchentlich kontrolliert und ergab keinen Anhaltspunkt für eine durch die Therapie bedingte Kachexie
- b) Ebenfalls wöchentlich kontrolliert wurde die Leukozytenzahl. Es ergab sich kein Hinweis für eine Leukopenie als Zeichen einer manifesten Knochenmarkdepression.

## 4.2 Hat das Tumorstammzellkonzept allgemeine Gültigkeit?

Außer Acht gelassen werden sollte nicht, dass die Tumorstammzellhypothese kein allgemeingültiges Modell ist. Eine mit Melanomzellen durchgeführte Forschungsarbeit aus dem Labor von Sean Morrison forderte die Tumorstammzellhypothese heraus, indem sie zeigte, dass, in Abhängigkeit des verwendeten Xenograft-Modells, jede frisch aus Patiententumoren isolierte Zelle das Potenzial hat, einen Tumor zu initiieren (Quintana, Shackleton et al. 2008). Die Autoren reproduzierten einerseits Ergebnisse, die zeigten, dass etwa eine von 50.000 Tumorzellen tumor-initiierend ist (Schatten, Murphy et al. 2008), andererseits waren die Aussagen über die Tumorigenität gegensätzlich, als verschiedene Bestandteile des ursprünglichen *in vivo* Protokolls geändert wurden: eine Verlängerung des Beobachtungszeitraumes oder eine Injektion der Zellen in Kombination mit Matrigel™ beeinflusste die Ergebnisse maßgeblich, ebenso der verwendete Mausstamm beziehungsweise dessen Ausmaß an Immunsuppression. Während die meisten vorangegangenen Studien mit T und B Zell-defizienten (NOD SCID) oder nur T Zell-defizienten (Nacktmäuse) Mäusen durchgeführt wurden, verwendeten die Autoren einen Mausstamm, dem T Zellen, B Zellen und zusätzlich auch NK Zellen (NOD/SCID Il2rg<sup>-/-</sup>) fehlen. Da diese Tiere somit über keinerlei zelluläre Immunabwehr verfügen, stellen sie extrem permissive Empfängerorganismen für die Untersuchung der tumorigenen Potenz von Tumorstammzellen dar. Basierend auf dieser Studie ziehen einige Autoren die Schlussfolgerung, dass es im Melanom keine Tumorstammzellen gibt, alle Tumorzellen (und nicht nur Tumorstammzellen) tumorigen sind und daher Angriffspunkte für neue therapeutische Entwicklungen bleiben sollten (Eaves 2008; Passegue, Rafii et al. 2009; Shackleton, Quintana et al. 2009).

Zum jetzigen Zeitpunkt besteht jedoch Unklarheit darüber, welche dieser Zellen tatsächlich in Patienten tumorigen sind. Beim malignen Melanom lassen sich trotz der neuen Datenlage qualitative Unterschiede im Hinblick auf ihre *in vivo* Tumorigenität nicht leugnen. Der Großteil der Zellen ist nur dann tumorigen, wenn ein maximal immunsupprimierter Mausstamm verwendet wird, bei dem jegliche Immunantwort auf die Tumorzellen ausgeschaltet ist. Während folglich in NOD SCID und athymischen Nacktmäusen die Anzahl tumor-initiiender Zellen möglicherweise unterschätzt wird, wird in dem NOD/SCID Il2rg<sup>-/-</sup> Mausmodell, das

Quintana et al. benutzten, das tumorigene Potenzial der untersuchten Zellen möglicherweise überschätzt.

Derartige Xenograft-Modelle sind im Allgemeinen nicht ideal, die Tumorbiologie *in vivo* zu studieren, aber derzeit die einzige Option, humane pankreatische Tumorstammzellen *in vivo* zu untersuchen. Besonders mit dem subkutanen Xenograft-Modell, bei dem *in vivo* expandiertes humanes Primärgewebe implantiert wird, stand uns ein hervorragender Versuchsaufbau zur Verfügung, der nicht nur eine Expansion des Primärgewebes gestattet, sondern sich außerdem hervorragend für Medikamentenstudien eignet. Während primäre Leukämiezellen vergleichsweise leicht zu gewinnen sind, stellen mit Blick auf das Pankreaskarzinom derartige „Tricks“ eine unverzichtbare Methode dar. Die Knappheit humaner Tumorzellen ist und bleibt ein großes Problem der Pankreaskarzinomforschung. Dies liegt darin begründet, dass das Pankreaskarzinom häufig erst im metastasierten Stadium diagnostiziert wird, was als OP-Kontraindikation angesehen wird. Die im Falle einer Operation erhaltenen Tumoren sind zudem oft stark fibrosiert und sehr klein, so dass keine für Forschungszwecke ausreichende Zahl an Tumorzellen gewonnen werden kann. Hinzu kommt die reduzierte Viabilität nach dem enzymatischen Verdauungsprozess und der Isolation von Einzelzellen und unter Kulturbedingungen.

