

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und
Transplantationschirurgie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

Die Rolle von LGR6 in der Genese des humanen duktalen Pankreaskarzinoms (PDAC)

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniel Härtwig
aus Erfurt

2019

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Jens Werner

Mitberichterstatterinnen: PD Dr. Constanze H. Wagnershauser
Prof. Dr. Julia Mayerle

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Matthias Ilmer
Prof. Dr. Alexandr Bazhin

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Richard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2019

Sapere aude.

Habe Mut, dich deines eigenen Verstandes zu bedienen

Emanuel Kant

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2 Klinische Präsentation.....	2
1.1.3 Diagnostische Untersuchungen.....	3
1.1.4 Therapeutische Optionen.....	4
1.2 Stammzellen	7
1.2.1 Adulte Stammzellen.....	7
1.2.2 Die Stammzellnische.....	9
1.2.3 Krebsstammzellen.....	11
1.3 Der Wnt-Signalweg	13
1.3.1 LGR-RSPO in der Wnt-Signaltransduktion.....	15
1.3.1.1 LGR6-Struktur.....	17
1.3.2 Wnt-Signaltransduktion im duktalem Pankreaskarzinom.....	20
1.4 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Materialien und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Geräte und Zubehör.....	22
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.4 Fertigungssysteme (Kits).....	26
2.1.5 Größenstandards (Marker).....	26
2.1.6 Primer.....	27
2.1.6.1 Selbstkonzipierte Primer.....	28
2.1.7 Antikörper.....	28
2.1.8 Zelllinien.....	29
2.1.9 Software.....	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur.....	30
2.2.2 RNA-Analysen.....	33

2.2.3 Protein-Analysen.....	41
2.2.4 Statistik.....	53
3. Ergebnisse.....	54
3.1 mRNA-Expressionsanalysen in Zelllinien des dukta-	
 Pankreaskarzinoms.....	54
3.1.1 ZEB1 Expression und Charakterisierung von PDAC.....	56
3.1.2 Wnt-Zielgen-Expression in PDAC.....	57
3.1.3 mRNA-Expression von RSPO in PDAC-Zelllinien.....	59
3.1.4 mRNA-Expression von LGR in PDAC-Zelllinien.....	61
3.1.4.1 LGR6 mRNA-Expression.....	63
3.1.4.2 LGR6 Splice-Variantenanalyse.....	64
3.1.5 Einfluss von RSPO2 auf die Genexpression von RSPO1/4 und	
LGR6.....	68
3.2 Proteinanalysen in dukta-	
 Pankreaskarzinomzellen.....	70
3.2.1 RSPO-Konzentrationsbestimmungen.....	70
3.2.2 Durchflusszytometrische Analysen von LGR4 und LGR6.....	73
3.2.3 Nachweis von LGR6 in Pankreaskarzinomzellen mittels	
Western-Blot.....	77
3.2.4 Untersuchung der Lokalisation von LGR6 in dukta-	
Pankreaskarzinomzellen.....	79
3.3 Einfluss von Gemcitabin auf den RSPO/LGR-Komplex.....	82
3.3.1 Einfluss von Gemcitabin auf die RSPO1/4-Expression.....	82
3.3.2 Einfluss von Gemcitabin auf die LGR4/6-Expression.....	84
4. Diskussion.....	86
4.1 Charakterisierungen der PDAC-Zelllinien.....	86
4.2 RSPO in dukta-	
Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	87
4.3 LGR in dukta-	
Pankreaskarzinom-Zelllinien.....	90
4.3.1 LGR6 in PDAC.....	92
4.4 RSPO2-Stimulationsversuche.....	95
4.5 Expression des RSPO-LGR-Komplexes nach	
Gemcitabinbehandlung.....	96
4.5.1 RSPO unter Gemcitabin.....	96
4.5.2 LGR4/6 unter Gemcitabinbehandlung.....	97
4.6 Ausblick.....	98
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	102

Danksagung..... 110

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein verwendete Abkürzungen

A.	Arteria
BAR	β-Catenin aktivierter Reportertest
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA 19-9	Carbohydrat-Antigen 19-9
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CEA	Carcinoembryonic-Antigen
CSC	Krebsstammzellen (<i>Cancer stem cells</i>)
CT	Computertomografie
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DNA	Desoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERCP	Endoskopische retrograde Cholangiopankreatikografie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAMMMPC-Syndrom	Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Pankreaskarzinom-Syndrom
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FOLFIRINOX	Fluoruracil + Folinsäure + Irinotecan + Oxaliplatin
FPC	Familiäres Pankreaskarzinom
FSHR	Follikel-Stimulierender Hormon-Rezeptor
FU-1/FU-2	Furin-Like Cystein-Rich Domain 1 und 2
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
γGT	Gamma-Gluamyltransferase
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
LDL	Low-Density Lipoprotein
LGR	Leucin-Rich-Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptors
LHR	Luteinisierender Hormon-Rezeptor
LRR	Leucin-Rich-Repeat
mA	Milliampere
min.	Minute
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
MRCP	Magnetresonanzcholangiopankreatikografie
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
nab	Albumin-Nanopartikel

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
PanIN	Intraepitheliale Neoplasien im Pankreas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PDAC	Duktales Pankreaskarzinom
RNF43	Ring Finger Protein 43
RNA	Ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RSPO	R-Spondin
sog.	sogenannt
SHH	<i>Sonic-Hedgehog</i>
TSHR	Thyroid-stimulierender Hormon-Rezeptor
TSR-1	Thrombospondin-Type1-Repeat
V.	Vena
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZNRF3	Zinc and Ring Finger 3

Abkürzungen für die Komponenten des Wnt-Signalweges

APC	Adenomatosis Polyposis Coli
CK1	Casein Kinase
Dsh	<i>dishevelled</i>
Fzd	<i>Frizzled</i> Rezeptor
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor related protein 5/6
Tcf/Lef	T-Cell factor/lymphoid enhancer binding factor
Wnt	Wingless und integrated-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Stammzeleigenschaften.....	7
Abbildung 1.2: Darstellung der Stammzellnische.....	10
Abbildung 1.3: Vergleich der Krebsstammzell-Theorie mit der klonalen Krebsentstehung.....	12
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Wnt-Signaltransduktion.....	13
Abbildung 1.5: LGR6 Struktur.....	17
Abbildung 1.6: RSPO-LGR-Komplex in der Wnt-Signaltransduktion.....	19
Abbildung 2.1: Neubauer-Zählkammer.....	32
Abbildung 2.2: Sandwich-ELISA.....	44
Abbildung 3.1: Agarosegelelektrophorese der qPCR Produkte.....	54
Abbildung 3.2: Qualitätskontrolle der qRT-PCR.....	55
Abbildung 3.3: Zellmorphologische Unterteilung mit Hilfe von ZEB1.....	56
Abbildung 3.4: Wnt-Zielgen Expression in duktafen Pankreaskarzinomzellen.....	57
Abbildung 3.5: RSPO Expression auf mRNA-Ebene.....	59
Abbildung 3.6: LGR-Expression auf mRNA-Ebene.....	61
Abbildung 3.7: mRNA Expressionsunterschiede von LGR6.....	63
Abbildung 3.8: Überprüfung der konzipierten Primer in der qRT-PCR.....	64
Abbildung 3.9: Vergleich selbst entworfener Primer mit Primern der Firma Qiagen.....	65
Abbildung 3.10: LGR6 Splicevarianten-Analyse.....	66
Abbildung 3.11: Wnt-abhängige RSPO1/4 und LGR6 Genexpression.....	68
Abbildung 3.12: Intrazelluläre RSPO Expression.....	70-71
Abbildung 3.13: RSPO-Nachweis im Zellüberstand.....	72
Abbildung 3.14: 7-AAD-Lebendfärbung in PDAC-Zellen.....	73
Abbildung 3.15: Durchflusszytometrie der LGR6-Oberflächenfärbung in PDAC-Zellen.....	74-75
Abbildung 3.16: Western-Blot von LGR 6.....	78
Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreaskarzinomzellen für LGR6.....	79
Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreaskarzinomzellen für LGR6 und Golgin-97.....	81
Abbildung 3.19: Expression von RSPO1 und RSPO4 nach Gemcitabinbehandlung.....	83
Abbildung 3.20: Expression von LGR6 nach Gemcitabinbehandlung.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Reagenzien und Volumina für den DNA-Verdau.....	34
Tabelle 2.2: Reagenzien und Volumina für die Reverse Transkription.....	35
Tabelle 2.3: Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription.....	35
Tabelle 2.4: Reagenzien und Volumina für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
Tabelle 2.5: Reaktionsprotokoll der qPCR.....	37
Tabelle 2.6: Reaktionsprotokoll der Real- Time PCR.....	39
Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines 10x Laufpuffers.....	48
Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE.....	48
Tabelle 2.9: Zusammensetzung eines 10x Transferpuffers.....	49
Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Wnt-Zielgenexpression.....	58
Tabelle 3.2: Zusammenfassung der RSPO Expression.....	60
Tabelle 3.3: Zusammenfassung der LGR Expression.....	62

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom, ein bösartiger Tumor der Bauchspeicheldrüse, ist eine hochgradig letal verlaufende Erkrankung mit einer überaus schlechten Prognose, durch die annähernd vergleichbare Mortalität und Inzidenz. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Diagnose in der Regel erst in sehr späten Stadien gestellt wird. Die meisten Patienten sind, bis sich die Krankheit zu einer fortgeschrittenen Stufe entwickelt, asymptomatisch [1]. Das Pankreas besitzt sowohl endokrine (Hormone, z.B. Insulinproduktion) als auch exokrine (Verdauungsenzyme) Funktionen. Der exokrine Teil ist anfällig für drei wichtige Erkrankungen: akute Pankreatitis, chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom [2]. Üblicherweise ist mit dem Pankreaskarzinom das Adenokarzinom des exokrinen Pankreas gemeint, welches mit etwa 85% aller Pankreaskarzinome die häufigste Entität darstellt.

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Am Pankreaskarzinom erkrankten 2012 in Deutschland 8.480 Frauen und 8250 Männer. Damit ist das duktales Karzinom des Pankreas mit etwa 16.700 Neuerkrankungen ein häufiger Tumor des Gastrointestinaltrakts. Für 2016 wurde die Zahl der Menschen, die am Pankreaskarzinom erkranken, auf etwa 18.500 vorhergesagt. Die meisten Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 60 und 80 Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei etwa 75 Jahren für Frauen und für Männer bei etwa 71 Jahren [3]. Als gesicherte Risikofaktoren gelten neben Tabakkonsum und starkem Übergewicht (Adipositas) auch Diabetes mellitus Typ 2. Weiterhin sind als nicht gesicherte Risikofaktoren ein hoher Konsum von verarbeiteten Fleischwaren, der Verzehr von geräucherten oder gegrillten Speisen sowie ein hoher Alkoholkonsum von Bedeutung. Eine chronische Pankreatitis erhöht ebenfalls das Risiko für ein Pankreaskarzinom. Bei einem geringen Prozentsatz (1-3%) dieser Patienten besteht ein sogenanntes familiäres Pankreaskarzinom. Man spricht davon, wenn mindestens zwei Verwandte ersten Grades an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind und das Vorliegen anderer mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko verbundener Syndrome ausgeschlossen ist [4]. Zu den genetischen Prädispositionen gehören neben dem genannten familiären Pankreaskarzinom (FPC), das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-

1. Einleitung

Pankreaskarzinom-Syndrom (*FAMMMPC-Syndrom*), Peutz-Jeghers-Syndrom, hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom, familiäre adenomatöse Polyposis (*FAP*), hereditäre Pankreatitis, hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom (*HNPCC*) sowie Ataxia teleangiectasia [5]. Inwiefern Umweltfaktoren und beruflich bedingte Schadstoffexpositionen in der Pankreaskarzinomentstehung eine Rolle spielen, konnte bislang nicht eindeutig belegt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag in Deutschland in den Jahren 2011-2012 für Frauen bei 8%, für Männer bei 7%. Das Pankreaskarzinom weist damit die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen auf und ist aktuell die vierthäufigste Krebstodesursache [3].

1.1.2 Klinische Präsentation, Zeichen und Symptome

Die Inzidenz und Mortalität stehen sinnbildlich für die ungünstige Prognose. Die hohe Mortalität resultiert vor allem aus dem besonders aggressiven Tumorwachstum mit frühzeitiger lymphogener und hämatogener Metastasierung. Hinzu kommen weitgehend fehlende, charakteristische Frühsymptome. Laut einer groß angelegten Fall-Kontroll-Studie, welche das Auftreten frühzeitiger Symptome bei Pankreaskarzinom verglich, sind zwölf Alarmsymptome mit Pankreaskarzinomen assoziiert: Gewichtsverlust, Bauchschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Meteorismus, Dyspepsie, neu aufgetretener Diabetes, Verdauungsstörungen (Steatorrhoe), Pruritis (Juckreiz), Lethargie, Rückenschmerzen, Schulterschmerzen und Ikterus [6]. Die klinischen Zeichen präsentieren sich als unspezifische Frühsymptome und erschweren die Früherkennung dieser Erkrankung. Abhängig von der Lokalisation des Karzinoms können unterschiedliche Hauptsymptome differenziert werden. Ein Großteil der Pankreaskarzinome entsteht im Bereich des Pankreaskopfes und manifestiert sich oftmals als schmerzloser Verschlussikterus. Dabei sind ausstrahlende Schmerzen in den Rücken häufig und sind bereits Symptom einer retroperitonealen Tumordinfiltration. Tumoren des Korpus- oder Kaudabereichs zeigen hingegen spät Symptome, wie persistierende Oberbauch- und Rückenbeschwerden. Ein neu aufgetretener Diabetes mellitus kann ebenfalls ein Zeichen eines Pankreaskarzinoms in diesem Bereich sein [4].

1.1.3 Diagnostische Untersuchungen

Zur Abklärung eines Pankreaskarzinoms stehen verschiedene diagnostische Mittel zur Verfügung. Den ersten Schritt stellen die Bestimmung laborchemischer Parameter und die abdominelle Sonografie dar. Die wichtigsten Laborparameter bestehen aus Amylase, Lipase, alkalische Phosphatase, γ GT, Bilirubin, Transaminasen, Hämoglobin und Tumormarkern wie Carbohydrat-Antigen (CA) 19-9 und Carcinoembryonic Antigen (CEA). Die diagnostische Aussagekraft der Sonografie hängt stark von der Erfahrung und dem Können des Untersuchers sowie der körperlichen Konstitution des Patienten ab. Sie erlaubt neben dem Nachweis des Tumors auch die Feststellung einer möglichen Lebermetastasierung und dem Vorliegen von Aszites. Studien haben gezeigt, dass sich die Sensitivität der Sonografie und der kontrastverstärkten Sonografie von der in der Computertomografie (CT) nur wenig unterscheidet. Besonders kleine bis mittelgroße Läsionen werden von der kontrastverstärkten Sonografie mit einer höheren Sensitivität erfasst [7]. Das CT mit Kontrastmittelapplikation ist nach wie vor die am häufigsten verwendete bildgebende Untersuchung zur Erkennung von Pankreaskarzinomen und deren Stadieneinteilung [8]. Die Kontrastmittel-CT zählt zur Standarddiagnostik suspekter Pankreasläsionen, Einschätzung von Resektabilität und vaskulärer Invasion sowie der Feststellung metastatischer Absiedelungen [1]. Neben dem CT zählen Magnetresonanztomografie (MRT) und die ^{18}F -Fluorodesoxyglukose Positronen-Emissions-Tomografie (PET) mit CT zum erweiterten Kreis diagnostischer Optionen. Untersuchungen haben gezeigt, dass das MRT eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität gegenüber dem CT aufweist [9] und PET-CTs keine offensichtlichen Vorteile gegenüber anderen diagnostischen Methoden bieten [10].

Bei eindeutigem Malignitätsverdacht sind weitere Untersuchungen nicht notwendig. Bei unklaren Fällen ist eine Darstellung des Gallen- und Pankreasgangsystems mit Hilfe einer endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikografie (ERCP) oder Magnetresonanztomografie (MRCP) notwendig. Diese Methoden stoßen häufig durch äußere Verlegung der Gallenwege an ihre diagnostischen Grenzen [4]. Die Endosonografie bietet eine erwähnenswerte diagnostische Methode. Verschiedene Studien zeigten nicht nur eine überlegene Sensitivität, sie demonstrierten auch eine Alternative zum CT [11, 12]. Durch sonografisch gesteuerte Feinnadelaspirationen können Gewebeproben entnommen werden und erweitern so das Spektrum dieser Methode. Im Hinblick auf histologische Probenentnahmen und kürzlich entwickelte Techniken zur Detektion von Mutationen und Chemosensitivitätstestungen wird diese Methode in Zukunft mehr Aufmerksamkeit erregen [1].

1.1.4 Therapeutische Optionen

Die Behandlung des Pankreaskarzinoms erfordert einen multidisziplinären Ansatz, der chirurgische Verfahren, Chemotherapie, Strahlentherapie und palliative Maßnahmen beinhaltet.

1.1.4.1 Chirurgische Verfahren

Das duktales Pankreaskarzinom (PDAC) gehört zu den aggressivsten Tumoren mit niedrigen Überlebensraten. Über 80% der Tumoren sind bei Diagnose bereits nicht mehr operabel, lediglich die verbleibenden 20% haben kuratives Potenzial. Die chirurgische Resektion ist die einzige kurative Therapie und verlängert signifikant das Überleben im Vergleich zu anderen Therapien [13]. In großen Zentren konnte die perioperative Sterblichkeit mittlerweile auf annähernd 3% gesenkt werden, in den 1980er Jahren betrug sie noch 20% [14, 15]. Pankreaskarzinome ohne Fernmetastasierung können in drei Kategorien nach ihrer lokalen Ausbreitung eingeteilt werden: resektabel, grenzwertig resektabel (sog. „*borderline resectable*“) und lokal fortgeschritten. Die Definitionen dieser Kategorien sind nicht einheitlich. Die Kriterien der *borderline* Resektabilität beinhalten das Fehlen von Fernmetastasen, Infiltration der V. mesenterica superior, V. portae und/-oder gastroduodener Arterieneinschlüsse bis zur A. hepatica bzw. des Truncus coeliacus und einen Tumorbefall der A. mesenterica superior von weniger als 180° des Gefäßumfangs [16].

Die chirurgische Behandlung eines Pankreaskopfkarzinoms kann mittels pyloruserhaltender partieller Duodenopankreatektomie oder ohne Erhalt des Pylorus (Kausch-Whipple-Operation) reseziert werden. Karzinome im Korpus- oder Kaudabereich werden durch distale Pankreatektomie mit Splenektomie (sog. Linksresektion) operiert. Bei einem Befall der Resektionsränder kann eine erweiterte Resektion bis zur totalen Pankreatektomie erfolgen. Das Ziel ist ein tumorfreier Resektionsrand (R0), dieser wird intraoperativ mit Hilfe einer Schnellschnittuntersuchung sichergestellt. Die R0-Resektion führt nachweislich zu signifikant besseren Prognosen. Diese werden jedoch nur in 36% der Fälle erreicht [17]. Eine lang angelegte Studie aus dem Jahr 2004 zeigte, dass die 5-Jahresüberlebensraten nach R0-Resektion 24,2% betrug, demgegenüber lag die Rate nicht kurativ resezierter Patienten bei 4,3% [18].

1.1.4.2 Chemotherapie

Eine der wichtigsten Säulen in der Behandlung des metastasierten und lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms ist eine Chemotherapie. Wird diese unmittelbar bei Diagnose begonnen, kann das Patientenüberleben verlängert und die Lebensqualität verbessert werden [19]. Zum Einsatz kommen das Nukleosid-Analogon Gemcitabin plus den EGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib. Alternativ dazu steht eine Therapie nach dem FOLFIRINOX-Schema zur Verfügung, einer Mischung aus Fluorouracil, Folsäure, Irinotecan und Oxaliplatin. Vor Einführung des intensivierten Therapieprotokolls FOLFIRINOX und der Kombination aus Gemcitabin und Erlotinib war die Gemcitabin-Monotherapie der alleinige Standard in der Therapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms. Die Grundlage für den Einsatz von Gemcitabin lieferte die Studie von Burris et al. von 1997, in welcher Gemcitabin mit der Gabe von 5-Fluorouracil (5-FU) verglichen wurde. Es zeigte sich, dass mit Gemcitabin behandelte Patienten neben einem signifikant verlängerten medianen Überleben (5,65 gegen 4,41 Monate) auch einen erheblichen klinischen Vorteil hatten. Das Gesamtüberleben im Gemcitabin-Arm lag nach einem Jahr bei 18% [20]. Durch die Kombination mit Erlotinib stieg das 1-Jahres-Überleben auf 24% [21] und führte als erste zielgerichtete Substanz, zusammen mit Gemcitabin, zur statistisch signifikanten, jedoch klinisch moderaten Verlängerung des Gesamtüberlebens. Mit dem FOLFIRINOX-Protokoll und der Kombination aus Gemcitabin plus nab-Paclitaxel stehen heute zwei wirksamere Therapien für bestimmte Patientengruppen zur Verfügung. Eine neuere Option mit hoher Effektivität und akzeptabler Toxizität ist die Kombination von nab-Paclitaxel mit Gemcitabin. Albumin-Nanopartikel verbunden mit Paclitaxel sollen die Verweildauer des Zytostatikums am Wirkungsort verlängern [22]. Die Kombination mit nab-Paclitaxel stellt durch ein deutlich verlängertes progressionsfreies Gesamtüberleben (8,5 gegen 6,7 Monate) eine neue palliative Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit gutem Allgemeinzustand dar. Für die FOLFIRINOX-Therapie wurde ein signifikanter Überlebensvorteil im Vergleich zu Gemcitabin gezeigt (medianes Überleben 11,1 gegen 6,8 Monate). Aufgrund der höheren Toxizität gegenüber Gemcitabin können nur Patienten bis zu 75 Jahren, in sehr gutem Allgemeinzustand und ohne Cholestase (Gallenstau) eingeschlossen werden [23]. Zusammenfassend sind Kombinationschemotherapien wie FOLFIRINOX oder Gemcitabin mit nab-Paclitaxel einer Monotherapie mit Gemcitabin in der Erstlinientherapie überlegen. Bei Therapieprogress unter Gemcitabin wird empfohlen auf eine Zweitlinientherapie mit 5-FU und Oxaliplatin zu wechseln [24]. Nach Therapieversagen des FOLFIRINOX-Schemas kann eine Zweitlinientherapie mit Gemcitabin in Betracht gezogen werden [23].

1. Einleitung

Im Oktober 2016 wurde pegyliertes liposomales Irinotecan zur Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms in Deutschland zugelassen. In Kombination mit 5-FU und Leucovorin kann es bei Patienten eingesetzt werden, die zuvor eine Gemcitabin-basierte Chemotherapie erhalten haben. In der entsprechenden Zulassungsstudie, der NAPOLI 1-Studie, wurde liposomales Irinotecan in Monotherapie oder in Kombination mit 5-FU und Leucovorin mit einer 5-FU/Leucovorin-Monotherapie verglichen. Die Kombinationstherapie aus liposomalen Irinotecan, 5-FU und Leucovorin verlängerte die Gesamtüberlebenszeit von 4,2 auf 6,1 Monate. Das progressionsfreie Überleben stieg von 1,5 auf 3,1 Monate [25].

1.1.4.3 Strahlentherapie

Der Einsatz von Strahlentherapie ist eine Möglichkeit, bei lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen eine Reduzierung der Tumormasse zu erwirken. Doch diese Methode ist auch bei nicht metastasierten Pankreastumoren umstritten. In einer klinischen Studie an einem größeren Patientenkollektiv wurde der Wert einer Radiotherapie gegenüber Radiochemotherapie und Erhaltungs-Chemotherapie geprüft. Die adjuvante Chemotherapie führte bei Patienten mit reseziertem Pankreaskarzinom zu einem Überlebensvorteil, während sich die kombinierte Radiochemotherapie eher schädlich auf die tumorabhängige Lebenserwartung auswirkte [26]. Insgesamt ist der Stellenwert einer adjuvanten Radiochemotherapie derzeit nicht gesichert und ist nur im Rahmen von Therapiestudien gerechtfertigt.

1.1.4.4 Palliative Maßnahmen

Im Endstadium der Erkrankung benötigen die Patienten eine palliative Therapie. Zu den Leitsymptomen eines fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms gehören Verschlussikterus, Schmerzen und die symptomatische Duodenalstenose. Ohne kurativen Therapieansatz sollten palliative Maßnahmen durchgeführt werden. Grundsätzlich sind zwei Szenarien zu unterscheiden: der intraoperativen Diagnose der Inoperabilität steht die präoperative Inoperabilität gegenüber. Bei entsprechend stabilem Allgemeinzustand und einer adäquaten Lebenserwartung, empfiehlt sich die intraoperative Anlage eines Doppelbypasses, die prophylaktische Gastrojejunostomie [27]. Ein chirurgischer Eingriff im Sinne einer biliodigestiven Anastomose hat die Vorteile einer besseren Langzeitfunktion und Lebensqualität. Die Morbidität und Mortalität sind jedoch initial höher. Ein primär chirurgisches Vorgehen ist daher nur in Ausnahmefällen indiziert [4]. Beim primären Auftreten eines Ikterus ist die endoskopische Dekompression mittels

1. Einleitung

Metallstent empfohlen. Ein Plastikstent wird eingesetzt, wenn die Überlebenszeit auf weniger als drei Monate eingeschätzt wird [27].

Trotz der genannten Therapieoptionen ist das Pankreaskarzinom mit einer hohen Letalität verbunden. Einer der Gründe dafür wird den sog. Krebsstammzellen zugeschrieben und ist Mittelpunkt vieler aktueller Forschungen.

1.2 Stammzellen

1.2.1 Adulte Stammzellen

Sie zeichnen zwei elementare Eigenschaften aus. Zum einen sind diese Zellen in der Lage, durch das Bewahren der Zellteilungsfunktion, der sogenannten *symmetrischen Zellteilung*, eine stabile Population über einen langen Zeitraum aufrechtzuerhalten. Diese Eigenschaft wird *Selbsterneuerung (self-renewal)* genannt. Auf der anderen Seite sind Stammzellen in der Lage, alle differenzierten Zelltypen eines Gewebes auszubilden, sie sind *multipotent*. Jedes erwachsene Gewebe beinhaltet seine individuellen und spezifischen Stammzellen [28].

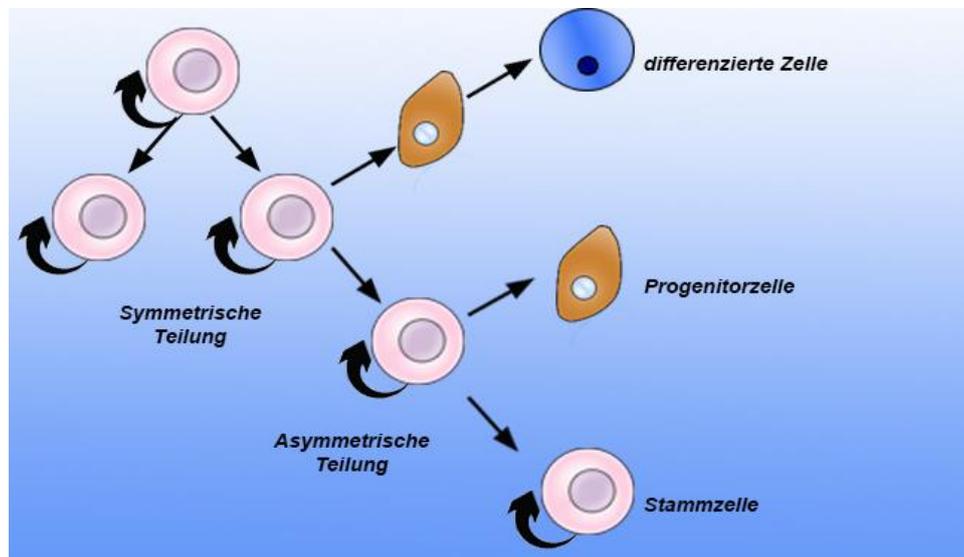


Abbildung 1.1: Stammzeileigenschaften. Dargestellt ist die symmetrische Zellteilung, in der zwei neue Stammzellen zur Erhaltung einer stabilen Population entstehen. Aus der asymmetrischen Zellteilung gehen je eine neue Stammzelle und eine Progenitorzelle hervor, um beschädigte oder tote Zellen zu ersetzen. Diese und alle folgenden Abbildungen, soweit nicht anders angegeben, basieren auf Informationen der im Text angegebenen Quellen und sind selbstständig erstellt.

1. Einleitung

Zusätzlich zur Selbsterneuerung und Multipotenz werden weitere Phänomene in die Stammzellbiologie eingeschlossen. Dazu zählen unter anderem ein Zustand der Ruhe (sog. *Quiescence*) und die *asymmetrische Zellteilung*. Es wird angenommen, dass eine Subpopulation von gewebespezifischen adulten Stammzellen in einem Ruhezustand über einen längeren Zeitraum verharrt, um wichtige funktionelle Eigenschaften zu bewahren. Diese Merkmale erlauben metabolischem Stress standzuhalten und die genomische Integrität über eine Lebensdauer zu erhalten [29].

Stammzellen in den meisten sich schnell erneuernden Geweben wie Darm und Magen teilen sich selten. Wenn sie sich teilen, entsteht durch *asymmetrische Zellteilung* aus einer einzigen Stammzelle zwei Zellen, von denen die eine Eigenschaften der Stammzellen beibehält und die andere zu einer Vorläuferzelle (sog. *Progenitorzelle*) differenziert. Die Vorläuferzellen sind verantwortlich für den Ersatz beschädigten oder abgestorbenen Gewebes. Progenitorzellen durchlaufen in der Regel eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen, ehe sie sich vollständig differenzieren [28].

Die strenge Regulierung der Balance zwischen Ruhezustand und Teilungsstadium adulter Stammzellen wird über die Aktivierung komplexer Netzwerke unterschiedlicher Entwicklungssignale vermittelt. Unter ihnen sind Hormone, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF), epidermale Wachstumsfaktoren (EGF), Signalwege wie Sonic Hedgehog (SHH), Wnt/ β -Catenin und Notch. Diese Stimuli können die Selbsterneuerung bzw. Differenzierung von adulten Stammzellen unter spezifischen physiologischen und pathologischen Bedingungen regulieren [30, 31].

1.2.2 Die Stammzellnische

Bereits 1978 postulierten Schofield et al. die Existenz einer Stammzellnische. In dieser Zeit ging man davon aus, dass Stammzellnischen einer fest definierten anatomischen Lage folgen und die Entfernung dieser Zellen aus ihrer Umgebung zur Differenzierung führe [32]. Heute weiß man, dass die Stammzellnische eine Mikroumgebung beschreibt, in welcher Stammzellen überleben und Stimuli unterliegen, die ihr Schicksal bestimmen. Daher ist die Stammzellnische weniger als ein physischer Ort von Stammzellen zu betrachten. Sie ist vielmehr der Ort an dem äußere Einflüsse auf Stammzellen einwirken und diese mit der Umgebung verknüpfen, um das Stammzellverhalten zu beeinflussen [33].

Die erste Erwähnung und Beschreibung der Bestandteile einer Nische erfolgte anhand des Wirbellosenmodells in Gonaden von Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) und in Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) [34, 35]. Zu den erhaltenen Bestandteilen der Stammzellnische zählen:

1. Stromazellen, einschließlich Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen und sezernierten löslichen Faktoren, die in der direkten Umgebung der Stammzellen zu finden sind.
2. Extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteine, welche als ein Stammzell-„Anker“ fungieren und ein mechanisches Gerüst zur Signalübertragung bilden.
3. Blutgefäße, die der Versorgung und Übertragung der Signale von anderen Organen zur Nische, sowie der Rekrutierung zirkulierender Stammzellen von und zur Nische dienen.
4. Neuronale Versorgung, welche die Mobilisierung von Stammzellen aus ihren Nischen begünstigt und Signale verschiedener Organsysteme übermittelt.

1. Einleitung

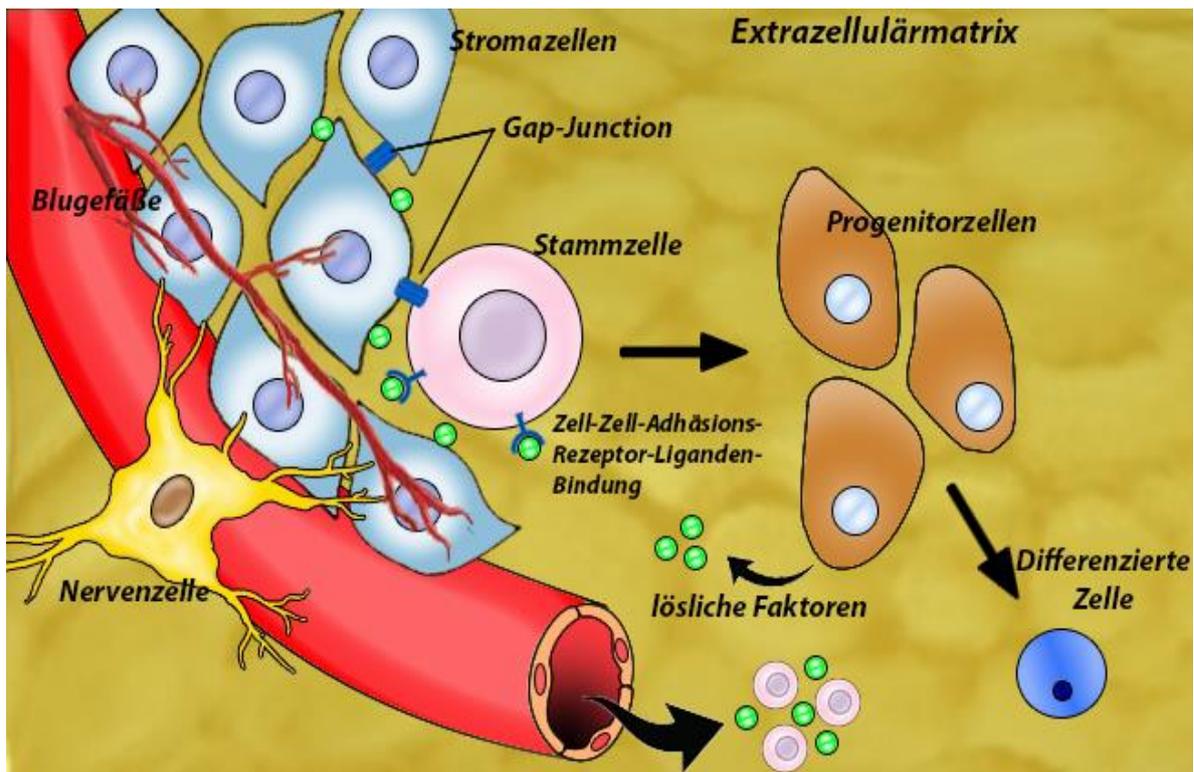


Abbildung 1.2: Darstellung der Stammzellnische. Zu den Bestandteilen der Stammzellnische gehören neben der Extrazellulärmatrix die Stromazellen. Durch Zell-Zell-Adhäsionen bilden sie zusammen mit den Matrixproteinen das funktionale Grundgerüst. In dieses sind Gefäße und Nervenzellen für die Versorgung und Zell-Zell-Kommunikation über lösliche Faktoren eingebettet.

Angeichts der vielfältigen Beeinflussung des Stammzellverhaltens durch die Nischenumgebung, wird die Erforschung von Nischenstörungen, die zu Funktionsstörungen des Stammzellverhaltens führen können, wie sie bei der Gewebeeralterung oder neoplastischen Transformationen zu beobachten sind, von besonderer Bedeutung sein [33].

Bislang wurden mehrere Nischen in unterschiedlichen Geweben beschrieben und charakterisiert. Hämatopoetische Stammzellen beispielsweise finden sich im trabekulären Knochenmark [36], epitheliale Stammzellen finden sich in der Haut im Bereich der Bulgregion der Haarfollikel [37] und intestinale Stammzellen sind im Bodenbereich der Lieberkühn-Krypten zwischen den Paneth-Zellen der Magenschleimhaut zu finden [38]. Auch im Pankreas gibt es hinreichend Hinweise für die Existenz einer Stammzellnische [39, 40]. Amsterdam et al. berichteten von der Identifizierung der Pankreasstammzellnische in den Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas [41].

1.2.3 Krebsstammzellen

Krebsstammzellen (CSC) sind die zentralen Figuren der 1997 durch Bonnet und Dick postulierten Krebsstammzell-Hypothese [42], welche das stochastische Modell der Krebsentstehung in Frage stellte. Das stochastische oder auch klonale Evolutionsmodell der Krebsentstehung besagt, dass transformierte Einzelzellen unbegrenzte Proliferationsfähigkeit erlangen, um Tumorwachstum auszulösen. Während der frühen Entwicklung des Tumors transformiert eine einzelne oder wenige Zellen, wodurch unkontrolliertes Wachstum mit entwicklungsabhängiger Ansammlung verschiedener Mutationen resultiert. Diese mutierten Zellen treiben das Tumorwachstum an und führen zu heterogenen Subpopulationen innerhalb des Tumors. Über die Lebensdauer des Tumors kann jede der Krebszellen am Tumorwachstum beteiligt sein, Resistenzen entwickeln und Rezidive verursachen. Daher sind alle Zellen tumorös und Ziel einer allumfassenden Behandlung [43].