Da sich gewisse grundlegende Limitationen in keinem Xenograft-Modell überwinden lassen, werden zunehmend genetisch veränderte Mausmodelle eingesetzt (GEMM = genetically modified mouse model). Für eine Reihe von Tumorentitäten einschließlich Leukämien (Yilmaz, Valdez et al. 2006), Mammakarzinomen (Cho, Wang et al. 2008), Tumoren des Verdauungstraktes (Zhu, Gibson et al. 2009) und Gehirntumoren (Read, Fogarty et al. 2009; Ward, Lee et al. 2009) konnte die Tumorstammzellhypothese in einem syngenem Tiermodell bekräftigt werden. Ein solches Modell bietet den unschätzbaren Vorteil, dass Tumorstammzellen in einer physiologischeren Umgebung in immunkompetenten Tieren untersucht werden können, was auch die Erforschung Antikörper-vermittelter Therapieansätze mithilfe des körpereigenen Immunsystems ermöglicht. Einer der Hauptvorteile dieser GEMM Modelle ist darüber hinaus, dass wir häufig beim Mensch vorzufindende Genmutationen, beispielsweise Kras oder p53, reproduzieren können und so auf genetischer Basis Schlüsselschritte der Krankheitsentstehung

und -progression aufdecken können (Park, Davison et al. 2008). Zugleich tritt das angesprochene Problem der Knappheit von Primärgewebe in den Hintergrund. Um auf die Frage nach der universellen Anwendbarkeit des Tumorstammzellkonzepts zurückzukommen, muss neben der Tumorentität auch in Erwägung gezogen werden, dass die Identifizierung und Charakterisierung der Tumorstammzellen in Abhängigkeit des Tumorstadiums stehen könnte. Wenn der Anteil hoch tumorigener Zellen durch symmetrische Teilung oder Blockade der Differenzierung steigt, könnte sich der hierarchische Aufbau in späteren Stadien maskieren. Damit könnte auch die Beobachtung von Quintana et al. begründet werden, die ausschließlich mit *in vivo* expandiertem Primärgewebe aus fortgeschrittenen Tumoren des Stadiums III oder IV arbeiteten und möglicherweise deshalb in Melanomzellen keinen hierarchischen Aufbau vorfanden. Im Gegensatz hierzu nämlich konnte die Tumorstammhypothese kürzlich auch für das Melanom von Boiko et al. bestätigt werden (Boiko, Razorenova et al. 2010).

Außerdem könnten bestimmte Tumoren dem 1976 von Nowell beschriebenen klonalen Evolutionsmodell folgen (Nowell 1976) oder, wie einige Autoren beispielsweise für das kolorektale Karzinom postulieren (Vermeulen, Todaro et al. 2008; Todaro, Francipane et al. 2010), als Tumorstammzellerkrankung beginnen und im weiteren Verlauf einem klonalen Evolutionsmodell folgen.

Das Tumorstammzellkonzept wirft sicherlich mehr Fragen auf, als es derzeit zu beantworten vermag. Allerdings sollte man sich im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapeutika den potenziellen praktischen Nutzen unbedingt vor Augen halten: die Zellen, die in athymischen oder NOD SCID Mäusen exklusiv tumorigen sind, zeigen eine starke Resistenz gegenüber Standardchemotherapeutika. Diese Eigenschaft macht - unabhängig davon, ob man das Konzept der Tumorstammzellen als hypothetisch erachtet oder nicht – diese tumor-initiiierenden Zellen zu einem neuen und sehr vielversprechenden Angriffsziel in der Krebstherapie.