Die Krebsstammzell-Theorie postuliert, dass viele Krebsarten von einer kleineren Population tumorigenischer Zellen initiiert und unterhalten werden, die zur kontinuierlichen Selbsterneuerung und –differenzierung in der Lage sind. Diese Zellpopulation erfährt eine unbegrenzte Proliferation, und führt zu differenzierten Zellen, die neue Tumoren entwickeln [44]. Übereinstimmend mit einem Stammzellmodell, sind Krebsstammzellen in der Lage, Tumoren zu bilden, welche die phänotypische Heterogenität des Ursprungstumors widerspiegeln. Zusätzliche Hinweise, dass Stammzellen womöglich eine Rolle in der Tumorentstehung spielen, unterstreichen die Beobachtungen, dass normale Stammzellen und Krebszellen einige wichtige Eigenschaften teilen. Zu diesen zählen:

- Selbsterneuerung, durch autonome Wachstumssignale
- Unempfindlichkeit gegenüber anti-Wachstumssignalen
- Fähigkeit der Differenzierung
- Umgehen der Apoptose durch aktive Telomeraseexpression
- Erhöhte Membrantransportaktivität
- Fähigkeit zur Migration und Metastasierung [45]

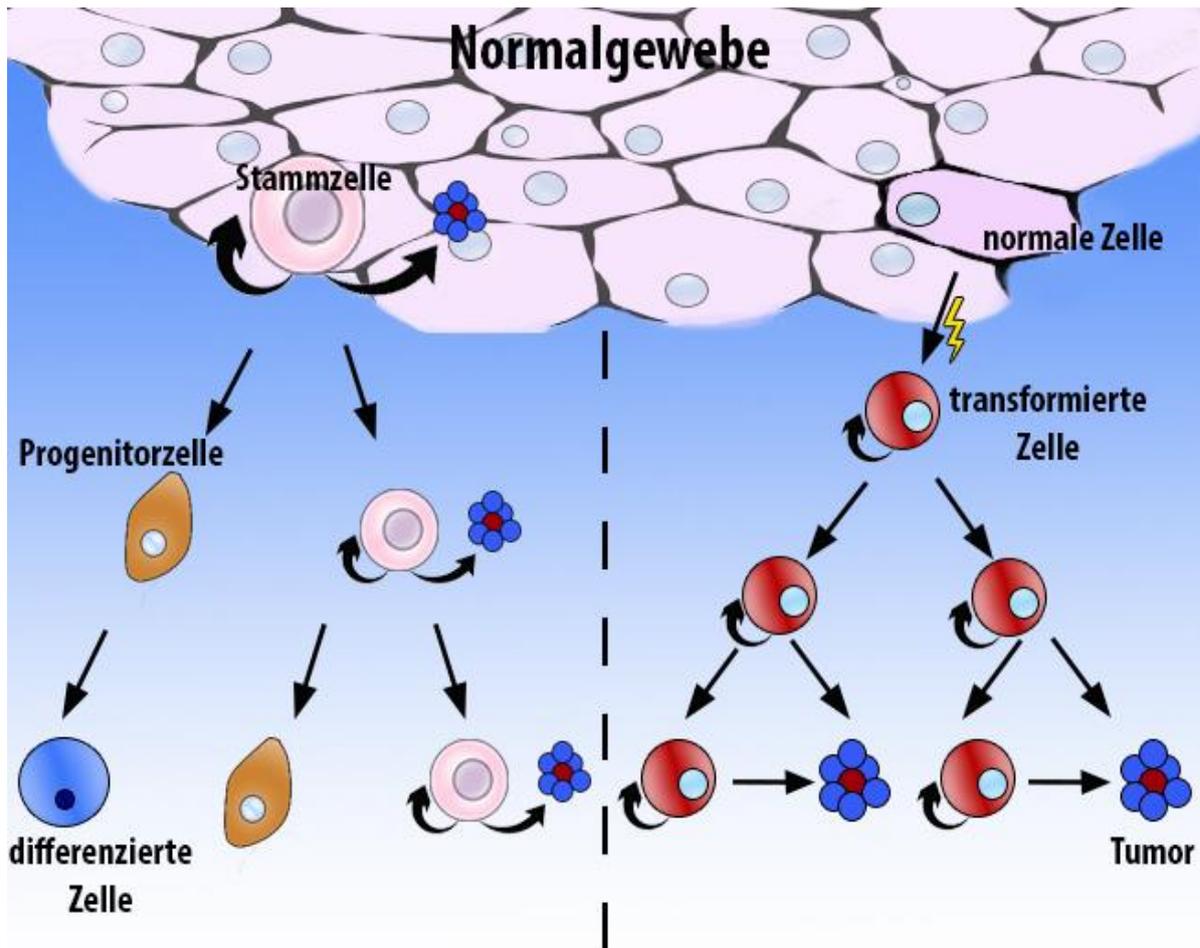


Abbildung 1.3: Vergleich der Krebsstammzell-Theorie mit der klonalen Krebsentstehung. Die Krebsstammzelltheorie auf der linken Seite besagt, dass nur Krebsstammzellen (CSC: rosa) über Selbsterneuerungspotential verfügen und durch unkontrollierte Proliferation in der Lage sind, neue Tumoren zu bilden. In dem auf der rechten Seite dargestellten klonalen/stochastischen Tumormodell hingegen kann jede Zelle unbegrenzte Proliferationsfähigkeit erlangen und neue Tumoren bilden.

Eines der frühen Schlüsselereignisse in der Transformation könnte die Dysregulation des normalerweise streng überwachten Prozesses der Selbsterhaltung sein. In gesundem Gewebe unterliegt die Selbsterneuerung der Kontrolle von Signalen der umgebenden Stammzellnische. Von den Signalwegen, welche die Selbsterneuerung der normalen Stammzellen steuern, sind insbesondere Wnt, Notch und Hedgehog zu nennen. Es gibt umfangreiche Hinweise, dass die Dysregulation dieser Signalwege eine erhebliche Rolle in der humanen Karzinogenese spielt [45].

Eine Heilung der Mehrheit solider Gewebetumoren ist trotz hoher Intensivierungen in der Krebstherapie häufig nicht möglich. Hinzu kommt, dass die Sterberaten im vergangenen Jahrzehnt nur geringfügig regredient waren [46]. Nicht zuletzt aus diesen Gründen ist die Erforschung regulierender Signalwege von essentieller Bedeutung.

1.3 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg gehört zu den in der Evolution hoch konservierten Signaltransduktionswegen und ist dafür bekannt, Zellproliferation, Migration, Apoptose, Differenzierung und die Selbsterhaltung von Krebsstammzellen zu regulieren [47].

Die Wnt-Genfamilie erhielt ihren Namen durch die Zusammensetzung des in *Drosophila melanogaster* beschriebenen Gens für die Segmentpolarität, *wingless* und dem in Wirbeltieren homologen Protoonkogen *integrated* oder *int-1* [48].

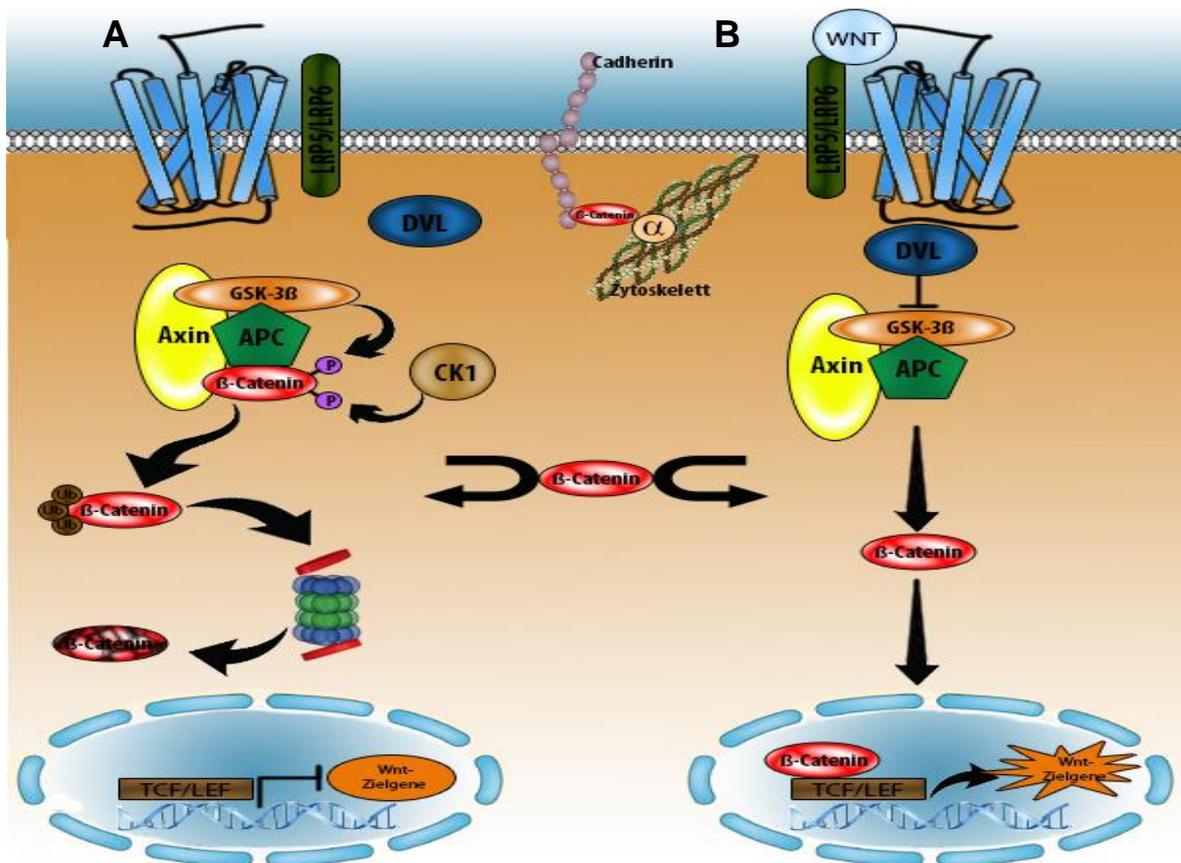


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Wnt-Signaltransduktion. A: Ohne Aktivierung von Frizzled ist β-Catenin an Cadherin gebunden und sorgt über die Verbindung mit α-Catenin (α) zum Zytoskelett für die Adhärenz der Zelle. Freies β-Catenin wird in einem Degradationskomplex aus Axin, APC, GSK-3β und CK1 gebunden, phosphoryliert und im Proteasom abgebaut. **B:** Durch Bindung eines Wnt-Liganden an Frizzled und LRP5/6 zerfällt der Degradationskomplex. β-Catenin akkumuliert im Zytoplasma und kann in den Zellkern translozieren, in dem es im Komplex mit den Transkriptionsfaktoren TCF/LEF Wnt-Zielgene aktiviert.

1. Einleitung

Das extrazelluläre Wnt-Signal stimuliert unterschiedliche intrazelluläre Signalübertragungskaskaden. Dazu zählen der kanonische bzw. Wnt/ β -Catenin-abhängige Signalweg und der nicht-kanonische bzw. β -Catenin-unabhängige Signalweg. Dieser kann wiederum in einen planaren Zellpolaritäts-Signalweg und einen Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg unterteilt werden [49]. In der vorliegenden Promotionsarbeit wird ausschließlich der kanonische Wnt-Signalweg von Interesse sein.

Der kanonische Signalweg erfordert die Bindung von Wnt-Liganden an einen sieben-Transmembranregionen-*Frizzled* (Fzd)-Rezeptor und dessen Ko-Rezeptor, dem *low-density lipoprotein receptor related protein 6* (LRP6) oder seinem engem Verwandten LRP5, um die intrazelluläre Signalübermittlung über die Translokation von β -Catenin in den Zellkern zu vermitteln. β -Catenin ist ein hoch instabiles Protein mit streng kontrolliertem Vorkommen im Zytoplasma [50]. Es spielt die zentrale Rolle in der Signalübertragung.

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Formen von β -Catenin mit verschiedenen Proteinkomplexen interagieren. Eine heterodimere Form bindet an das membrangebundene Cadherin und hält durch Adhäsion Stammzellen in ihrer Nische. Die monomere Form bindet nach Translokation in den Zellkern, an intrazelluläre Proteine und bildet Transkriptionskomplexe [51].

In Abwesenheit der Wnt-Liganden und nicht aktiviertem Wnt-Signalweg (Abb. 1.4A) wird freies zytoplasmatisches β -Catenin von einem Multiproteinkomplex, bestehend aus *Axin1* oder *2*, *Adenomatosis Polyposis Coli* (APC), *Glykogen Synthetase Kinase 3 β* (GSK-3 β) und *Casein Kinase 1 α* (CK1 α), gebunden. Dieser sog. Zerstörungskomplex bindet β -Catenin und macht es durch Phosphorylierung der Serin- und Threonin-Seitenketten im N-Terminus zum Ziel von Ubiquitinierung (Markierung zum proteosomalen Abbau) und anschließender proteolytischer Zerstörung durch die proteosomale Maschinerie [52].

Die Anwesenheit von Wnt-Liganden (Abb. 1.4B) führt über die Bindung an den Frizzled-Rezeptor und LRP5/6, zur Phosphorylierung von *Dishevelled* (DVL). Durch die Aktivierung von DVL hemmt es die Bildung des Zerstörungskomplexes, indem es die Aktivität von GSK-3 β und CK1 α hemmt und Axin zur Membran rekrutiert. In der Folge kommt es zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma. Durch Translokation in den Zellkern fungiert β -Catenin als transkriptioneller Ko-Aktivator. Es wurden bereits viele Bindungspartner von β -Catenin im Zellkern entdeckt. Die womöglich am besten beschriebenen Partner sind die Mitglieder der DNA-bindenden T-Zell-Factor/Lymphoid-Enhancer-Factor (TCF/LEF) Transkriptionsfaktoren [49]. In der Folge bindet der entstandene Komplex aus β -Catenin und LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion von Wnt-Zielgenen und führt zur erhöhten Expression dieser Gene. Zu

den bekanntesten Zielgenen gehören das in die Onkogenese eingebundene *Myc* und *CyclinD1* [53]. (Eine ständig aktualisierte Übersicht der Wnt-Zielgene ist auf der Wnt-Website zu finden: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)

1.3.1 LGR-RSPO in der Wnt-Signaltransduktion

Die R-Spondin (RSPO)-Proteinfamilie ist eine Gruppe, bestehend aus vier sezernierten Proteinen (RSPO1/2/3/4), die als potente Verstärker des kanonischen Wnt-Signalweges wirken können [54]. Diese Proteine teilen eine 40-60%ige Strukturhomologie untereinander, welche ein für sekretierte Proteine typisches hydrophobes Signalpeptid am N-Terminus beinhaltet. Das Vorhandensein einer Signalsequenz und das Fehlen einer Transmembranregion, ließ darauf schließen, dass RSPOs sezernierte Proteine sind. Weiterführende Untersuchungen dokumentierten RSPOs im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat, als Nachweis der Zugehörigkeit zum sekretorischen Signalweg in Zellen [55]. Zudem zeigen RSPOs zwei *Furin-like Cystein-rich Domains* (FU-1 und FU-2), gefolgt von einer *Thrombospondin-Type-1-Repeat* (TSR-1) und einem basischen C-Terminus [56]. *Furin-Repeats* treten vor allem in Rezeptoren von Wachstumsfaktoren auf, wie bei Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin, Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) und Neurotrophic Factors [57].

Das `R' in R-Spondin leitet sich von der Expression des in der Maus beschriebenen Gens R-Spondin1 ab. Dieses Gen wird zeitweise im Neuralrohr am zehnten und zwölften Tag nach Befruchtung in der Grenzzone zwischen Deckplatte und dem Neuroepithel exprimiert. Daher der Name R(*oof Plate specific*)-Spondin [58].

RSPO1 ist nachweislich an der Geschlechtsbestimmung in Säugetieren beteiligt [59] und ist ein potenter Stimulator epithelialer Reparaturvorgänge im Gastrointestinaltrakt [60]. RSPO2 scheint hingegen in der embryonalen Entwicklung von Lippen, Lunge und Haarfollikeln eine essentielle Rolle beizukommen [57]. Darüber hinaus wurde RSPO2 als ein wichtiger Faktor der Anfälligkeit für infektiöse Diarrhöe in Mäusen identifiziert und ist mit der intestinalen Homöostase verknüpft [61]. Während der Plazentaentwicklung spielt RSPO3 eine entscheidende Rolle bei der Vaskulogenese und Angiogenese [62]. Zudem wurden in 10% der primären Darmkrebserkrankungen Genfusionen zwischen RSPO2 und RSPO3 gefunden [63]. RSPO4 ist in die Nagelentwicklung involviert, Mutationen von RSPO4 führten zur fehlenden Nagelbildung (Anonychie) [64].

Die *Leucin-Rich-Repeat-Containing G-Protein-Coupled Receptors* (LGR) gehören zur großen Gruppe der evolutionär hochkonservierten 7-Transmembran (7TM)-Rezeptoren, welche sich durch ihre sehr große ligandenbindende, extrazelluläre Domäne auszeichnen.

1. Einleitung

Die LGR-Proteinfamilie kann in drei Hauptgruppen (A, B, C) unterteilt werden. Zu den TypA-Rezeptoren gehören die Glykoprotein-Hormonrezeptoren: Follikel-Stimulierender Hormon-Rezeptor (FSHR), Luteinisierender Hormon-Rezeptor (LHR) und der Thyroid-stimulierende Hormon-Rezeptor (TSHR), mit sieben bis neun Leucin-reichen Abschnitten, sog. Leucin-Rich-Repeats (LRR), in ihrer Ektodomäne. Die TypC-Rezeptoren zeichnet eine ähnliche Anzahl an LRRs mit einem zusätzlichen Low-Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptorenmuster aus. Zu dieser Gruppe gehören LGR7 und LGR8. Die Signalübermittlung über heterotrimere G-Proteine und die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels dieser beiden Rezeptorenklassen ist gut erforscht.

Die TypB-Rezeptorfamilie schließt LGR4, LGR5 und LGR6 ein. Sie sind durch eine 16-18 LRR-beinhalten Ektodomäne charakterisiert [65]. Erst 2012 konnten die Wnt-Agonisten RSPO1/2/3/4 als physiologische Liganden von LGR4/5/6 identifiziert werden. Dies deckte zudem eine entscheidende Rolle in der Stammzell-Homöostase im Gastrointestinaltrakt auf [66-69]. Interessanterweise war diese Fähigkeit, den Wnt-Signalweg zu verstärken, unabhängig von der *G-Protein-gekoppelter Receptor* (GPCR)-Aktivierung [67] und unterstreicht die einzigartige Stellung dieser Rezeptoren innerhalb ihrer Gruppe.

Ein gemeinsames Merkmal von LGR4/5/6 ist die Expression in verschiedenen Typen adulter Stammzellen. LGR4 kann in vielen sich teilenden Zellen nachgewiesen werden [70] und die Ausschaltung in Mäusen zeigte embryonale Entwicklungsstörungen in vielen Organen, wie Niere, Hoden, Haut und Gallenblase sowie Knochen und führt bis zum neonatalen Tod [71, 72]. LGR5 wurde hinlänglich als ein Marker für in Wnt-abhängigen Bereichen ansässige Stammzellen, z.B. im Dünndarm, Kolon [38], Magen [73] und den Haarfollikeln [74], beschrieben [73]. Auch LGR6 dient als ein Stammzellmarker von multipotenten Stammzellen in der Haut, einschließlich der Haarfollikel [75, 76], in den Geschmackspapillen [77], der Lunge [78] und in Brustdrüsengewebe [75].

1. Einleitung

1.3.1.1 LGR6 Struktur

Basierend auf den Daten vom *Nationalen Zentrum für Biotechnologieinformation (NCBI)* wurden die mRNA Sequenzen der unterschiedlichen Slice-Varianten untersucht (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59352>). Die Angaben der Aminosäuresequenzen der LGR6-Isoformen erfolgte auf Grundlage der Daten von *Universal Protein Resource (UniProt)*, (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9HBX8>).

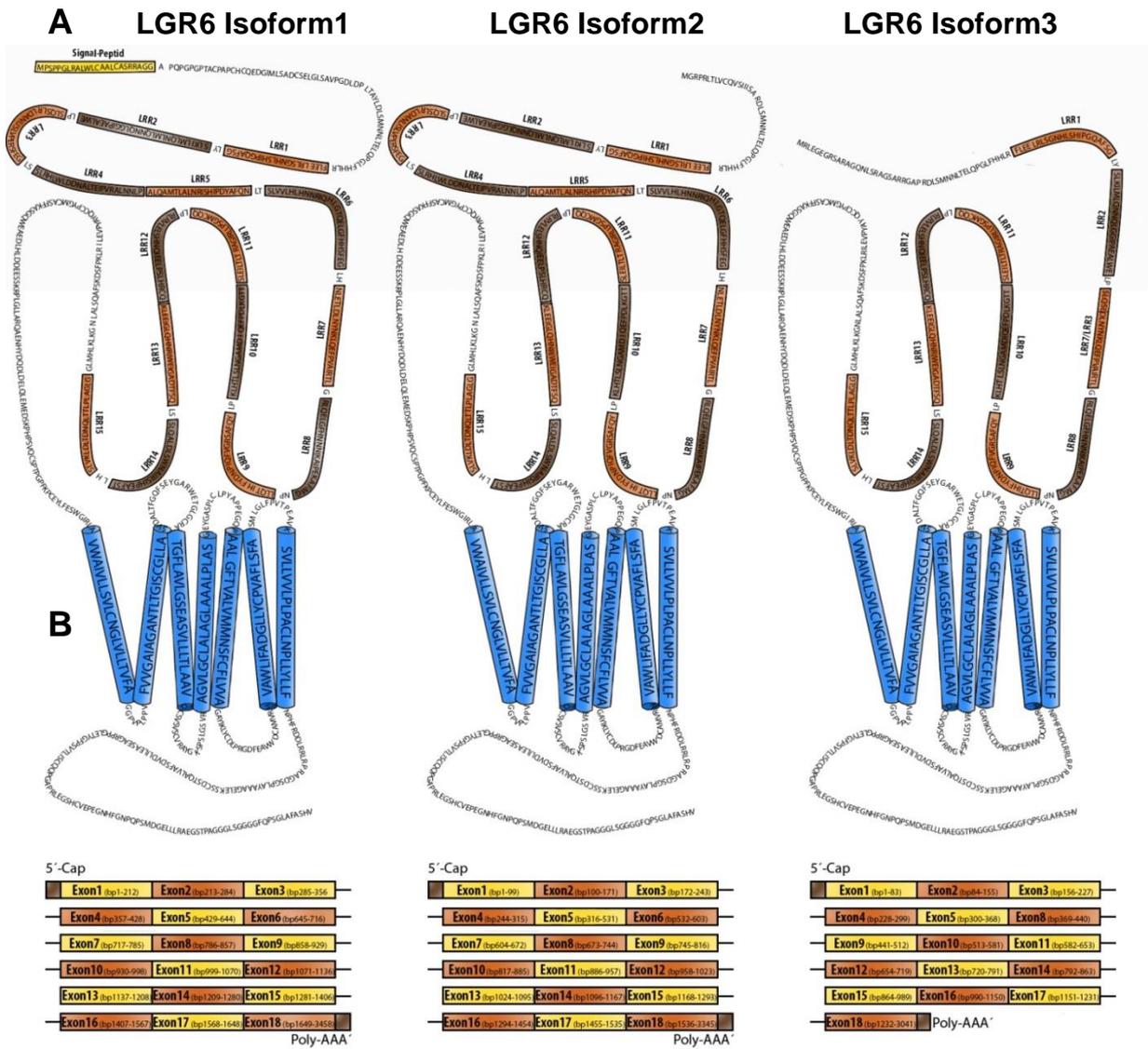


Abbildung 1.5: Strukturanalyse der LGR6-Isoformen. Schematische Abbildung der drei Isoformen von LGR6 basierend auf der Datengrundlage von NCBI und UniProt. **A:** Darstellung der Aminosäuresequenzen. Isoform 1 ist die kanonische Form und verfügt über die gesamte Länge mit 15 LRR-Regionen, sowie einer Signalsequenz. **B:** Isoform 2 beinhaltet wie die kanonische Form 15 LRR-Regionen, aber keine Signalsequenz. **C:** Isoform 3 ist die kürzeste Variante von LGR6 und besitzt 11 LRR-Regionen mit einer zusammengesetzten LRR-Region aus LRR3 und LRR7. Isoform 3 besitzt ebenfalls keine Signalsequenz.

1. Einleitung

	LGR6 Isoform1	LGR6 Isoform2	LGR6 Isoform3
mRNA	3458 bp	3345 bp	3041 bp
Proteinlänge	967 AS	915 AS	828 AS
Proteinmasse	104,298 Da	99,295 Da	89,302 Da

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der LGR6 Isoformen. Tabellarische Aufführung der mRNA-Sequenzlänge (Basenpaaren, bp), der Proteinlänge (Aminosäuren-Anzahl, AS) und der Proteinmasse (Dalton, Da). (Quelle NCBI und UniProt)

LGR6 besitzt drei bekannte mRNA Splice-Varianten und drei Protein-Isoformen. Die mRNA Splice-Varianten unterscheiden sich in der Länge der Basenpaare (bp), LGR6 V1, welche die kanonische Isoform 1 kodiert, ist mit 3458 bp die längste mRNA-Variante (Abb.3.10A). Sie weist im Gegensatz zu den anderen Varianten im Exon 1 als einzige Form einen für das Signalpeptid kodierenden Bereich auf. Die mRNA Sequenz besteht aus 18 Exons, ebenso wie LGR6 V2, die mit 3345 bp die zweitlängste Variante ist (Abb.3.11B). Sie besitzt im Exon 1 einen nicht-kodierenden Bereich. Ähnlich weist LGR6 V3 im Exon 1 einen nicht-kodierenden Bereich auf. Die mRNA-Splice-Variante 3 besitzt 16 Exons bei einer Länge von 3041 bp (Abb.3.10C). In LGR6 V3 fehlen die Exons 6 und 7 im Vergleich zu V1 und V2. Die Protein-Isoformen zeichnen sich durch eine gemeinsame Transmembrandomäne und einen identischen intrazellulären Poly-Glyzin-C-Terminus aus. Die kanonische Isoform 1 ist mit 104,298 Da und einer Länge von 967 Aminosäure-Sequenzen (ASS) die größte Form. Strukturell fällt das bei den anderen Isoformen fehlende Signal-Peptid auf. Isoform 2 unterscheidet sich von der kanonischen Form in der Masse mit 99,295 Da und einer Länge von 915 ASS sowie dem Fehlen des Signalpeptids. Isoform 1 und Isoform 2 zeigen jeweils 15 *Leucin-Rich-Repeat* (LRR) Regionen auf. Die Isoform 3 ist die kleinste Form mit 89,302 Da und 828 ASS. Sie besitzt als einzige Form 11 LRRs, wobei LRR3 und LRR7 fusioniert sind.

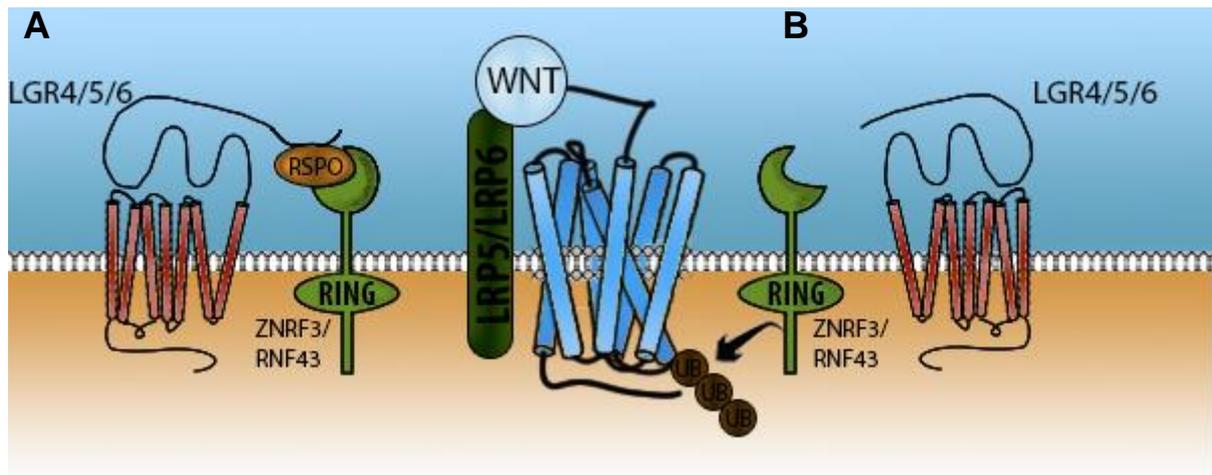


Abbildung 1.6: RSPO-LGR-Komplex in der Wnt-Signaltransduktion. A: Unter Anwesenheit von RSPO entsteht ein Komplex aus RSPO, LGR und ZNRF3/RNF43, wodurch letzterer gehemmt wird. Die Wnt-Signaltransduktion wird verstärkt. B: Ohne RSPO sind ZNRF3/RNF43 frei und führen über Ubiquitinierung des Frizzled-Rezeptors zur Inhibierung der Wnt-Signalübertragung.

Der exakte Mechanismus über den RSPO und LGR das Wnt-Signal verstärken ist Gegenstand intensiver Forschungen. Nach derzeitigem Stand erfordert RSPO, um die Wnt-Signaltransduktion verstärken zu können, LGR. Eine intrazelluläre Signalisierung über LGR konnte bislang nicht beobachtet werden.

Die Entdeckung der transmembranen Zelloberflächen-E3-Ubiquitinligasen *Zinc and Ring Finger 3* (ZNRF3) sowie seinem funktionellen Verwandten *Ringfinger protein 43* (RNF43) und die Beobachtung, dass RSPO die Anwesenheit von Fzd-Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöht, führte zur Aufklärung des molekularen Mechanismus, durch den RSPO und LGR den Wnt-Signalweg verstärken. ZNRF3 und RNF43 fungieren als Bestandteil eines negativen Feedbackmechanismus der Wnt-Signaltransduktion. Sie vermitteln die Markierung sowie anschließende Einziehung (Internalisierung) und Abbau der Wnt-Rezeptoren Fzd und LRP5/6 [79]. Über die FU-1 Domäne bindet RSPO an die extrazelluläre Domäne von ZNRF3/RNF43. Über die FU-2 Domäne binden diese simultan an LGR. Man nimmt an, dass ZNRF3/RNF43 als Effektorrezeptoren von RSPO fungieren, während LGR die Rolle eines Verbindungsrezeptors einnimmt. Der entstehende ternäre Komplex führt durch Ubiquitinierung und Einziehung zur Entfernung von ZNRF3/RNF43 von der Zelloberfläche und indirekt zum erhöhten Auftreten von Fzd-Rezeptoren auf der Zelloberfläche [80].

1.3.2 Wnt-Signaltransduktion im duktalem Pankreaskarzinom

Auch in der Pankreasbiologie reguliert der Wnt-Signalweg eine Vielzahl von Vorgängen. Während der Pankreasentwicklung bspw. führen sowohl inadäquat hohe, als auch fehlende Aktivität zu Entwicklungsstörungen bis hin zur Agenesie des Pankreas. β -Catenin ist der Hauptdarsteller des kanonischen Wnt-Signalweges und auch nachweislich bedeutend für die Regeneration des exokrinen Pankreas infolge von Organschäden, wie zum Beispiel nach induzierten akuten Pankreatitiden in Mäusen gezeigt werden konnte [81]. Aus Vorarbeiten ist zudem bekannt, dass die Wnt/ β -Catenin Signalaktivität in duktalem Pankreaskarzinomzelllinien stark variiert. Lediglich einige wenige PDAC-Zelllinien weisen hohe Wnt-Signalaktivitäten auf [82-84]. Wenngleich die β -Catenin-Akkumulation keine allgemeine Eigenschaft dieser Erkrankung ist, sind sowohl nukleäre Ansammlungen (10-60%), als auch zytoplasmatische Konzentrationen (25-65%) von β -Catenin in intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und PDAC beobachtet worden. Erhöhte nukleäre und zytoplasmatische β -Catenin-Level scheinen daher mit dem Grad der PanIN und Entwicklung von invasiven PDAC zu korrelieren [85]. Zudem kam es durch Hemmung von β -Catenin mRNA zu einer erheblichen Reduzierung der Proliferation und erhöhten Apoptose in PDAC [81].

Neuere Studien sind bemüht eine tragende Rolle des Wnt-Signalweges in der Entstehung des PDAC zu festigen. Dafür spricht, dass die Expression von kanonischen Wnt-Liganden wie WNT3 und WNT8b in PDAC-Proben hoch ist [81]. Zusätzlich führt eine erhöhte Expression von Wnt-Liganden-Inhibitoren, zur Senkung der transkriptionellen Aktivität von β -Catenin in einem Teil von humanen PDAC [86]. Letztendlich scheint der Wnt-Signalweg nicht in der Lage zu sein, PDAC auszulösen, jedoch ist er fähig, die Erkrankung zu unterhalten und fortschreiten zu lassen [87]. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Erforschung und das Verständnis der molekularen Mechanismen weiter voranzutreiben, um in Zukunft neoadjuvante, adjuvante und palliative Therapieoptionen in der Behandlung des PDAC zu gewinnen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit lagen keine Veröffentlichungen zur Untersuchung des RSPO-LGR-Komplexes im humanen PDAC vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, quantitative Ergebnisse zur Untersuchung der Basisexpression der bekannten RSPO1/2/3/4 sowie ihren Rezeptoren LGR4/5/6 in verschiedenen PDAC-Zelllinien zu eruieren. Weiterführende Betrachtungen sollten die Veränderungen der RSPO- und LGR-Expression unter Verstärkung des Wnt-Signalweges durch einen Vertreter der RSPOs sowie unter Behandlung mit dem etablierten Standardtherapeutikum Gemcitabin erfassen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Zubehör

12- Well- Kulturplatte	Thermo Fisher (USA)
96- Well PCR Platten	Life Technologies (USA)
96- Well- Kulturplatte	Sarstedt (D)
Autoklav (Unisteri 236)	Münchener Medizin Mechanik (München)
Bio Photometer	Eppendorf (D)
Deckgläser (20x26x0,4 mm)	LO- Laboroptik (UK)
Dispenser	Eppendorf (D)
DNA- Workstation	Uniequip (D)
Elektrophorese Spannungsquelle (PowerEase500)	Life Technologies (USA)
Einfrierbox	Nalgene (USA)
FACSCalibur multiwell AutoSampler	BD Biosciences (D)
FACS- Röhrchen (Round- Bottom Tube 5 mL)	Falcon (D)
Falcon (15 mL)	Techno Plastic Products (CH)
(50 mL)	Falcon, Corning (USA)
Inkubator (CB-150)	Binder (D)
(V-HO2-320)	Heraeus (D)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (D), Kirsch (D), Siemens (D)
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus (D)
Gelelektrophoresekammer, Kämme	Peqlab (D)
Gel Pro Imager	Heritage Global Partners (USA)
Glaspipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Sigma Aldrich (D)
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr (D), Kirsch (D)
Kryotubes	Greiner Bio One (A)
Lab Marker	Sigma Aldrich (D)
Latexhandschuhe, unst. Puderfrei	Braun (D)
Lichtmikroskop (Avioxert 40 CFL)	Zeiss (D)
Minizentrifuge (GMC-060, MCF-2360)	LMS Consult (D)
Multipipette/ Stepper	Eppendorf (D)
NanoDrop 2000 Spektrophotometer	Thermo Fisher (USA)
Neubauerzählkammer (0,1 mm Tiefe)	LO- Laboroptik (UK)
Nitril Handschuhe	Sempermed (A)

2. Material und Methoden

Objektträger (Super Frost Plus)	Thermo Fisher (USA)
Pipette (10 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf (D), Brand (D)
Pipettenspitzen	Eppendorf (D), MidSci (USA), USA Scientific, Inc. (USA)
Pipettierhilfe (Accu jet Pro)	Brand (D)
QIASHredder	Qiagen (D)
Schraubflaschen	Flo Laboratories Incorporated (USA)
StepOne Real- Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
Sterile Werkbank	Flow Laboratories, Inc. (USA)
Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf (D)
Tubes (500 µl, 1500 µl, 2000 µl)	Eppendorf (D)
VERSA max microplate reader	Molecular Devices (USA)
Vortexer (VX 100)	Mo Bio Laboratories, Inc. (USA)
Waage (JL1502-G)	Mettler Toledo (USA)
Wasserbad	Memmert (D)
Zellschaber (25 cm) (23 cm)	Sarstedt (D), Thermo Fisher (USA)
Zentrifuge (Rotina 48 R) (Cytospin 2)	Hettich Zentrifugen (D), Thermo Fisher (USA)
Zellkulturflaschen (25 mL, 75 mL, 150 mL)	Falcon, Corning (USA), Thermo Fisher (USA)
Zytospin Cytoclip	Thermo Fisher (USA)
Zytospin Filterkarten	Thermo Fisher (USA)
Zytofunnels	Thermo Fisher (USA)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Für molekularbiologische Ansätze wurde RNase-freies Wasser der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit destilliertem Wasser und Reinstwasser hergestellt.

Agarose	Sigma Aldrich (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad (USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO Hypri Max)	Sigma Aldrich (D)
dNTP Mix, PCR Grade	Qiagen (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Ethanol	Roth (D)

2. Material und Methoden

(70%)	Roth (D)
Entellan Eindeckmittel	Merck Millipore (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom (D)
	Sigma Aldrich (D)
Hoechst Färbelösung	Sigma Aldrich (D)
Magermilchpulver	Roth (D)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Biorad (USA)
NaCl (>99,8%) 5 kg	Roth (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biorad (USA)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (USA)
PBS	Pan Biotech (D)
Polyacrylamid	Biorad (USA)
Proteas Inhibitor Cocktail, 50x	Promega (USA)
RIPA Lyse Puffer, 10x	Merck Millipore (D)
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Sigma Aldrich (D)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth (D)
Triton-X	Sigma Aldrich (D)
Tryptan Blue Solution (...%)	Sigma Aldrich (D)
Trypsin/ EDTA	Lonza (D)
	Sigma Aldrich (D)

2.1.3 Puffer und Lösungen

DNA-Agarosegelelektrophorese

Pufferlösung	Komponenten pro Ansatz
TAE-Puffer, 50x	EDTA 18,61g Natriumacetat 57,1mL Tris 242g VE-H ₂ O 1,0L

Durchflusszytometrie

Pufferlösung	Komponenten pro Ansatz
FACS-Puffer	PBS 1,0L Natriumazid, 10% 0,2L Bovines Serumalbumin 5g

2. Material und Methoden

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Pufferlösung	Komponenten pro Ansatz
Laufpuffer, 10x	Glycin 144g SDS 10g Tris-HCL 30g VE-Wasser 1,0L
Pufferlösung für Sammelgel	APS, 10% 30µL H ₂ O 2,3 mL Polyacrylamid 380µL SDS, 10% 30µL Temed 5µL Tris (1M, pH 6,8) 380µL
Pufferlösung für Trenngel	APS, 10% 100µL H ₂ O 4,8 mL Polyacrylamid 2,5 mL SDS, 10% 100µL Temed 5 µL Tris (1,5M, pH 8,8) 2,5 mL

Western Blot

Pufferlösung	Komponenten pro Ansatz
Transferpuffer, 10x	Glycin 144g Tris 30g VE-H ₂ O 1,0L
TBS, 10x (pH 7,6)	Natriumchlorid (NaCl) 80g Tris 24g VE-H ₂ O 1,0L
TBS-T, 1x	TBS 100mL Tween 1mL VE-H ₂ O 900mL

2. Material und Methoden

Immunfluoreszenzfärbung

Pufferlösung	Komponenten pro Ansatz
Peroxidase-Block	16,7 mL Methanol (100%) 3,8 mL H ₂ O 0,5 mL H ₂ O ₂

2.1.4 Fertigsysteme (Kits)

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences (D)
DuoSet Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems (USA)
DuoSet ELISA human R-Spondin 1	R&D Systems (USA)
DuoSet ELISA human R-Spondin 4	R&D Systems (USA)
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	Qiagen (D)
Human R-Spondin 1 DuoSet, 5 Plate	R&D Systems (USA)
Human R-Spondin 4 DuoSet, 5 Plate	R&D Systems (USA)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (D)
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen (D)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc. (USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (D)
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences (D)

2.1.5 Größenstandards (Marker)

Marker	Hersteller
1 Kb Plus DNA Ladder	Life Technologies (USA)
Dual Color Protein Standard	Biorad (USA)

2. Material und Methoden

2.1.6 Primer

Die folgenden Primer wurden, wie vom Hersteller Qiagen angegeben, für die nicht-quantitative PCR verwendet:

Primer	Genaue Bezeichnung des Herstellers	Produktgröße	Hersteller
GAPDH human	Hs_GAPDH_2_SG	119 bp	Qiagen

Für die quantitative Real-Time-PCR wurden Primer des Quantitect-Primer-Assays der Firma Qiagen verwendet. Die Primer sind für die Durchführung mit dem QuantiFast SYBR Green PCR Kit optimiert. Sie wurden wie vom Hersteller vorgegeben verwendet. Die genauen Sequenzen werden vom Hersteller nicht angegeben und können nicht aufgeführt werden.