## 5 AUSBLICK

Das Tumorstammzellkonzept stellt einen Durchbruch im Verständnis der Krebsentstehung dar und ermöglicht die Erforschung neuer Therapieoptionen. Über verschiedene Therapieansätze und deren Kombination erhofft man sich die Eliminierung der Tumorstammzellen und damit langfristig eine Regression des Tumors. Eine Sensibilisierung von chemoresistenten Tumorstammzellen ist denkbar durch Therapien, die zur Differenzierung der Tumorstammzellen führen (Gupta, Onder et al. 2009), diese über das Immunsystem angreifen (Chan, Espinosa et al. 2009; Majeti, Chao et al. 2009; Todaro, D'Asaro et al. 2009) oder wie in der vorliegenden Arbeit durch die Inhibition von Signalkaskaden Tumorstammzellen zielgerichtet eliminieren (Mueller, Hermann et al. 2009). Wir konnten erstmals zeigen, dass eine speziell gegen Tumorstammzellen gerichtete, gezielte Therapie (*targeted therapy*) zu einem signifikant verlängerten Überleben von Mäusen führt. Während hier auf den Shh und den PI3K/Akt/mTOR/STAT3 Signalweg im Pankreaskarzinom eingegangen wurde, wird dies für immer mehr Tumorentitäten und immer mehr dieser Signalkaskaden, wie beispielsweise auch den Notch oder den Wnt Signalweg, erforscht (Reya und Clevers 2005; van Es und Clevers 2005). Idealerweise würde eine Eliminierung der Tumorstammzellen nur über eine Inhibition / Ausschaltung derjenigen Signalkaskaden erfolgen, die exklusiv in Tumorstammzellen aktiviert sind und dadurch nur minimale Nebenwirkungen auf die normale Stammzellpopulation nach sich ziehen. Die besten Ergebnisse aber dürften durch eine Kombination von Stammzelltherapie und Chemotherapie erzielt werden, indem über die Chemotherapie die differenzierteren Tumorzellen zerstört werden und so die Tumoralast reduziert wird und die gezielte Stammzelltherapie zu einer Tilgung der chemoresistenten Tumorstammzellen führt. Eben diesem Konzept folgt die vorgeschlagene Tripletherapie bestehend aus einem Shh Inhibitor, einem mTOR Inhibitor und dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabin.

Um Krebspatienten bestmögliche therapeutische Optionen anbieten zu können, werden künftig weitere innovative Arbeiten zur Krebsentstehung und –behandlung unter Berücksichtigung des Tumorstammzellkonzepts notwendig sein: von herausragender Bedeutung ist es, herauszufinden, ob und welche Marker exklusiv von Tumorstammzellen exprimiert werden und die Mechanismen zu entschlüsseln, wie

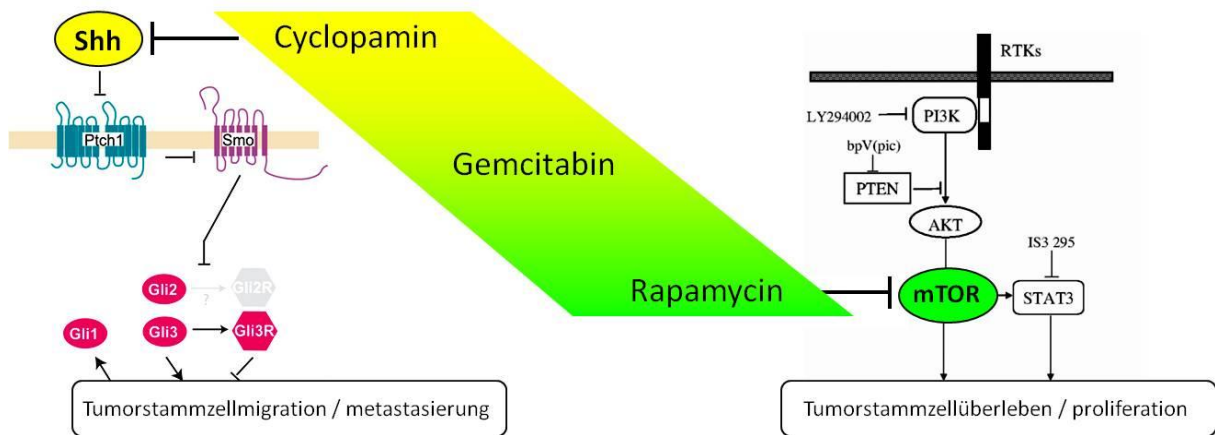
eine einzelne Tumorstammzelle einen Tumor generiert. Ebenfalls von großem Interesse bleibt nach wie vor auch die Frage nach dem Ursprung der Tumorstammzellen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In Anbetracht der nach wie vor verheerenden Prognose, der Patienten mit diagnostiziertem Pankreaskarzinom gegenüberstehen (Jemal, Siegel et al. 2008), ist die Entwicklung neuer Behandlungsansätze dringend erforderlich. Studien konnten zeigen, dass Pankreaskarzinome eine kleine Population undifferenzierter Zellen enthalten, die anhand der Expression von CD133 oder CD44/CD24 charakterisiert werden können (Hermann, Huber et al. 2007; Li, Heidt et al. 2007), die ausschließlich tumorigen sind und zudem hoch resistent gegenüber Chemotherapeutika (Hermann, Huber et al. 2007; Jimeno, Feldmann et al. 2009). Die Behandlung mit Gemcitabin führt demnach nicht zu einer Eliminierung der Tumorstammzellen, sondern vielmehr zu ihrer relativen Anreicherung, was zeigt, dass aktuelle Standardtherapeutika primär auf die differenzierteren und schnell proliferierenden Tumorzellen wirken. Daher wird, obwohl die differenzierteren Zellen Hauptbestandteil des Tumors sind, deren Auslöschung nicht zu einer Verminderung des tumorigenen Potenzials führen, welches von den Tumorstammzellen ausgeht. Die vorliegende Studie zeigt, dass eine alleinige Inhibition des Shh oder des mTOR Signalweges nicht ausreicht, den Tumorstammzell-Pool signifikant zu vermindern, eine Blockade beider Signalwege aber in Kombination mit Gemcitabin (CRG) durchaus. In der Tat führte eine Kombinationsbehandlung *in vitro* zu einem vollständigen Verlust des tumorigenen Potenzials, wie durch die anschließenden *in vivo* Transplantationsversuche bewiesen werden konnte. In Mäusen mit etablierten Pankreastumoren von kultivierten Zellen oder humanem Primärgewebe führte die Dreifach-Behandlung (CRG) *in vivo* zu einer Regression der Tumoren, einer Eliminierung der Tumorstammzellen und in der Folge zu einem deutlich verbesserten Langzeitüberleben.