Primer	Genaue Bezeichnung des Herstellers	Produktgröße	Hersteller
GAPDH human	Hs_GAPDH_2_SG	119 bp	Qiagen
RSPO1 human	Hs_RSPO1_SG	114 bp	Qiagen
RSPO2 human	Hs_RSPO2_1_SG	78 bp	Qiagen
RSPO3 human	Hs_RSPO3_1_SG	88 bp	Qiagen
RSPO4 human	Hs_RSPO4_1_SG	86 bp	Qiagen
LGR4 human	Hs_LGR4_1_SG	101 bp	Qiagen
LGR5 human	Hs_LGR5_1_SG	143 bp	Qiagen
LGR6 human	Hs_LGR6_1_SG	105 bp	Qiagen
LGR6 human	Hs_LGR6_va.1_	67 bp	Qiagen
Axin2 human	Hs_AXIN2_1_SG	109 bp	Qiagen
EphB2 human	Hs_EPHB2_1_SG	111 bp	Qiagen
Prox1 human	Hs_PROX1_1_SG	72 bp	Qiagen
ZEB1 human	Hs_ZEB1_1_SG	116 bp	Qiagen

2.1.6.1 Selbstkonzipierte Primer

Die Primer für die LGR6-Splicevarianten-Analysen (3.1.4.2) wurden über die Firma Eurofins Genomics (D) selbst konzipiert und bestellt. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/μL verdünnt und vor dem Gebrauch 1:10 verdünnt.

Primer	Primersequenz (5'→3')		Anlagerungstemperatur T _M
	Primer vorwärts	Primer rückwärts	
LGR6_V1	CCCCCTGACGGCTTACCTG		63,1°C
		AGAGACGCAGCTCCTCCAAGA	61,8°C
LGR6_V2	GGAATGGGAAGACCAAGTTGA		60,3°C
		AGAGAGACGCAGCTCCTCCAA	61,8°C
LGR6_3	TCACACATCCCAGGACAAGC		59,4°C
		AATTCAGGTCTAGCGACTGC	57,3°C
LGR6_all	CGAGTCCTGGAAGTGTCTC		58,8°C
		CTCCAATTTCCCAGATGCG	56,7°C

2.1.7 Antikörper

Tabelle Verwendeter primärer und sekundärer Antikörper

Antikörper:	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-GAPDH (FL-335) sc-25778 (Hase)	Western Blot	1:2000	Santa Cruz (USA)
Anti-IgG1-APC (Maus)	FACS (Isotyp-Kontrolle)	1:25	BD Bioscience (D)
Anti-IgG2B-PE	FACS (Isotyp-Kontrolle)	1:12,5	BD Bioscience (D)
Anti-IgG-FITC (Esel)	Immunfluoreszenz (Sekundärantikörper)	1:500	Santa Cruz (USA)
Anti-Maus IgG-HRP (Ziege)	Western Blot (Sekundärantikörper)	1:1000	Santa Cruz (USA)
Anti-Hase IgG-HRP (Ziege)	Western Blot (Sekundärantikörper)	1:2500	Santa Cruz (USA)
Anti-IgG-TR	Immunfluoreszenz	1:100	Santa Cruz (USA)

2. Material und Methoden

(Ziege)	(Sekundärantikörper)		
Anti-Lgr4/GPR48-PE (Mensch)	FACS	1:100	R&D Systems (USA)
Anti-Lgr6-APC (Mensch)	FACS	1:100	R&D Systems (USA)
Anti-LGR6 (F-5) Sc-2781 (Maus)	Immunfluoreszenz Western Blot	1:50	Santa Cruz (USA)
Anti-LGR6 (K-18) Sc-48236 (Ziege)	Immunfluoreszenz Western Blot	1:50 1:200	Santa Cruz (USA)
Anti-LGR6 MAB8458 (Mensch)	Immunfluoreszenz	1:200	R&D Systems (USA)

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Entität	Herkunft	Hersteller
BxPC3	humanes duktales Adenokarzinom des Pankreas	Primärtumor	American Type Culture Collection (ATCC)
DanG	humanes duktales Adenokarzinom des Pankreas	Primärtumor	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)
MiaPaCa 2	humanes duktales Adenokarzinom des Pankreas	Primärtumor	American Type Culture Collection (ATCC)
Panc1	humanes duktales Adenokarzinom des Pankreas	Primärtumor	American Type Culture Collection (ATCC)

2.1.9 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems (USA)
FlowJo® Data Analysis Software	Tree Star Inc. (USA)
GraphPad® PRISM 6	Graphpad Software Inc. (USA)
ImageJ	Public Domain
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation (USA)
Open Office	Apache Software Foundation (USA)
SoftMax Pro 5.4.1	Molecular Devices (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zur Vermeidung von Kontamination durch Mikroorganismen wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen, mit autoklavierten Geräten, Verbrauchsgegenständen und Lösungen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien sind adhärent wachsende Zelllinien und wurden daher mit Trypsin/ETDA bzw. allein mit EDTA/PBS gelöst. Alle Volumenangaben beziehen sich auf eine 150 cm² Zellkulturflasche (T150).

2.2.1.1 Zellkulturmedien

Für die Herstellung des Kulturmediums wurden 500 mL RPMI-1640 mit 50 mL (10%) fetalen Kälberserum (FCS) und 5 mL (1%) Penicillin/Streptomycin (P/S) ergänzt. Alle humanen PDAC-Zelllinien wurden in diesem Medium kultiviert.

2.2.1.2 Kultivieren, Passagieren und Einfrieren von PDAC-Zellen

Die humanen PDAC-Zellen wurden für alle Versuche zunächst in Zellkulturflaschen und -schalen gezüchtet, um eine ausreichende Zellzahl zu garantieren. Das Alter wurde in Form von Passagen dokumentiert. Zum Kultivieren der Zellen in einer T150-Zellkulturflasche wurden jeweils 1×10^6 Zellen ausgesät. Um möglichst konstante und annähernd natürliche Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen in einem Brutschrank gelagert. Dieser hielt eine konstante Temperatur von 37°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einer 5%igen CO₂-Sättigung. Das CO₂ als Anhydrit der Kohlensäure hält den pH-Wert konstant auf 7,4 im Hydrogencarbonatpuffer des Zellkulturmediums.

Der Wechsel des Nährmediums und die Trypsinierung adhärenter Zellen erfolgten abhängig von der Zelllinie zwei bis dreimal wöchentlich. Dabei wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit einer Glaspipette abgezogen und die Zellen jeweils mit 5 mL *Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen. Anschließend erfolgte das

2. Material und Methoden

Ablösen adhärenter Zellen mit Hilfe von 4 mL Trypsin-Ethylendinitrilotetraacetic Acid (EDTA) und anschließend eine Inkubation im Brutschrank für 5 min. bei 37°C und 5% CO₂-Sättigung.

Durch Anklopfen der Zellkulturflasche wurden die adhärenenten Zellen gelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 6 mL Zellkulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 mL Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1500 rpm und 4°C für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einer neuen T150-Zellkulturflasche ausgesät.

Zur Kryokonservierung der PDAC-Zellen wurden diese zunächst mittels Trypsin-EDTA gelöst und gezählt (siehe 2.2.1.3). Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen auf ein Kryogefäß in je 1 mL Einfriermedium verteilt. Das Einfriermedium bestand aus 95% FCS und 5% Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Kryoröhrchen wurden zunächst in Isopropanol gefüllte Einfrierbehälter für zwei Stunden bei -20°C gelagert und über Nacht bei -80°C aufbewahrt. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen den Boxen entnommen und in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren.

2.2.1.3 Bestimmen der Zellzahl

Um die genaue Zellzahl für weitere Experimente zu bestimmen wurde die sogenannte Neubauerzählkammer verwendet. Es wurden jeweils etwa 100 µL der Zellsuspension zur Zählung entnommen. In einer 96-Well-Platte wurden dann 20 µL der Zellsuspension mit 20 µL Tryptan-Blau eins zu eins gemischt und mit einer Pipette auf die Neubauerzählkammer aufgebracht. Die Zählkammer setzt sich aus vier Quadraten zusammen (siehe Abb.2.1), in denen die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Um die Gesamtzellzahl zu bestimmen, muss der Mittelwert der vier Quadrate errechnet und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Der Verdünnungsfaktor setzte sich in diesem Fall aus einer eins zu zwei Verdünnung zusammen, daher wurde der Mittelwert mit zwei multipliziert. Das Ergebnis wird mit 10.000 multipliziert, was der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension entspricht. Die Zellzahl wurde sowohl vor der Aussaat als auch vor dem Einfrieren gezählt. Für das Kultivieren der Zellen wurden jeweils 1×10^6 Zellen ausgesät. Bei der Zelllinie BxPC3, die größere Zellen aufweist, wurden aufgrund des langsameren Zellwachstums je 2×10^6 Zellen ausgesät.

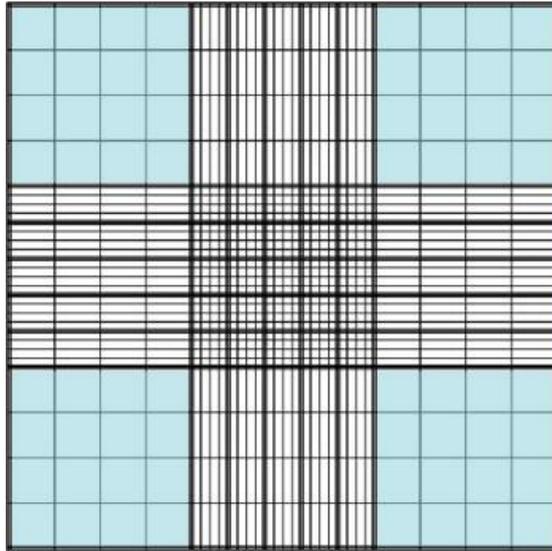


Abbildung 2.1: Neubauer-Zählkammer. (aus <http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>)

2.2.1.4 Behandlung von Zellen mit Gemcitabin und RSPO2

Gemcitabin und RSPO2 wurden vor dem Gebrauch und zur Lagerung unter sterilen Bedingungen mit dem Zellkulturmedium verdünnt. Die für die Experimente benötigten Konzentrationen wurden jeweils vor dem Gebrauch hergestellt und anschließend den Zellen zugegeben.

Das Cytidin-Analogon Gemcitabin hemmt die DNA-Synthese, indem es als falscher Baustein eingebaut wird und so zum Strangabbruch während der DNA-Replikation führt. Gemcitabin wurde als Fertiglösung mit einer Konzentration von 38 mg/mL verwendet und zunächst mit DPBS auf eine Konzentration von 1000 µg/mL verdünnt. Die Stocklösung wurde anschließend für den weiteren Gebrauch bei 4°C dunkel gelagert. Für die jeweiligen Experimente wurde das Gemcitabin auf eine Konzentration von 100 ng/mL in Zellkulturmedium zur Behandlung der PDAC-Zellen verdünnt.

Für die Expressionsanalysen wurden für die Standardisierung des Versuchsaufbaus je 200.000 Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 1 mL Zellkulturmedium für 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurde unter sterilen Bedingungen das Medium abgenommen und mit 3 mL Gemcitabinlösung (100 ng/mL) für 48 Stunden behandelt. Im Anschluss fanden RNA- und Proteinisolierung statt.

Der Wnt-Signalverstärker RSPO2 wurde in einer Konzentration von 200 µg/mL von der Firma *R&D Systems*[®] bezogen. Für die Lagerung wurde es unter sterilen Bedingungen

2. Material und Methoden

auf eine Stocklösung von 100 ng/mL mit PBS verdünnt und bei -20°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die Stocklösung bei Raumtemperatur aufgetaut und gebrauchsfertig auf 20 ng/mL mit Zellkulturmedium verdünnt.

Um einen standardisierten Versuchsaufbau zu gewährleisten, wurden für die Genexpressionsanalysen je 200.000 Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 1 mL Zellkulturmedium über 24 Stunden gelagert. Am nächsten Tag erfolgten unter sterilen Bedingungen die Abnahme des Kulturmediums und die Inkubation mit 2 mL RSPO2-Lösung (20 ng/mL) für 24 Stunden. Am Folgetag konnte die RNA isoliert werden.

2.2.2 RNA-Analysen

2.2.2.1 Isolieren der RNA

Die Isolierung von RNA aus PDAC-Zellen erfolgte mit dem *RNeasy Mini-Kit* von Qiagen. Pro Reaktionsgefäß wurden durchschnittlich 350 µl RNA-Lysepuffer mit 1% β-Mercaptoethanol zu durchschnittlich 1×10^7 Zellen gegeben und so gelöst. Das entstandene Lysat wurde anschließend mit Hilfe eines biopolymeren Zerkleinerungssystems in Form einer Mikrozentrifugensäule homogenisiert. Das *QIAshredder*-System ersetzte hierbei die Spritz- und Nadel-Homogenisierung. Neben der Senkung des Verlustes von Probenmaterial garantiert es auch die Entfernung von unlöslichen Ablagerungen und Kreuzkontaminationen zwischen den Proben.

Nach dem Lösen des Lysats aus der Zentrifugensäule, wurde die Gesamt-RNA durch selektive Bindung an eine Silicanmembran der *RNeasy*-Zentrifugensäule gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Zellüberreste und verbliebene DNA wurden über mehrere Waschrunde mit verschiedenen Puffern gemäß Protokoll abgewaschen. Nach Elution der RNA mit RNase-freiem Wasser und Messung der RNA-Konzentration (siehe 2.2.2.2) wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung der RNA- Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte unter Verwendung des *NanoDrop2000* Spektrophotometers durch Messung der Absorption (A) bei einer für RNA typischen Wellenlänge von 260 nm.

Über das *Lambert-Beer'sche-Gesetz* ($A = E \times c \times L$) wird mit einer stoffspezifischen Konstante, dem Absorptionskoeffizienten (E), der Konzentration (c) und der optischen Schichtdicke (L) in der Küvette die Konzentration bestimmt.

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, als Nullwert diente das zur Lösung der Nukleinsäuren benutzte RNase-freie Wasser. Aus den Mittelwerten wurde die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet.

Für RNA entspricht der Wert 1 einer Konzentration von 40 µg/mL bei einer Absorption von 260 nm (A_{260}). Eine Aussage über den Reinheitsgrad der RNA-Lösung kann über das A_{260}/A_{280} -Verhältnis getroffen werden, da Proteine monochromatisches Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Bei einer optischen Dichte von weniger als 1,8 ist eine Kontamination mit Proteinen möglich.

2.2.2.3 Herstellung von cDNA

Für die Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription wurde entsprechend der Empfehlung des Herstellers Qiagen das *QuantiTect-Reverse-Transkription-Kit* verwendet. Die Umschreibung erfolgt hierbei in zwei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt wird zur Vermeidung von Verunreinigungen der cDNA mit genomischer DNA (gDNA) vor der Transkription ein sog. DNA-Verdau mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Tab. 2.1) vorgenommen.

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µL
RNA (1µg)	x µL (entsprechen RNA- Konzentration)
RNase freies Wasser	x µL
Gesamtvolumen	14 µL

Tabelle 2.1: Reagenzien und Volumina für den DNA-Verdau.

2. Material und Methoden

Im zweiten Reaktionsschritt erfolgt die eigentliche Umschreibung der mRNA in cDNA. Das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert dabei die Umschreibung von RNA in cDNA. In Anwesenheit von Primern, in Form kurzer Oligonukleotide, entsteht unter der RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität ein RNA-DNA-Hybridstrang (Tab. 2.2). Zum Lösen des entstandenen Tochterstranges besitzt die Reverse Transkriptase einen eigenen Abschnitt, den RNase-H Anteil. Nach der Trennung der Stränge voneinander erfolgt durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität die Vervollständigung zum cDNA-Doppelstrang.

Reagenzien	Volumen pro Reaktion
Quantitect Reverse Transkriptase	1 µL
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µL
RT Primer Mix	1 µL
RNA (1 µg) aus gDNA Verdau	14 µL
Gesamtvolumen	20 µL

Tabelle 2.2: Reagenzien und Volumina für die Reverse Transkription.

Zeit	Temperatur	Schaubild
15 min.	42°C	
3 min.	95°C	
Lagerung	4°C	

Abbildung 2.1: Reaktionsprotokoll der Reverse-Transkriptase-Reaktion.

Tabelle 2.3: Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription.

2.2.2.4 Amplifikation der cDNA mittels konventioneller Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht es bestimmte DNA-Sequenzen exponentiell zu vermehren. Hierzu werden Matrizenstrang, zwei antiparallel-bindende Primer, Desoxribonukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine temperaturabhängige Taq-Polymerase in einem geeigneten Milieu zusammengegeben (Tab. 2.4). Durch Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 94°C werden die doppelsträngigen Matrizenstränge denaturiert und stehen zur Primerbindung bereit. Hierbei binden Primer bei einer für sie optimalen Anlagerungstemperatur (60°C) spezifisch an den Matrizenstrang. Die darauffolgende Temperaturerhöhung auf 72°C bietet der Taq-Polymerase die optimalen Reaktionsbedingungen zur Elongation des Komplementärstrangs. Durch mehrfache Wiederholung dieser Zyklen kann ein bestimmter Gen-Abschnitt exponentiell vermehrt werden (Tab. 2.5).

Die PCR wurde mit dem *HotStarTaq Plus DNA Polymerase-Kit* der Firma Qiagen durchgeführt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Komponenten	Volumen pro Reaktion
10x CoralLoadPCR Buffer	2,5 µL
dNTP Mix	0,5 µL
Primer Mix	1 µL
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0,125 µL
cDNA	1 µL
RNase- freies Wasser	19,875 µL
Gesamtvolmen	25 µL

Tabelle 2.4: Reagenzien und Volumina für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

2. Material und Methoden

Zeit	Temperatur	Schaubild	
5 min.	95°C	<p>Abbildung 2.2: Reaktionsprotokoll der qPCR.</p>	
30 sek.	95°C		
30 sek.	60°C		30x
40 sek.	72°C		
8 min.	72°C		
Lagerung	4°C		

Tabelle 2.5: Reaktionsprotokoll der qPCR.

2.2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach der Amplifizierung der Größe nach aufzutrennen und nachzuweisen, wurde die DNA-Agarosegelelektrophorese benutzt. Das Gel wurde aus diesem Grund mit einem Fluoreszenzfarbstoff gegossen, der unter UV-Licht DNA-Fragmente sichtbar macht.