Die Entwicklung einer gezielten Therapie zur Eliminierung oder Differenzierung von Tumorstammzellen ist entscheidend für eine erfolgreiche Krebstherapie



Die Kombination eines Shh Inhibitors und eines mTOR Inhibitors zusammen mit Gemcitabin kann *in vitro* und *in vivo* pankreatische Tumorstammzellen eliminieren

## 7 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christopher Heeschen danken für die Unterstützung bei diesem Projekt und die Möglichkeit, diese Promotion durchzuführen. Durch seine umfassende Betreuung führte er mich an wissenschaftliches Arbeiten heran und ermutigte stets zu selbstständigem Arbeiten und Denken. Besonderer Dank gilt ihm nicht zuletzt wegen der Tatsache, dass durch seine tatkräftige Unterstützung bei diesem Projekt mein persönliches Interesse für experimentelle Forschung geweckt worden ist, welches meinen weiteren Werdegang sicherlich beeinflussen wird.

Außerdem möchte ich allen an diesem Projekt beteiligten Personen und Kooperationspartnern danken:

der Chirurgischen Klinik Großhadern (Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl-Walther Jauch), meiner Arbeitsgruppe (Dr. Patrick-Christian Hermann, Dr. Juliane Witthauer, Dr. Stephan Huber, Simon Leicht, Theresa Schwarz, Christian Eisen, Anne Tischer, Martin Luckner), der Nuklearmedizinischen Abteilung (Dr. Mona Mustafa, Prof. Dr. Peter Bartenstein) und der Radiologischen Abteilung des Klinikums Großhadern (Dr. Frank Berger), dem Helmholtz-Zentrum (Karin Nispel, Dr. Joachim Ellwart), der Chirurgischen Abteilung des Rotkreuzklinikums (Dr. Jan D`Haese, Prof. Dr. Michael Schönberg) und dem Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid (Manuel Hidalgo, M.D., Ph.D.).

Unterstützt wurde das Projekt durch das Promotionsstudium „Systembiologische und Molekulare Medizin“ der Förderung für Forschung und Lehre der LMU München.

Das studienbegleitende Förderprogramm der Donauwörther Dr. Wolfbauer Stiftung war eine große Hilfe und Motivation im Endspurt des Studiums und für die Fertigstellung der Dissertation, weshalb ich dem Stiftungsvorstand von Herzen danken möchte.