Wird eine elektrische Spannung angelegt, bewegen sich die Fragmente, aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in der DNA, in Richtung der positiv geladenen Kathode. Dabei ist es wichtig, die Agarose im Gel entsprechend der aufzutrennenden Fragmentgrößen zu konzentrieren. Je kleiner ein Fragment ist, desto schneller wandert es durch das Gel und dementsprechend höherprozentig sollte der Agaroseanteil im Gel sein und umgekehrt.

Hierzu wurde Agarose in einer Konzentration von 1,5% in 1xTAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach einer kurzen Abkühlphase wurde ein fluoreszierender Farbstoff (*Nancy-520 DNA Gel-Farbstoff*) dem Gel beigemischt, welches eine höhere Sensitivität als Ethidiumbromid besitzt und ein stabileres Färbeprodukt bildet. Die Agarose erstarrte nach etwa 20 min. zu einem Gel, welches anschließend in eine mit 1xTEA-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt wird.

Nach qPCR-Amplifikation wurden die DNA-Produkte zentrifugiert und jeweils 25 µL der Probe mit 5 µL 6x Ladepuffer versetzt. Anschließend wurden 10 µL einer jeden Probe auf das Gel aufgetragen. Die Größe der Fragmente konnte unter Zuhilfenahme eines Größenstandards (*1 Kb Plus DNA Leiter*) geschätzt werden. Bei einer Spannung von 200 V wurden die Fragmente über 20 min. im Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion des

interkalierend eingelagerten Fluoreszenzfarbstoffes konnte mittels UV-Licht (312 nm) durchgeführt werden.

2.2.2.6 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Die Real-Time PCR (qRT-PCR) ist eine Methode die auf dem Prinzip der qualitativen PCR beruht. Durch die Messung eines Fluoreszenzsignales am Ende eines jeden Zyklus ist eine zusätzliche Quantifizierung des Ausgangsmaterials möglich.

Für die Quantifizierung wurde SYBR-Green verwendet. SYBR-Green ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff der eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA aufweist. Der entstehende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max}= 494$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max}= 521$ nm. Mit der Zunahme der Anzahl doppelsträngiger DNA nimmt auch die Fluoreszenz proportional zu. Überschreitet die Fluoreszenz erstmalig die Hintergrundstrahlung signifikant, so bezeichnet man den zugehörigen Zyklus der PCR als *Cycle Threshold* (Ct) oder auch Zyklusschwelle. Durch diese Methode lässt sich die Zunahme entstehender PCR-Produkte optisch verfolgen. In einem Zwei-Schritt-Zyklus werden die komplementären DNA-Stränge durch Temperaturerhöhung auf 95°C denaturiert und das Fluoreszenzsignal sinkt unter die Detektionsgrenze. In der anschließenden Abkühlungsphase, auf eine für Primer spezifische Temperatur (60°C), binden die Primer an eine spezifische DNA-Sequenz innerhalb des Matrizenstrangs und die Synthese des neuen DNA-Abschnitts beginnt. Darauf folgend steigt die Summe der doppelsträngigen DNA im Ansatz und folglich wird mehr SYBR-Green in die neue DNA eingelagert. Man kann somit ein zunehmendes Fluoreszenzsignal messen (Tab. 2.6).

Der Nachteil dieser Methode ist, dass SYBR-Green jede DNA unspezifisch bindet. So werden auch durch unspezifische Bindung zweier Primer, sog. Primer-Dimere oder unspezifische PCR-Produkte, gemessen.

Aus diesem Grund muss am Ende jeder qRT-PCR eine Qualitätskontrolle der entstandenen PCR-Produkte erfolgen. Dazu eignete sich die Schmelzkurvenanalyse ebenso wie die Gelelektrophorese.

Bei der Schmelzkurvenanalyse nutzt man die Tatsache, dass sich jedes entstehende Fragment bei einer spezifischen Schmelztemperatur auftrennt und das Fluoreszenzsignal abnimmt. Die Schmelztemperatur ist abhängig von der jeweiligen Größe und der Basenpaarzusammensetzung. Je größer ein Fragment ist und je größer der Anteil an Guanin- und Cytosin-Basen ist, desto höher muss die Temperatur sein, um das Fragment

2. Material und Methoden

aufzutrennen. So weisen Primer-Paare eine niedrige Schmelztemperatur auf und es lässt sich durch grafische Darstellung des Fluoreszenzabfalls eine Unterscheidung zwischen Primer-Paaren und spezifischen PCR-Produkten treffen. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte nach jeder durchgeführten qRT-PCR.

Zusätzlich wurden stichprobenartig Gelelektrophoresen durchgeführt und die Größe der PCR-Produkte mit denen des Herstellers verglichen.

Um die Ergebnisse der qRT-PCR quantifizieren zu können, muss der Ct-Wert eines sogenannten Haushaltsgenes bestimmt werden. Haushaltsgene sind Gene, welche unabhängig von Zellstadium, Zelltyp und äußeren Einflüssen konstant exprimiert werden. Sie sind für basale Zellfunktionen zuständig. Für alle Versuche wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgte das Ansetzen der qRT-PCR in einer sterilen DNA-Arbeitsbank von *Uniequip* (D). Bei der Durchführung der qRT-PCR wurde das *QuantiFast SYBR- Green Kit* von Qiagen verwendet und nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die Messungen erfolgten mit dem *StepOne Real-Time PCR Systems* in technischen Duplikaten bzw. Triplikaten.

Zeit	Temperatur	Schaubild
5 min.	95°C	
10 sek.	95°C	
30 sek.	60°C	
Schmelzkurve	60°C+0,3°C/sek	
Lagerung	30°C	

Abbildung 2.3: Reaktionsprotokoll der Real-Time-PCR.

Tabelle 2.6: Reaktionsprotokoll der Real- Time PCR.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Differenz der Ct-Werte einer jeden Probe zwischen dem Referenzgen GAPDH und dem Zielgen berechnet (ΔCt).

Differenz zum Zielgen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenz}}$$

Bei der qRT-PCR wird bei einer Effizienz von 100% in jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt und es kommt somit zu einem exponentiellen Wachstum. Zur Darstellung der PCR-Einzelergebnisse wurden $2^{(-\Delta Ct)}$ Werte berechnet.

2.2.2.7 Konzipierte Primer für die LGR6-Splicevarianten-Analyse

Für die Untersuchung der LGR6-Splicevarianten waren keine vorgefertigten Primer erhältlich. Aus diesem Grund erfolgte über die Onlineplattform Eurofins Genomics® eine spezifische Primersequenzierung für die LGR6-Splicevarianten 1-3. Unter Vorgabe einer Zielsequenz, der Ableserichtung des Primers (3'-5'-Richtung oder 5'-3'-Richtung) sowie die Angabe der Zielnukleotide innerhalb der angegebenen Zielsequenz werden bis zu fünf mögliche Primer sequenziert. Die Sequenzen der konzipierten Primer sind in der Tabelle in Abschnitt 2.1.6.1 aufgeführt.

Die Primer wurden in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt, nachdem eine Verdünnungsreihe durchgeführt wurde. Zur Funktionsüberprüfung der konzipierten Primer wurden die Produkte aus der Verdünnungsreihe in der PDAC-Zelllinie BxPC3 probeweise auf ein Agarosgel aufgetragen und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3.8). BxPC3 zeigte in den Vorexperimenten mit den Primern der Firma Qiagen die höchste mRNA-Expression für LGR6 (Hs_LGR&_1_SG) und die Splice-Variante 2 (Hs_LGR6_va.1_SG) (Abb. 3.8). Zur Verifizierung der Spezifität der selbstkonstruierten Primer wurden die relativen Genexpressionen der von der Firma Qiagen erstellten Primer mit den Ergebnissen der selbstkonzipierten Primer verglichen (Abb. 3.8). Die Ergebnisse sind im Abschnitt 3.1.4.2 dargestellt.

2.2.3 Proteinanalysen

2.2.3.1 Isolieren von Proteinen

Zur Isolierung von zytoplasmatischem, membranständigem und nukleärem Protein aus PDAC-Zellen wurde ein standardisierter Versuchsaufbau verwendet. Dazu wurden jeweils 200.000 Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät und 48 Stunden kultiviert. Vor dem Lösen der Zellen wurden diese zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend in 800 µL PBS mit dem Zellschaber abgelöst. Das nach Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde in 200µl RIPA-Puffer (Thermo Scientific) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis gelagert. Um eine optimale Proteinausbeute zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen im Abstand von fünf Minuten mittels Vortexer durchgemischt. Um den Proteinabbau nach der Zellyse zu verhindern, ist es notwendig vor dem Gebrauch des Proteinlysepuffers, Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzuzufügen. Dazu wurde ein *Protease Inhibitor Cocktail* (Promega) nach Angabe des Herstellers benutzt.

Um das Protein von übrigen Zellbestandteilen zu trennen, erfolgte eine erneute Zentrifugation (14.000xg) der Suspension für 20 Minuten bei 4°C. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand, in dem sich das Protein befand, wurde entnommen, aliquotiert und nach Proteinkonzentrationsbestimmung bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Quantitative, photometrische Proteinbestimmung

Die *Pierce BCA Protein Probe* kombiniert die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} - Ionen im alkalischen Milieu mit der hoch sensitiven und selektiven kolorimetrischen bzw. absorptionsphotometrischen Bestimmung der Kupfer-Kationen (Cu^{+}) durch Bicinchoninsäure (BCA). Im ersten Schritt der Biuretreaktion entsteht ein Natriumkaliumtartat enthaltender, hellblauer Chelatkomplex aus Cu-Ionen und den Aminosäure-Seitenketten der Peptide in einem alkalischen Milieu. Im zweiten Schritt reagiert BCA mit dem reduzierten Cu^{+} -Ion. Das intensiv violett-gefärbte Reaktionsprodukt resultiert aus der Bildung eines Komplexes bestehend aus zwei BCA-Molekülen mit einem Cu^{+} -Ion. Der BCA- Cu^{+} -Komplex ist wasserlöslich und weist eine starke lineare Absorption bei 562 nm mit zunehmender Proteinkonzentration auf.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fischer) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 25 µL der

2. Material und Methoden

Probe in 100 μL RIPA-Puffer verdünnt. Jeweils 50 μL der Proben und der nach Protokoll erstellte BSA-Standard wurden mit 200 μL Arbeitslösung (*Pierce Lösung A + B*, im Verhältnis 50:1) in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurde die Extinktion bzw. optische Dichte bei 562 nm im *Bio Photometer* (Eppendorf) gemessen und mit Hilfe einer BSA-Standardkurve die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.3.3 ELISA

Der *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Verfahren zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen, wie Antikörpern, Antigenen, aber auch Viren, Hormonen oder Toxinen in wässriger Lösung.

Um die Rolle einer möglichen Autoaktivierung des Wnt-Signalweges durch die Tumorzellen selbst zu untersuchen, wurde die Konzentration von RSPO1 und RSPO4 mit Hilfe eines sogenannten Sandwich ELISA's untersucht.

Beim verwendeten Sandwich ELISA musste vor der Detektion durch einen enzymgebundenen Antikörper, eine Fläche mit Erfassung-Antikörper (Capture Antibody) überzogen werden (Coating). Dadurch wird eine Oberfläche geschaffen, an der das Antigen gebunden werden kann und Proteine, die nicht untersucht werden, werden im Anschluss abgewaschen.

Das Vorhandensein eines Antigenes wird mit Hilfe eines enzymgekoppelter Antikörpers untersucht. Ein zugegebenes farbloses Substrat reagiert anschließend mit dem an den Antikörpern gekoppelten Enzymen und ein farbiges, leicht zu detektierendes Produkt entsteht. Die Menge des entstehenden farbigen Produkts ist der Enzymkonzentration und somit der Proteinkonzentration proportional.

Nach einer Inkubationszeit über Nacht wurden 100 µL des aus den Zellen isolierten Proteins auf die beschichteten Wells einer 96-Well-Platte aufgetragen und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nach Bindung der zu untersuchenden Proteine an die Oberfläche wurde die Platte mit 0,05% Tween® in PBS (jeweils 400 µL) dreimal fünf Minuten gewaschen, um nicht zu detektierende Antigene zu entfernen. Im Anschluss wurden 100 µL eines verdünnten, spezifischen Detektions-Antikörpers in jedes Well pipettiert und erneut bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert.

2. Material und Methoden

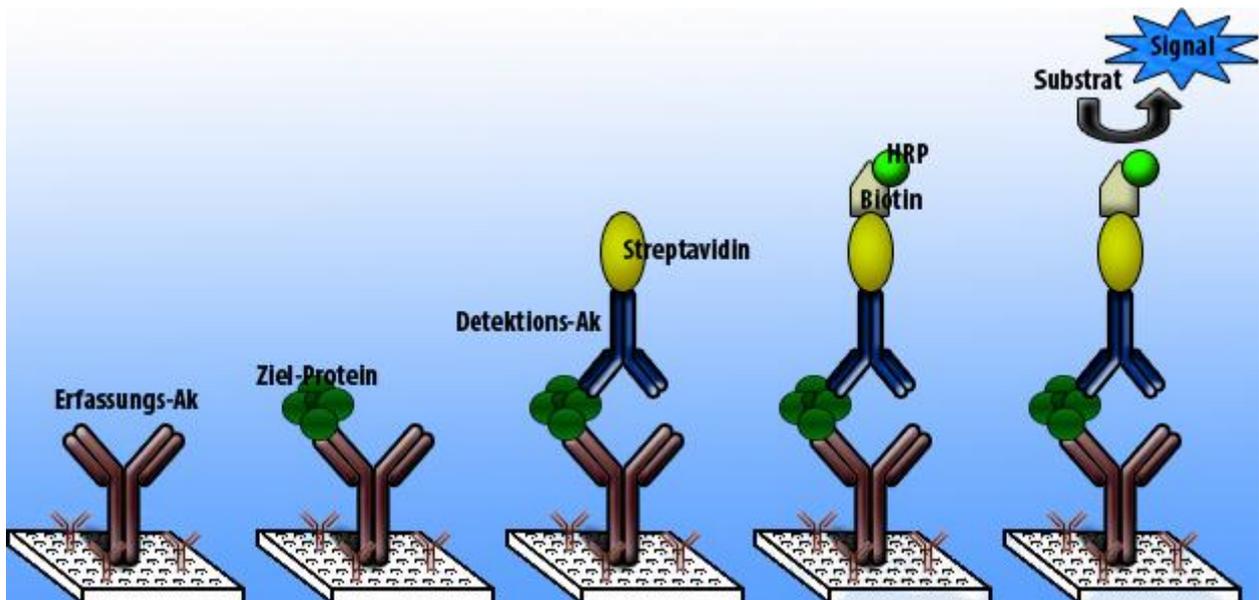


Abbildung 2.2: Sandwich-ELISA. Die Erfassungsantikörper (violett) binden über Nacht an den Boden einer 96-Well-Platte. Die Proben mit dem Ziel-Protein (grün) werden inkubiert und binden an den Erfassungs-Ak. Zur Visualisierung des gebundenen Ziel-Proteins werden Detektionsantikörper (blau) zugegeben und es entsteht ein Enzym-gekoppelter Antikörper-Antigen-Antikörper. Durch Hinzugeben des passenden Substrates bestehend aus Streptavidin, Biotin und HRP kann ein nachweisbares Reaktionsprodukt umgesetzt werden.

Durch einen erneuten Waschschriff mit PBS-Tween® wurden überschüssige Antikörper entfernt, gefolgt von der Zugabe von Streptavidin-HRP (100µL) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Streptavidin ist ein Homotetramer, jede Untereinheit formt hoch affine nicht-kovalente Bindungen mit dem Vitamin Biotin und kann somit biotinylierte Proteine erfassen. Die gekoppelte *horseradish peroxidase* (HRP) generiert unter Zugabe eines chemilumineszenten Substrates (100 µL) ein Lichtsignal. Nach einer Inkubation von zehn Minuten, bei Raumtemperatur muss darauf geachtet werden, direktes Licht zu vermeiden und die Reaktion wurde mit 50 µL einer Stop-Lösung beendet. Anschließend wurde mit dem *Bio Photometer* (Eppendorf) die Absorption bei 450 nm und 570 nm gemessen. Die Absorptionswerte bei 570 nm wurden anschließend von dem jeweiligen Absorptionswert bei 450 nm abgezogen, um den optischen Fehler der Platte, der entsteht, indem paralleles Licht nicht parallel, sondern aufgrund unterschiedlicher Oberflächenkrümmungen der Platte schräg auftrifft, zu korrigieren. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardkurve mit dem Programm GraphPad Prism® berechnet.

Zur Durchführung des ELISAs wurde das *DuoSet ELISA-Kit* der Firma *R&D Systems*® verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3.4 Durchflusszytometrie

2.2.3.4.1 Färbung von Zelloberflächenmolekülen für die Durchflusszytometrie

Für die extrazelluläre Antikörperfärbung wurden PDAC-Zellen aus einer T150-Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst und jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml Zellkulturmedium gelöst, in ein Rundboden-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden zur Prävention von Zelltod und Internalisierung der zur untersuchenden Rezeptoren in das Zellinnere für die Zeit der Färbung und der anschließenden Messung auf Eis gelagert.

Nach dem Zentrifugieren (500xg, 5 min., 4°C) wurden die Zellen in 2 mL FACS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, so dass eine Zellsuspension von 1×10^6 Zellen in 100µL FACS-Puffer in den Röhrchen verblieb. Die gekoppelten Antikörper wurden in einem vom Hersteller empfohlenen Verhältnis verdünnt, der Zellsuspension zugegeben und gut resuspendiert. Die anschließende Inkubation bei 4°C für 20 Minuten fand unter Lichtausschluss statt. Nach Inkubation wurden die überschüssigen Antikörper mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen und anschließend zentrifugiert.

Für Messung im *BD FACSCaliburtm* wurden die Zellen in 300 µL FACS- Puffer gelöst.

2.2.3.4.2 Messung der Oberflächenmoleküle mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Um das Vorhandensein eines Oberflächenrezeptores zu untersuchen, ist die Durchflusszytometrie eine geeignete Methode.

Bei diesem Verfahren werden Zellen aufgrund ihrer Lichtstreuungseigenschaft charakterisiert. Die Zellen werden mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über Sekundärantikörper an Fluoreszenzfarbstoffen gebunden sind, markiert. Ein Hüllstrom führt die gefärbten Zellen einzeln an einem Laser mit einer definierten Wellenlänge, der als Lichtquelle fungiert, vorbei. Dabei werden Fluorochrome der Fluoreszenzfarbstoffe durch Licht zur Emission angeregt und das auftreffende Licht zeitgleich zerstreut. Das Streulicht wird anschließend von Kollektoren aufgefangen und mit Hilfe eines Computers analysiert. Die emittierte Fluoreszenz korreliert mit der Rezeptordichte der gemessenen Zellen.

2. Material und Methoden

Das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet und korreliert näherungsweise mit der Größe einer Zelle. Um 90° reflektiertes Licht wird als Seitwärtslicht (SSC) bezeichnet und korreliert annähernd mit der Granularität der Zelle.

Jede Zelle besitzt eine Grundfluoreszenz, die in ihrer Stärke erheblich unter der emittierten Fluoreszenz liegt. Aus diesem Grund werden Größe und Granularität der gemessenen Signale linear aufgezeichnet, die Fluoreszenz hingegen logarithmisch.

Für diese Arbeit wurde der *BD FACSCaliburtm multiwell AutoSampler* (BD Biosciences, D) verwendet. Die erhobenen Daten wurden mit der *FloJo[®]* Data Analysis Software (Tree Star Inc., USA) analysiert.

2.2.3.5 7-Aminoactinomycin-D-Färbung (7-AAD-Färbung)

7-Aminoactinomycin D (7-AAD) ist ein fluoreszierendes Derivat des Actinomycin D. Es bindet selektiv in Guanin-Cytosin-reichen Regionen der DNA. Abhängig von der Konzentration kann mit Hilfe von 7-AAD zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Die Verwendung von 0,5-5 µg/mL 7-AAD erlaubt es tote, Zellen anzufärben. Höhere Konzentrationen von 10-20 µg/mL ermöglichen eine Unterscheidung zwischen lebenden Zellen (7-AAD_{negativ}), apoptotischen Zellen (7-AAD_{schwach}) und toten Zellen (7-AAD_{stark}). Bei diesem Prinzip wird sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass die Permeabilität der Zellmembran und folglich die Fluoreszenzintensität in toten Zellen hoch ist, in apoptotischen Zellen niedrig ist und 7-AAD für lebende Zellen nicht membrandurchlässig ist [88].

In dieser Arbeit war die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen ausreichend. Zur Färbung toter Zellen mittels 7-AAD wurde das *7-AAD Viability Staining Solution Set* von eBioscience[®] verwendet. Vor jeder durchflusszytometrischen Messung erfolgte die 7-AAD-Färbung mit einer Konzentration von 0,5 µg/mL. Die Zellsuspension wurde bei 4°C gelagert und nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten unter Lichtabschluss mit den Messungen begonnen.

2.2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteinlysate mittels Western Blot analysieren zu können, müssen Proteine zunächst nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu diente die *Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese* (SDS-PAGE).

Durch diese Methode wird die Eigenladung von Proteinen aufgehoben und sie können allein aufgrund ihres Molekulargewichtes in einem Gel aufgetrennt werden. Polypeptidketten weisen eine unterschiedliche Konformität und unterschiedlich stark geladene Seitenketten auf. Die Seitenketten werden mit Hilfe der SDS-PAGE gelöst und mit einer einheitlichen negativen Ladung abgesättigt. Wie bei der Agarose-Gel-Elektrophorese wird dann eine Spannung angelegt. Kleine Proteine passieren das Gel in Richtung der Kathode schneller als große. Unter diesen Bedingungen ist die zurückgelegte Strecke proportional zu ihrem Molekulargewicht und mit Hilfe eines verwendeten Größenstandards kann auf das Molekulargewicht eines Proteins geschlossen werden.

Durch Änderungen der Polyacrylamid-Konzentration, kann die Eigenschaft eines Gels beeinflusst werden. Zum Auftrennen der zu untersuchenden Proteine wurde ein Gel mit einer höheren Acrylamid-Konzentration gegossen (Trenngel, Tab. 2.8). Das Trenngel wurde dabei in 1 mm Schichtdicke zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zum Sammeln bzw. Anhäufen der Proteinproben in einer Ebene, wurde ein Gel gewählt, welches eine niedrigere Konzentration Acrylamid aufwies, das sog. Sammelgel (Tab. 2.8). Unter Querverkettung des Bisacrylamid verbinden sich Acrylamid-Monomere zu Polyacrylamid. Bei dieser Reaktion fungieren zugegebenes *Amoniumpersulfat* (APS) als Initiator und *Tetramethylethylendiamin* (TMED) als Katalysator. Da Sauerstoff die Polymerbildung hemmt, wurde auf das erhärtete Sammelgel Isopropanol gegeben. Durch die Zugabe konnte einerseits sichergestellt werden, dass die Reaktion unter Sauerstoffabschluss ablief, andererseits wurde eine glatte Trennkannte zum Sammelgel erreicht. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol abgegossen und Reste mit Filterpapier entfernt, das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm für die Taschen eingesetzt. Nach Polymerisierung wurde das gesamte Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt, welche mit einem Gemisch aus der organischen Base Tris, Glycin, SDS und Wasser, dem sog. Laufpuffer (Tab. 2.7) gefüllt wurde.

2. Material und Methoden

Reagenz	Volumen
Tris Base	30 g
Glycin	144g
SDS	10 g
VE- H ₂ O	1000 mL

Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines 10x Laufpuffers.

Nach Entfernung des Kammes wurden die Taschen mit je 50 µg Protein beladen. Bevor die Proteinproben aufgetragen werden konnten, wurden diese mit *4x Laemmli Sample Puffer* (BioRad) im Verhältnis 1:4 vermischt. Der Puffer enthält β-Mercaptoethanol, welches durch Reduktion Disulfidbrücken aufspaltet. Anschließendes Erhitzen der Proben im Heizblock (95°C, 5 min.) dient dem Aufbrechen von Wasserstoffbrücken und dem Strecken der Moleküle, wodurch Sekundär- und Tertiärstrukturen unterbrochen werden. Als Größenstandard wurden 10 µl des *Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards* (Bio-Rad) verwendet. Vor dem Auftragen der Proben, wurde das Gel für zehn Minuten bei 70 V aktiviert. Im Anschluss wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels aufgetragen und für 10-15 Minuten bei 70 V laufen gelassen, bis die Proben in das Trenngel übergetreten waren. Dann wurde die Stromstärke auf 120 V pro Gel erhöht, bis das *Bromphenolblau* im Probenpuffer komplett das Gel durchwanderte.

	Trenngel (15%, < 20 kDa)	Sammelgel
H ₂ O	3,2 mL	2,3 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL	-
1 M Tris (pH 6,5)	-	380 µL
PolyAcrylamid	4,1 mL	380 µL
10% SDS	100 µL	30 µL
10% APS	100 µL	30 µL
Temed	10 µL	5 µL

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele für SDS-PAGE.

2.2.3.7 Western Blot

Um Proteine immunhistochemisch untersuchen zu können, müssen die in der Elektrophorese aufgetrennten Polypeptide aus dem Acrylamid-Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Durch Elektroblothing-Verfahren können Proteine über Anlegen eines rechtwinklig zum Gel verlaufenden elektrischen Felds auf eine Membran mit Proteinbindungseigenschaften übertragen werden (Western-Blotting). Das so entstehende Bandenmuster spiegelt die Verteilung der Proteine im Gel wieder. Als Trägerelement wurde eine Nitrozellulose-Membran gewählt. Die Bindung an die Membran erfolgt durch ionische und polare Wechselwirkungen.

Der Transfer erfolgte im Blot-System mittels Tank-Blotter (*X-Cell II™ Blot Module*, Thermo Fisher). Nach der denaturierenden SDS-Gel-Elektrophorese (siehe 2.2.3.6) wurde das Gel in Transferpuffer eingelegt und die Kammer für den Proteintransfer vorbereitet.

Reagenz	Volumen
Tris Base	30 g
Glycin	144 g
VE- H ₂ O	1000 mL

Tabelle 2.9: Zusammensetzung eines 10x Transferpuffers

Für die verwendete „Sandwich-Methode“ wurden in doppelter Lage ein Schwamm auf die zur Anode gerichtete Seite der Blott-Kassette gelegt, darüber eine Lage Filterpapier und das in Transferpuffer eingelegte Polyacrylamid-Gel. Beim Auflegen der Membran auf das Gel wurde darauf geachtet, dass keine Blasen zwischen Nitrozellulose und Gel entstanden. Auf die Membran wurden dann ein Filterpapier und erneut zwei Schwämme gelegt. Das so entstandene „Sandwich“ ermöglicht den Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung der Kathode auf die Nitrozellulose-Membran. Die Blot-Kassette wurde anschließend vorsichtig in den Blot-Tank eingespannt und der Transfer 1,5 Stunden bei einer maximalen Stromstärke von 220 mA in gekühlter Umgebung (4°C) durchgeführt.

Im Anschluss konnte die Membran vorsichtig aus der Blot-Kassette entfernt werden. Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem 5% Milchpulvergemisch auf einem Rüttler (300 U/min) inkubiert. Die Milchpulverlösung wurde anschließend verworfen und die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper, gelöst in 5% Milchpulvergemisch,

2. Material und Methoden

inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde durch dreimal fünfminütiges Waschen in PBS-Tween® der ungebundene primäre Antikörper abgewaschen und mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper eine Stunde inkubiert. Das erneute dreimal fünfminütiges Waschen der Membran in PBS-Tween® entfernte den ungebundenen sekundären Antikörper. Zur Detektion wurde das *GE Healthcare Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents* Kit (Thermo Fisher) verwendet. Die Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die in durchsichtiger Plastikfolie eingelegte Membran gleichmäßig verteilt und in eine Entwicklungskassette gegeben. In einer Dunkelkammer wurde auf die mit Plastikfolie bedeckte Membran ein blau-sensitiver Autoradiographiefilm (*GE Healthcare Amersham™ Hyperfilm™ ECL*, Thermo Fisher) gelegt, der die von den Antikörper-markierten Proteinen ausgesendeten Lichtemissionen sichtbar machte.

2.2.3.8 Immunzytochemie

Die Zytochemie ist eine Methode zur Untersuchung von Zellen auf die Anwesenheit bestimmter Zellstrukturen. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Proteine kann sowohl das Vorhandensein als auch die Lokalisation innerhalb der Zelle untersucht werden (Immunzytochemie). Bei der hier verwendeten Technik handelt es sich um eine indirekte Färbung, bei der an ein Fluorochrom gebundener sekundärer Antikörper an einen nicht gekoppelten primären Antikörper bindet.

2.2.3.8.1 Herstellung der Zellschnitte

Um die PDAC-Zellen in ihrer natürlichen morphologischen Struktur nicht zu beeinflussen, wurden in einer 6-Well Platte unter sterilen Bedingungen je ein steriles Deckglaschen platziert. In jedes Well wurden dann 1×10^5 Zellen in 1 mL Medium ausgesät, sodass die Zellen auch auf dem Deckglaschen anwuchsen.

Nach 24 Stunden wurden die Deckglaschen auf Objektträger platziert. Um zu verhindern, dass die Zellen Oberflächenrezeptoren einziehen konnten, wurden die nächsten Schritte bis zur Fixierung auf Eis ($\sim 4^\circ\text{C}$) durchgeführt. Nach Entfernen des Mediums wurden die Gläschen mit PBS-Tween® fünf Minuten gewaschen. Zum anschließenden Fixieren der Zellen, wurde 4% Formaldehydlösung verwendet und je 2 mL pro Objektträger für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf der Zeit konnte das Formaldehyd mit PBS-Tween® dreimal für fünf Minuten abgewaschen und die Deckglaschen weiterbehandelt werden.

2.2.3.8.2 Immunfluoreszenz-Färbung

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Fixierung der Zellen wurden die Deckglaschen auf einem Objektträger platziert und beschriftet. Um zu verhindern, dass die Deckglaschen verrutschen und später aufgetragene Flüssigkeiten abfließen, wurden diese mit einem speziellen Stift (*Dako-Pen*, Aligent Technologies) umrandet.

Da auch eine intrazelluläre Lokalisation der Zielproteine möglich war, musste die Zellmembran permeabilisiert werden. Dies erfolgte mit einem 1%-igen *Triton-X-100*-PBS Gemisch, welches auf die gewaschenen Deckglaschen für zehn Minuten bei

2. Material und Methoden

Raumtemperatur auf einem Schwenker gegeben wurde. Der anschließende Peroxidase-Block dient der Reduktion ungewünschter Hintergrundfärbung. Bei immunhistochemischen Nachweismethoden kann es durch gewebeigene, sog. endogene Peroxidaseaktivität, zu Interaktionen zwischen den an den sekundären Antikörper gekoppelten Strukturen kommen. Diese Reaktion kann vermieden werden, indem die gewebeigene Peroxidase durch das enthaltene Wasserstoffperoxid (H_2O_2) vor der immunhistochemischen Färbung blockiert wird. Der Peroxidase-Block erfolgte mit einem Gemisch aus 16,7 mL Methanol (100%), 3,8 mL H_2O und 0,5 mL H_2O_2 .

Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% *bovinen Serumalbumin* (BSA)/PBS-Tween® für eine Stunde in einer Feuchtkammer geblockt. Danach erfolgte nach dreimal fünf Minuten Waschen in PBS-Tween® die Inkubation mit dem Primärantikörper. Der primäre Antikörper wurde in 5% BSA/PBS-Tween® verdünnt und über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden überschüssige, nicht gebundene Antikörper dreimal fünf Minuten mit PBS-Tween® abgewaschen und die Schnitte mit dem in 5% BSA/PBS verdünnten sekundären Antikörper für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgten mehrfache Waschschrte mit PBS-Tween®. Die sekundäre Antikörperfärbung erfolgte mit fluoreszierenden Farbstoff-gekoppelten Antikörpern. Dazu verwendet wurden der grüne Farbstoff *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) und der rot fluoreszierende Farbstoff *TexasRed* der Firma Santa Cruz.

Für den letzten Schritt wurden die Zellkerne mit dem Fluorezenz-Farbstoff *Hoechst33342* (Sigma Aldrich, D) angefärbt. *Hoechst* wird bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und emittiert Licht im blauen Lichtspektrum. Zur längerfristigen Lagerung der Präparate wurde wasserfreies Eindeckmittel (*NeoMount*®, Merck,D) verwendet.

Die Ergebnisse wurden am *Axiovert-200 Fluoreszenzmikroskop* (Zeiss) bzw. am *Laser-Scanning-Mikroskop* (LSM410 von Zeiss) dokumentiert. Das LSM410 kann im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop, in dem sowohl scharfe als auch unscharfe Bildbestandteile sichtbar sind, durch Anwendung des konfokalen Prinzips, in welchem Strukturen außerhalb der Brennebene nicht aufgenommen werden, die exakte dreidimensionale Lage eines Signals darstellen (<http://www.spektrum.de/lexikon/physik/konfokales-prinzip/8272>).

2.2.4 Statistik

Falls nicht explizit angegeben, wurden alle Versuchsansätze im biologischen als auch im technischen Triplikate durchgeführt. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnte aus den Resultaten ein Mittelwert mitsamt einer Standardabweichung bestimmt werden. Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Daten wurde mit der Statistiksoftware *GraphPad® PRISM Plus* (Graphpad Software, Inc.) gearbeitet. In den Abbildungen wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung graphisch dargestellt. Aus diesen Werten ließ sich ermitteln, ob mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Benferroni Post-Hoc Test die Unterschiede zwischen den PDAC-Zelllinien und mit Hilfe des T-Tests die Abweichungen behandelter Proben von den Kontrollzellen einfach signifikant *, $p < 0,05$ oder hochsignifikant **, $p < 0,01$ waren.

3 Ergebnisse

3.1 mRNA-Expressionsanalysen in Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms

Zur Messung der Genexpression in PDAC-Zelllinien wurden qualitative und quantitative Expressionsuntersuchungen mittels konventioneller PCR (qPCR) und Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

Zuerst wurde die aus Zellen isolierte mRNA mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) in cDNA umgewandelt. Die erfolgreiche cDNA-Synthese wurde durch Anwesenheit von GAPDH in der qPCR überprüft. Alle in der Folge verwendeten Proben zeigten eine Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH, so dass die synthetisierte cDNA verwendet werden konnte (Abb.3.1).

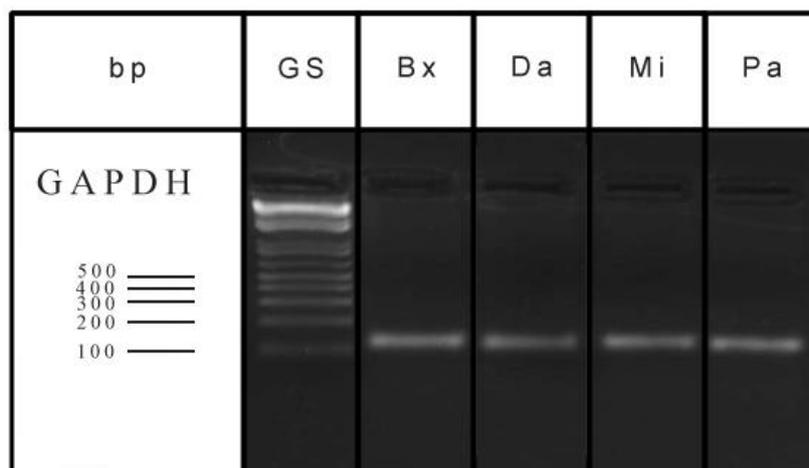


Abbildung 3.1: Agarosegelelektrophorese der qPCR Produkte. Gelelektrophoretische Auftrennung der qPCR-Produkte zur Qualitätskontrolle. Es wurden GAPDH-Primer verwendet. Die vom Hersteller angegebene Größe des Amplikons beträgt 143 bp. Größenstandard (GS), BxPC3 (Bx), DanG (Da), MiaPaCa2 (Mi), Panc1 (Pa).

Um den mRNA-Gehalt eines spezifischen Gens in Zellen genauer bestimmen zu können, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu erfolgte zu Beginn die Normalisierung der Ergebnisse durch Bestimmung des *Threshold Cycle* Wertes (Ct-Wert) des *Housekeeping*-Gens GAPDH.

Der Hersteller (Qiagen) gibt eine Garantie, dass bei Durchführung nach Protokoll und Verwendung firmeneigener Produkte die primerspezifische Anlagerungstemperatur (T_M)

3. Ergebnisse

für alle verwendeten Primer 60°C beträgt. Aus diesem Grund wurde keine Gradientenuntersuchung für T_M bei den einzelnen Primern durchgeführt. Nach jeder qRT-PCR wurden die Proben auf das Vorkommen von Primerdimeren und unspezifischen Produkten mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft (Abb.3.2A). Für die spätere Datenanalyse der Genexpressionen wurden nur Werte verwendet, in deren Reaktionsabläufen weder Primerdimere noch unspezifische Produkte nachgewiesen wurden.

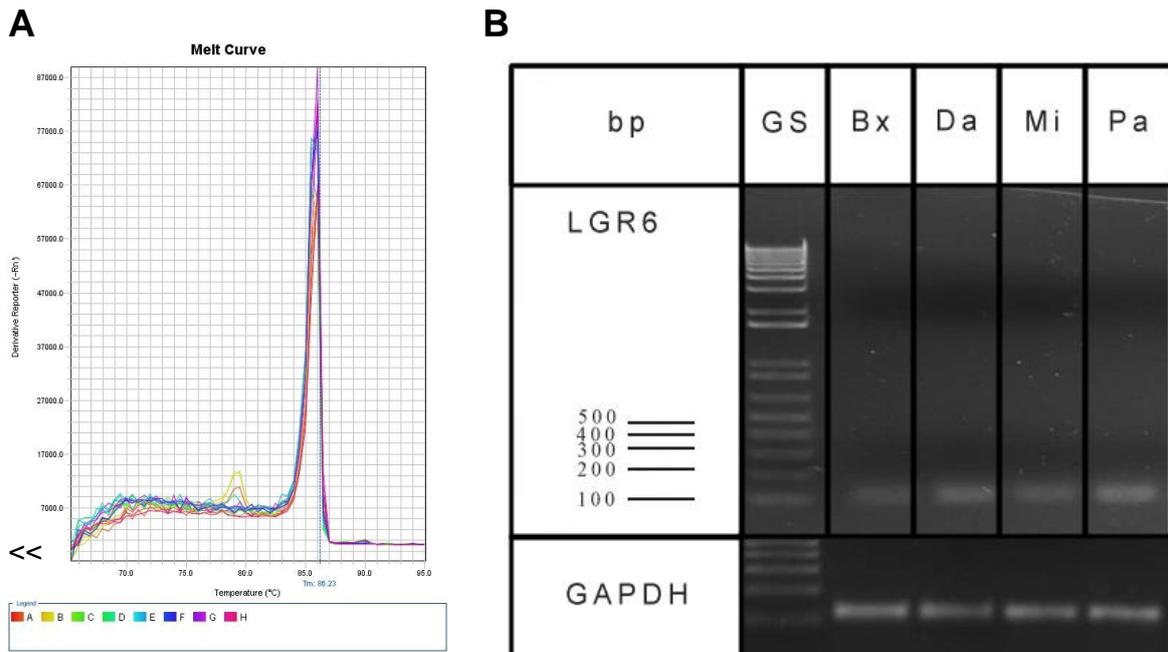


Abbildung 3.2: Qualitätskontrolle der qRT-PCR. **A:** Exemplarische Darstellung der Schmelzkurve nach qRT-PCR mit Primern für LGR6 in PDAC-Zelllinien. Es sind keine Primerdimere erkennbar. **B:** Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der qRT-PCR-Produkte zum Nachweis spezifischer Produkte. Es wurden Primer für LGR6 und für GAPDH verwendet. Die vom Hersteller (Qiagen) angegebene Amplikongröße für LGR6 beträgt 105 bp. Größenstandard (**GS**), BxPC3 (**Bx**), DanG (**Da**), MiaPaCa2 (**Mi**), Panc1 (**Pa**).