Besonders möchte ich für die materielle wie moralische Unterstützung meinen Eltern, Waltraud und Armin Müller, danken. Weder diese Promotion noch mein erfolgreiches Studium hätte ich ohne eine derart umfangreiche Unterstützung meiner Familie durchführen können.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahlgren, J. D. (1996). "Chemotherapy for pancreatic carcinoma." Cancer **78**(3 Suppl): 654-663.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci USA **100**(7): 3983-3988.
- Almoguera, C., D. Shibata, et al. (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." Cell **53**(4): 549-554.
- am Esch, J. S., 2nd, W. T. Knoefel, et al. (2005). "Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration." Stem Cells **23**(4): 463-470.
- Amornphimoltham, P., V. Patel, et al. (2008). "A retroinhibition approach reveals a tumor cell-autonomous response to rapamycin in head and neck cancer." Cancer Res **68**(4): 1144-1153.
- Amornphimoltham, P., V. Patel, et al. (2005). "Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck." Cancer Res **65**(21): 9953-9961.
- Aoki, M., E. Blazek, et al. (2001). "A role of the kinase mTOR in cellular transformation induced by the oncoproteins P3k and Akt." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 136-141.
- Apelqvist, A., U. Ahlgren, et al. (1997). "Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas." Curr Biol **7**(10): 801-804.
- Asano, T., Y. Yao, et al. (2004). "The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells." Oncogene **23**(53): 8571-8580.
- Bader, A. G., S. Kang, et al. (2005). "Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation." Nat Rev Cancer **5**(12): 921-929.

- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature **444**(7120): 756-760.
- Bertolini, G., L. Roz, et al. (2009). "Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16281-16286.
- Binns, W., L. F. James, et al. (1963). "A Congenital Cyclopiantype Malformation in Lambs Induced by Maternal Ingestion of a Range Plant, *Veratrum Californicum*." Am J Vet Res **24**: 1164-1175.
- Binns, W., E. J. Thacker, et al. (1959). "A congenital cyclopiantype malformation in lambs." J Am Vet Med Assoc **134**(4): 180-183.
- Boiko, A. D., O. V. Razorenova, et al. (2010). "Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271." Nature **466**(7302): 133-137.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.
- Brabletz, T., A. Jung, et al. (2005). "Opinion: Migrating cancer stem cells — an integrated concept of malignant tumour progression." Nat Rev Cancer **5**(9): 744-749.
- Brand, R. E. and M. A. Tempero (1998). "Pancreatic cancer." Curr Opin Oncol **10**(4): 362-366.
- Bruce, W. R. and H. Van Der Gaag (1963). "A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo." Nature **199**: 79-80.
- Bruns, C. J., M. T. Harbison, et al. (1999). "In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice." Neoplasia **1**(1): 50-62.
- Burkert, J., W. Otto, et al. (2008). "Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells." J Pathol **214**(5): 564-573.

- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, et al. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." J Clin Oncol **15**(6): 2403-2413.
- Bussolati, B., S. Bruno, et al. (2005). "Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney." Am J Pathol **166**(2): 545-555.
- Calabrese, C., H. Poppleton, et al. (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." Cancer Cell **11**(1): 69-82.
- Chan, K. S., I. Espinosa, et al. (2009). "Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14016-14021.
- Chan, S., M. E. Scheulen, et al. (2005). "Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer." J Clin Oncol **23**(23): 5314-5322.
- Chang, S. M., P. Wen, et al. (2005). "Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme." Invest New Drugs **23**(4): 357-361.
- Chen, W. H., J. S. Horoszewicz, et al. (1982). "Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites." In Vitro **18**(1): 24-34.
- Cho, R. W., X. Wang, et al. (2008). "Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors." Stem Cells **26**(2): 364-371.
- Clarke, M., J. Dick, et al. (2006). "Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells." Cancer Research **66**(19): 9339-9344.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." Cancer Res **65**(23): 10946-10951.
- Cooper, M. K., J. A. Porter, et al. (1998). "Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling." Science **280**(5369): 1603-1607.

- Dalerba, P., R. W. Cho, et al. (2006). "Cancer Stem Cells: Models and Concepts." Annu Rev Med.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." Proc Natl Acad Sci USA **104**(24): 10158-10163.
- Deng, S., X. Yang, et al. (2010). "Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers." PLoS One **5**(4): e10277.
- Dick, J. E. (2005). "Acute myeloid leukemia stem cells." Ann N Y Acad Sci **1044**: 1-5.
- Douros, J. and M. Suffness (1981). "New antitumor substances of natural origin." Cancer Treat Rev **8**(1): 63-87.
- Doyle, L. A., W. Yang, et al. (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-15670.
- Eaves, C. J. (2008). "Cancer stem cells: Here, there, everywhere?" Nature **456**(7222): 581-582.
- Ellison, D. W., S. C. Clifford, et al. (2003). "What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma." Eur J Paediatr Neurol **7**(2): 53-66.
- Eng, C. P., S. N. Sehgal, et al. (1984). "Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors." J Antibiot (Tokyo) **37**(10): 1231-1237.
- Fan, H., A. E. Oro, et al. (1997). "Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog." Nat Med **3**(7): 788-792.
- Fang, D., T. K. Nguyen, et al. (2005). "A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas." Cancer Res **65**(20): 9328-9337.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Feldmann, G., S. Dhara, et al. (2007). "Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers." Cancer Res **67**(5): 2187-2196.

- Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Goodell, M. A., K. Brose, et al. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-1806.
- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, et al. (1997). "Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants." Science **277**(5329): 1109-1113.
- Grachtchouk, M., R. Mo, et al. (2000). "Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin." Nat Genet **24**(3): 216-217.
- Guba, M., P. von Breitenbuch, et al. (2002). "Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor." Nat Med **8**(2): 128-135.
- Gupta, P. B., T. T. Onder, et al. (2009). "Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening." Cell **138**(4): 645-659.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.
- Hedberg, M., A. Borgstrom, et al. (1998). "Survival following pancreatic carcinoma: a follow-up study of all cases recorded in Malmo, Sweden, 1977-1991." Br J Surg **85**(12): 1641-1644.
- Henne-Bruns, D., I. Vogel, et al. (1998). "Ductal adenocarcinoma of the pancreas head: survival after regional versus extended lymphadenectomy." Hepatogastroenterology **45**(21): 855-866.
- Hermann, P. C., S. L. Huber, et al. (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." Cell Stem Cell **1**(3): 313-323.
- Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, et al. (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Genes Dev **20**(10): 1218-1249.

- Hirschmann-Jax, C., A. E. Foster, et al. (2004). "A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14228-14233.
- Ho, M. M., A. V. Ng, et al. (2007). "Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells." Cancer Res **67**(10): 4827-4833.
- Huber, S., C. J. Bruns, et al. (2007). "Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis." Kidney Int.
- Huntly, B. J. and D. G. Gilliland (2005). "Cancer biology: summing up cancer stem cells." Nature **435**(7046): 1169-1170.
- Hwang-Verslues, W. W., W. H. Kuo, et al. (2009). "Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers." PLoS One **4**(12): e8377.
- Immervoll, H., D. Hoem, et al. (2008). "Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas." BMC Cancer **8**(1): 48.
- Jain, R. K. (2001). "Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy." Nat Med **7**(9): 987-989.
- Jemal, A., T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." CA Cancer J Clin **55**(1): 10-30.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-49.
- Jimeno, A., G. Feldmann, et al. (2009). "A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development." Mol Cancer Ther **8**(2): 310-314.



- Kaufman, D. S., E. T. Hanson, et al. (2001). "Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10716-10721.
- Keeler, R. F. and W. Binns (1968). "Teratogenic compounds of Veratrum californicum (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources." Teratology **1**(1): 5-10.
- Kemper, K., M. R. Sprick, et al. (2010). "The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation." Cancer Res **70**(2): 719-729.
- Kim, C., E. Jackson, et al. (2005). "Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer." Cell **121**(6): 823-835.
- Kleespies, A., G. Kohl, et al. (2005). "Vascular targeting in pancreatic cancer: the novel tubulin-binding agent ZD6126 reveals antitumor activity in primary and metastatic tumor models." Neoplasia **7**(10): 957-966.
- Lang, S. A., A. Gaumann, et al. (2007). "Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model." Int J Cancer **120**(8): 1803-1810.
- Lauth, M., A. Bergstrom, et al. (2010). "DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS." Nat Struct Mol Biol **17**(6): 718-725.
- Li, C., D. G. Heidt, et al. (2007). "Identification of pancreatic cancer stem cells." Cancer Res **67**(3): 1030-1037.
- Lin, H. and T. Schagat (1997). "Neuroblasts: a model for the asymmetric division of stem cells." Trends Genet **13**(1): 33-39.
- Lin, M. I. and W. C. Sessa (2004). "Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity." Cancer Cell **6**(6): 529-531.
- Liu, G., X. Yuan, et al. (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." Mol Cancer **5**: 67.

- Lonardo, E., P. C. Hermann, et al. (2010). "Pancreatic cancer stem cells - update and future perspectives." Mol Oncol.
- Lou, H. and M. Dean (2007). "Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters." Oncogene **26**(9): 1357-1360.
- Ma, S., K. Chan, et al. (2007). "Identification and Characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem/Progenitor Cells." Gastroenterology **132**(7): 2542-2556.
- Ma, S., T. K. Lee, et al. (2007). "CD133(+) HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway." Oncogene.
- Maeda, S., H. Shintani, et al. (2008). "CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer." Br J Cancer **98**(8): 1389-1397.
- Majeti, R., M. P. Chao, et al. (2009). "CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells." Cell **138**(2): 286-299.
- Marigo, V., R. A. Davey, et al. (1996). "Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor." Nature **384**(6605): 176-179.
- Matano, E., P. Tagliaferri, et al. (2000). "Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study." Br J Cancer **82**(11): 1772-1775.
- Maw, M. A., D. Corbeil, et al. (2000). "A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration." Hum Mol Genet **9**(1): 27-34.
- Mcdonald, S., S. Preston, et al. (2006). "Mechanisms of Disease: from stem cells to colorectal cancer." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **3**(5): 267-274.
- Miki, J., B. Furusato, et al. (2007). "Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens." Cancer Res **67**(7): 3153-3161.

- Miraglia, S., W. Godfrey, et al. (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." Blood **90**(12): 5013-5021.
- Moore, M. J., D. Goldstein, et al. (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." J Clin Oncol **25**(15): 1960-1966.
- Morton, J. P., M. E. Mongeau, et al. (2007). "Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5103-5108.
- Mueller, M. T., P. C. Hermann, et al. (2009). "Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer." Gastroenterology **137**(3): 1102-1113.
- Nilsson, M., A. B. Unden, et al. (2000). "Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3438-3443.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." Nature **445**(7123): 106-110.
- Oro, A. E., K. M. Higgins, et al. (1997). "Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog." Science **276**(5313): 817-821.
- Pardal, R., M. F. Clarke, et al. (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." Nat Rev Cancer **3**(12): 895-902.
- Park, C. H., D. E. Bergsagel, et al. (1971). "Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay." J Natl Cancer Inst **46**(2): 411-422.
- Park, S. W., J. M. Davison, et al. (2008). "Oncogenic KRAS induces progenitor cell expansion and malignant transformation in zebrafish exocrine pancreas." Gastroenterology **134**(7): 2080-2090.

- Pasca di Magliano, M., S. Sekine, et al. (2006). "Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer." Genes Dev **20**(22): 3161-3173.
- Passegue, E., S. Rafii, et al. (2009). "Cancer stem cells are everywhere." Nat Med **15**(1): 23.
- Pathi, S., S. Pagan-Westphal, et al. (2001). "Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog." Mech Dev **106**(1-2): 107-117.
- Pece, S., D. Tosoni, et al. (2010). "Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content." Cell **140**(1): 62-73.
- Phillips, T. M., W. H. McBride, et al. (2006). "The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation." J Natl Cancer Inst **98**(24): 1777-1785.
- Pompilio, G., G. Steinhoff, et al. (2008). "Direct minimally invasive intramyocardial injection of bone marrow-derived AC133+ stem cells in patients with refractory ischemia: preliminary results." Thorac Cardiovasc Surg **56**(2): 71-76.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." Nature **456**(7222): 593-598.
- Rasheed, Z. A., J. Yang, et al. (2010). "Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma." J Natl Cancer Inst **102**(5): 340-351.
- Read, T. A., M. P. Fogarty, et al. (2009). "Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma." Cancer Cell **15**(2): 135-147.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**(7035): 843-850.
- Ricci-Vitiani, L., D. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." Nature **445**(7123): 111-115.
- Rosewicz, S. and B. Wiedenmann (1997). "Pancreatic carcinoma." Lancet **349**(9050): 485-489.

- Rothenberg, M. L., J. L. Abbruzzese, et al. (1996). "A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic carcinoma." Cancer **78**(3 Suppl): 627-632.
- Rothenberg, M. L., M. J. Moore, et al. (1996). "A phase II trial of gemcitabine in patients with 5-FU-refractory pancreas cancer." Ann Oncol **7**(4): 347-353.
- Rubio-Viqueira, B., A. Jimeno, et al. (2006). "An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **12**(15): 4652-4661.
- Rudin, C. M., C. L. Hann, et al. (2009). "Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449." N Engl J Med **361**(12): 1173-1178.
- Ruiz i Altaba, A. (1999). "The works of GLI and the power of hedgehog." Nat Cell Biol **1**(6): E147-148.
- Schatton, T., G. Murphy, et al. (2008). "Identification of cells initiating human melanomas." Nature **451**(7176): 345-349.
- Sehgal, S. N., H. Baker, et al. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 727-732.
- Shackleton, M., E. Quintana, et al. (2009). "Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution." Cell **138**(5): 822-829.
- Shen, G., F. Shen, et al. (2008). "Identification of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line and the limitation of current identification methods." In Vitro Cell Dev Biol Anim **44**(7): 280-289.
- Shmelkov, S., J. Butler, et al. (2008). "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors." J. Clin. Invest.: 14.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res **63**(18): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.

- Son, M. J., K. Woolard, et al. (2009). "SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma." Cell Stem Cell **4**(5): 440-452.
- Stamm, C., H. D. Kleine, et al. (2007). "Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies." J Thorac Cardiovasc Surg **133**(3): 717-725.
- Stone, D. M., M. Hynes, et al. (1996). "The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog." Nature **384**(6605): 129-134.
- Tan, M. H. and T. M. Chu (1985). "Characterization of the tumorigenic and metastatic properties of a human pancreatic tumor cell line (AsPC-1) implanted orthotopically into nude mice." Tumour Biol **6**(1): 89-98.
- Taylor, M. D., L. Liu, et al. (2002). "Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma." Nat Genet **31**(3): 306-310.
- Tee, A. R. and J. Blenis (2005). "mTOR, translational control and human disease." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 29-37.
- Thayer, S. P., M. P. di Magliano, et al. (2003). "Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis." Nature **425**(6960): 851-856.
- Tian, H., C. A. Callahan, et al. (2009). "Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4254-4259.
- Todaro, M., M. Alea, et al. (2007). "Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4." Cell Stem Cell **1**(4): 389-402.
- Todaro, M., M. D'Asaro, et al. (2009). "Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes." J Immunol **182**(11): 7287-7296.
- Todaro, M., M. G. Francipane, et al. (2010). "Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy." Gastroenterology **138**(6): 2151-2162.

- Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14720-14725.
- van Es, J. H. and H. Clevers (2005). "Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease." Trends Mol Med **11**(11): 496-502.
- Vermeulen, L., M. Todaro, et al. (2008). "Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(36): 13427-13432.
- Veizina, C., A. Kudelski, et al. (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 721-726.
- Vicente-Duenas, C., J. Gutierrez de Diego, et al. (2009). "The role of cellular plasticity in cancer development." Curr Med Chem **16**(28): 3676-3685.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." Nat Rev Cancer **8**(10): 755-768.
- von Hoff, D. (2008). GDC-0449 in metastatic basal cell carcinoma. Presented at: Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; April 12 - 16, 2008. San Diego, CA.
- Von Hoff, D. D., P. M. LoRusso, et al. (2009). "Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma." N Engl J Med **361**(12): 1164-1172.
- Wanebo, H. J. and M. P. Vezeridis (1996). "Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge." Cancer **78**(3 Suppl): 580-591.
- Ward, R. J., L. Lee, et al. (2009). "Multipotent CD15+ cancer stem cells in patched-1-deficient mouse medulloblastoma." Cancer Res **69**(11): 4682-4690.
- Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992). "Pancreatic carcinoma." N Engl J Med **326**(7): 455-465.

- Watkins, D. N., D. M. Berman, et al. (2003). "Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer." Nature **422**(6929): 313-317.
- Weissman, I. L. (2000). "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." Cell **100**(1): 157-168.
- Welch, S. A. and M. J. Moore (2007). "Erlotinib: success of a molecularly targeted agent for the treatment of advanced pancreatic cancer." Future Oncol **3**(3): 247-254.
- Williams, J. A., O. M. Guicherit, et al. (2003). "Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4616-4621.
- Wright, M. H., A. M. Calcagno, et al. (2008). "Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics." Breast Cancer Res **10**(1): R10.
- Yang, Z. F., D. W. Ho, et al. (2008). "Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer." Cancer Cell **13**(2): 153-166.
- Yauch, R. L., S. E. Gould, et al. (2008). "A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer." Nature **455**(7211): 406-410.
- Yerebakan, C., A. Kaminski, et al. (2007). "Safety of intramyocardial stem cell therapy for the ischemic myocardium: results of the Rostock trial after 5-year follow-up." Cell Transplant **16**(9): 935-940.
- Yilmaz, Ö., R. Valdez, et al. (2006). "Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells." Nature **441**(7092): 475-482.
- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood **90**(12): 5002-5012.
- Yin, S., J. Li, et al. (2007). "CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity." Int J Cancer **120**(7): 1444-1450.



- Zardawi, S. J., S. A. O'Toole, et al. (2009). "Dysregulation of Hedgehog, Wnt and Notch signalling pathways in breast cancer." Histol Histopathol **24**(3): 385-398.
- Zhao, C., A. Chen, et al. (2009). "Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia." Nature.
- Zhou, J., J. Wulfschlegel, et al. (2007). "Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16158-16163.
- Zhu, L., P. Gibson, et al. (2009). "Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation." Nature **457**(7229): 603-607.