Die Untersuchungen der mRNA Expression erfolgten mit Hilfe des Step One™ Real-Time PCR Systems. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden als relative Expression entsprechend der $2^{-\Delta CT}$ Methode (siehe 2.2.2.6) dargestellt und die Werte in Relation zu den jeweiligen GAPDH-Werten gesetzt.

Zur ergänzenden Qualitätssicherung wurden qRT-PCR-Produkte stichprobenartig auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und die Größen der Produkte mit den vom Hersteller angegebenen Daten abgeglichen (Abb.3.2B). Somit konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den amplifizierten qRT-PCR Produkten um die gesuchten Genprodukte handelte.

3. Ergebnisse

3.1.1 ZEB1 Expression und Charakterisierung von PDAC

Um die Rezeptoren der LGR-Familie und ihrer Liganden, den R-Spondinen (RSPO), hinsichtlich der Expression in PDAC-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zelllinien in zwei Gruppen eingeteilt. Einerseits wurden die Zellen nach dem morphologischen Erscheinungsbild in epitheliale und mesenchymale Zelllinien unterteilt [89]. BxPC3 (Abb.3.3A) und DanG (Abb.3.3B) repräsentieren in Zellverbänden wachsende epitheliale Tumorzellen. MiaPaCa2 (Abb.3.4C) und Panc1 (Abb.3.3D) zählen zu den spindelförmigen, mesenchymalen Karzinomzellen [90]. Zusätzlich wurde zum Nachweis einer stammzellnahen Zellmorphologie der etablierte Stammzellmarker *ZEB1* verwendet (Abb.3.3E).

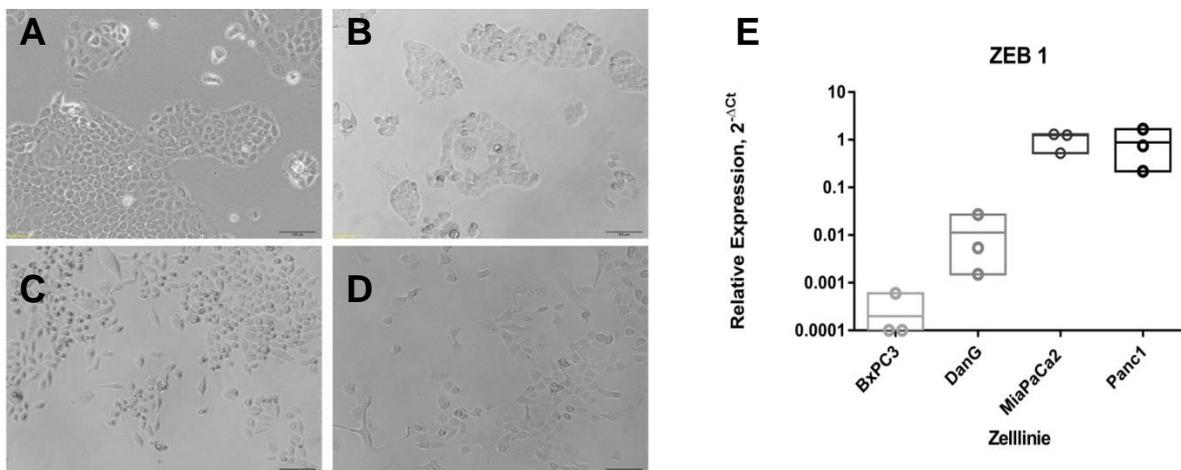


Abbildung 3.3: Zellmorphologische Unterteilung mit Hilfe von ZEB1. A-D: Zellmorphologische Darstellung der verwendeten duktalen Pankreaskarzinomzelllinien in der Lichtmikroskopie in zehnfacher Vergrößerung. A-B: Epitheliale Zelllinien BxPC3 (A) und DanG (B). C-D: Mesenchymale Zelllinien MiaPaCa2 (C) und Panc1 (D). E: Ergebnisse der relativen mRNA Expression von *ZEB1* mit qRT-PCR in den untersuchten duktalen Pankreaszelllinien. MiaPaCa2 und Panc1 zeigen eine hohe *ZEB1* Genexpression. n=3.

Wie bereits durch Krausova, M. and V. Korinek, 2014 beschrieben, exprimierten MiaPaCa2 und Panc1 *ZEB1* mRNA. Die in BxPC3 nachgewiesene *ZEB1*-Genexpression war im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien die niedrigste [91]. Diese Ergebnisse konnten durch die gezeigten Expressionsanalysen bestätigt werden. MiaPaCa2 und Panc1 wiesen im Vergleich zu BxPC3 eine signifikant höhere mRNA Expression von *ZEB1* auf. Gegenüber DanG war ebenfalls eine höhere Genexpression von MiaPaCa2 und Panc1 nachweisbar (Abb.3.3E).

3. Ergebnisse

3.1.2 Wnt-Zielgen-Expression in PDAC

Bereits 2007 wiesen Pasca di Magliano, M., et al. in ihrer Arbeit signifikante Expressionen der für einen aktiven Wnt-Signalweg notwendigen Proteine in verschiedenen duktalem PDAC-Zelllinien nach [81]. Zur Verifizierung der Wnt-Signalaktivität in den verwendeten Zelllinien wurden Expressionsanalysen zu drei etablierten Wnt-Zielgenen (*AXIN2*, *EPHB2* und *PROX1*) durchgeführt [92-94]. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte durch qRT-PCR im StepOne™ PCR-System. Zur Standardisierung der Werte wurde das Housekeeping-Gen GAPDH bestimmt.

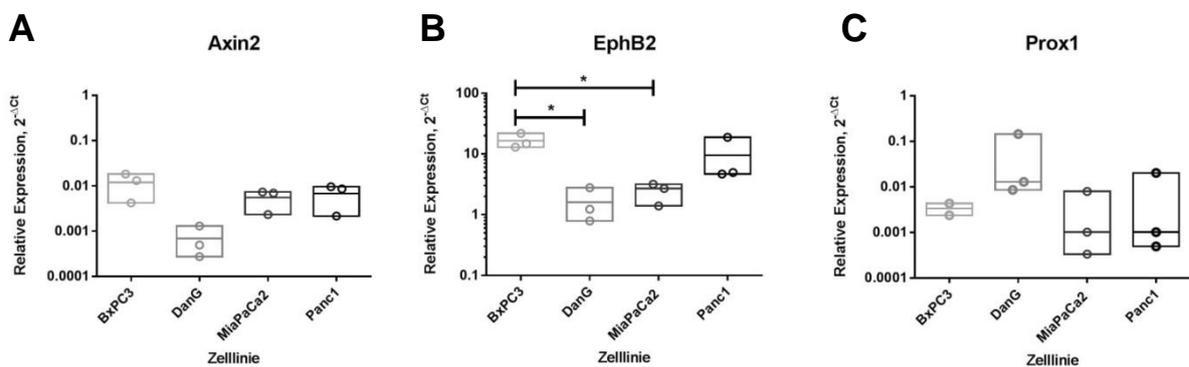


Abbildung 3.4: Wnt-Zielgenexpression in duktalem Pankreaskarzinomzellen. Dargestellt ist die relative Expression der Wnt-Zielgen qRT-PCR von *AXIN2*, *EPHB2* und *PROX1* in unterschiedlichen PDAC-Zelllinien. In allen Zelllinien konnten Wnt-Zielgenexpressionen nachgewiesen werden und so auf eine Wnt-Aktivität geschlossen werden. **A:** BxPC3 zeigte die höchste *AXIN2*-mRNA-Expression, MiaPaCa2 und Panc1 wiesen vergleichbare *AXIN2* Genexpression auf. **B:** *EPHB2*-Genexpression zeigte Unterschiede in den PDAC-Zellen. Panc1 wies neben BxPC3 die höchste Expression auf. **C:** *PROX1*-mRNA-Expression ist in PDAC-Zellen niedrig. Eine Ausnahme zeigte DanG, in der im Vergleich zu den anderen Zelllinien eine sichtbar höhere *PROX1*-Genexpression zu beobachten war. ANOVA und Benferroni Post-Hoc Test n=3. *, p < 0,05.

In den verwendeten PDAC-Zelllinien konnte durch die Expression von den Wnt-Zielgenen *AXIN2*, *EPHB2* und *PROX1* auf eine Wnt-Aktivität geschlossen werden (Abb.3.4A-C).

BxPC3 zeigte in Bezug auf *AXIN2* und *EPHB2* die höchste mRNA Expression. Im Falle der *AXIN2*-Genexpression konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen BxPC3, MiaPaCa2 und Panc1 beobachtet werden. *AXIN2* wurde in BxPC3, MiaPaCa2 und Panc1 in äquivalenter Höhe exprimiert. Im Kontrast dazu zeigte DanG die niedrigste *AXIN2*-mRNA-Expression, die im Vergleich zur ebenfalls epithelialen Zelllinie BxPC3 signifikant niedriger war (Abb.3.4A).

3. Ergebnisse

EPHB2 war am höchsten in BxPC3 exprimiert, in DanG und MiaPaCa2 war es signifikant niedriger. Panc1 war nach BxPC3 die Zelllinie mit ebenfalls hoher *EPHB2*-Expression vor DanG und MiaPaCa2 (Abb.3.4B).

In den Untersuchungen der *PROX1*-mRNA-Expression war in DanG die höchste Genexpression nachweisbar. MiaPaCa2 und BxPC3, welche beide eine vergleichbare Expression boten, wiesen die niedrigste *PROX1*-mRNA auf. Panc1 demonstrierte im Vergleich zu BxPC3 eine deutlich höhere Genexpression und eine etwa doppelt so hohe *PROX1*-Expression verglichen mit MiaPaCa2 (Abb.3.4C).

Zelllinie \ Gen	BxPC3	DanG	MiaPaCa2	Panc1
<i>ZEB1</i>	+	++	++++	++++
<i>AXIN2</i>	++	+	++	++
<i>EPHB2</i>	++++	++++	++++	++++
<i>PROX1</i>	++	++	++	++

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Wnt-Zielgenexpression. In grün markiert sind positive Nachweise für entsprechende *RSPO*-mRNA-Expression. Rot markiert eine relative Expression ($2^{-\Delta Ct}$) unterhalb der Nachweishgrenze. Bewertungssystem für die mRNA-Expressionshöhe bezogen auf die höchste mRNA-Expression in DanG für *LGR4*. -, $2^{-\Delta Ct} < 0$, mRNA-Expression unterhalb der Nachweishgrenze; +, $2^{-\Delta Ct} < 0,01$, Expression nachweisbar; ++, $2^{-\Delta Ct} = 0,001-0,1$, niedrige Expression; +++, $2^{-\Delta Ct} = >0,1-1$, mäßige mRNA-Expression; +++++, $2^{-\Delta Ct} > 1$, hohe mRNA-Expression.

3. Ergebnisse

3.1.3 mRNA-Expression von RSPO in PDAC-Zelllinien

In diesen Experimenten wurde zunächst die Grundexpression von RSPO1-4 in PDAC-Zelllinien untersucht. Zum Zeitpunkt der Arbeit existierten keine mRNA-Expressionsanalysen für RSPO1-4 in PDAC. Die Messungen der mRNA-Expression erfolgte nach zwei bis drei Tagen Wachstum in der Zellkulturflasche bei einer durchschnittlichen Zellverdopplungszeit von 40 bis maximal 60 Stunden [95]. Die Bestimmung der RSPO-Expression erfolgte mittels qRT-PCR im StepOne™ PCR System. Die Daten wurden auf die Werte von GAPDH standardisiert.

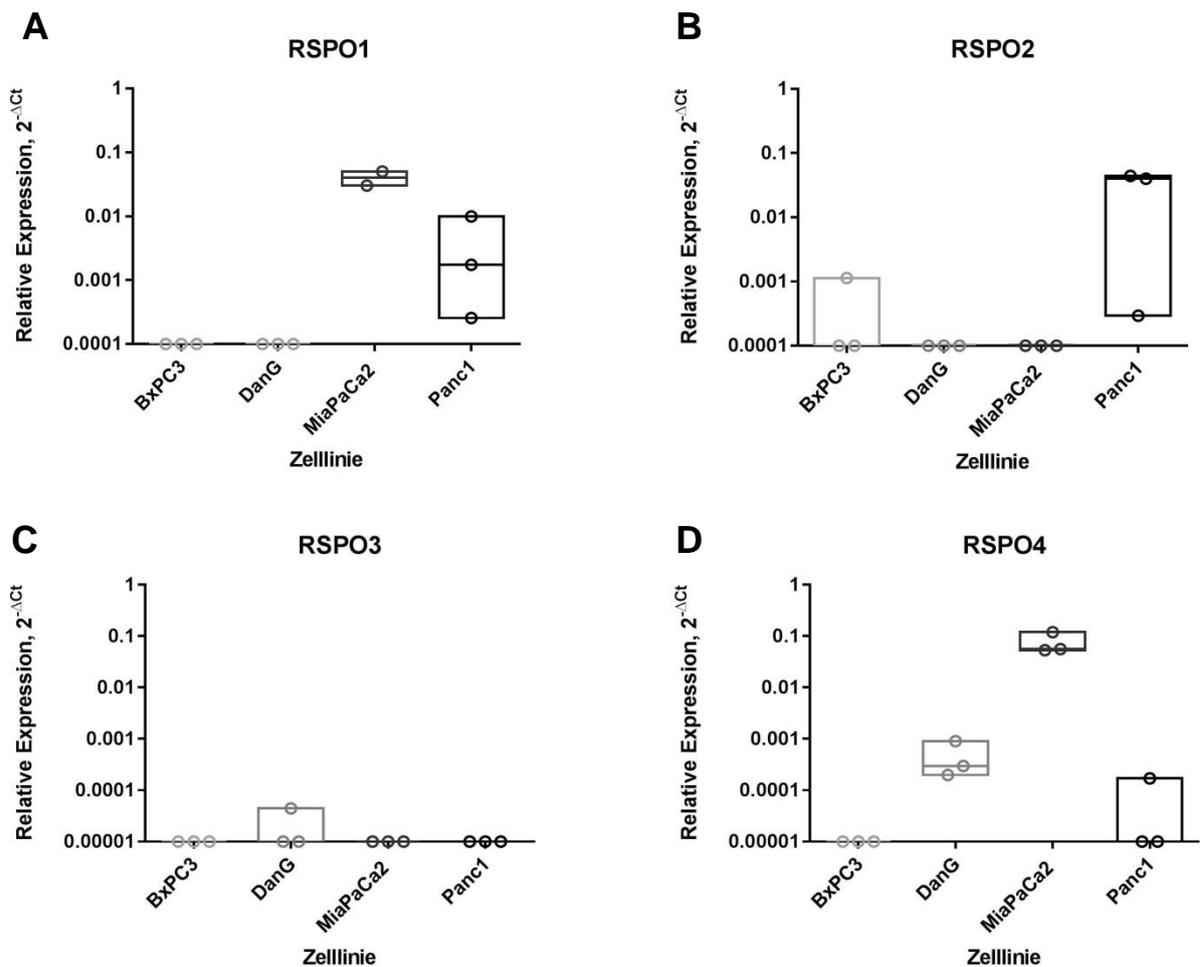


Abbildung 3.5: RSPO Expression auf mRNA-Ebene. Ergebnisse der qRT-PCR von RSPO1-4 in den Zelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. **A-D:** Die RSPO-Genexpression zeigte sehr unterschiedliche Expressionen von RSPO1/2/3/4 in den PDAC-Zelllinien. Die RSPO-Werte wurden auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normiert. ANOVA und Benferroni Post-Hoc Test. $n \geq 3$.

Die mRNA-Analysen zeigten ein sich unterscheidendes Bild der RSPO-Expression in den PDAC-Zelllinien. Lediglich in MiaPaCa2 und Panc1 konnte eine RSPO1-Expression

3. Ergebnisse

nachgewiesen werden. Hierbei bot MiaPaCa2 eine sichtbar höhere RSPO1-Expression gegenüber Panc1 (Abb.3.5A). Ähnliche Ergebnisse zeigten die RSPO4 mRNA-Expressionsuntersuchungen. MiaPaCa2 zeigte eine signifikant höhere Expression um den Faktor 118 im Vergleich zu DanG. Zudem exprimierte MiaPaCa2 RSPO1 und RSPO4 in einer äquivalenten Höhe. RSPO4-mRNA war in BxPC3 und Panc1 so gering exprimiert, dass eine Quantifizierung nicht möglich war (Abb.3.5.D). Auch die Genanalysen von RSPO3 zeigten in BxPC3, MiaPaCa2 und Panc1 geringe, nicht quantifizierbare mRNA-Expressionen. Nur DanG demonstrierte neben der RSPO4-mRNA-Expression auch eine geringe RSPO3-Exprimierung (Abb.3.5C). Neben Panc1 wurde RSPO2 auch in BxPC3 exprimiert. Dabei war die RSPO2-Genexprssion in Panc1 höher. (Abb.3.5B). Eine Zusammenfassung der RSPO Expression in den untersuchten Zelllinien zeigt die Tabelle 3.1.

Zelllinie \ Gen	BxPC3	DanG	MiaPaCa2	Panc1
RSPO1	-	-	++	++
RSPO2	+	-	-	++
RSPO3	-	+	-	-
RSPO4	-	+	++	+

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der RSPO Expression. In grün markiert sind positive Nachweise für entsprechende RSPO-mRNA-Expression. Rot markiert eine relative Expression($2^{-\Delta Ct}$) unterhalb der Nachweisgrenze. Bewertungssystem für die mRNA-Expressionshöhe bezogen auf die höchste mRNA-Expression in DanG für LGR4. , - : $2^{-\Delta Ct} < 0$, mRNA-Expression unterhalb der Nacheisgrenze; + : $2^{-\Delta Ct} < 0,01$, Expression nachweisbar; ++ : $2^{-\Delta Ct} = 0,001-0,1$, niedrige Expression; +++ : $2^{-\Delta Ct} = >0,1-1$, mäßige mRNA-Expression; ++++ : $2^{-\Delta Ct} > 1$, hohe mRNA-Expression.

Beim Vergleich der RSPO-Genexpressionen untereinander fiel auf, dass die nachweisbare Expression von RSPO2 und RSPO4 invers zueinander waren (Abb.3.5B, D).

In der Zusammenschau mit den Genexpressionen der Wnt-Zielgene *PROX1* und *EPHB2* (Abb.3.4B, 3.5D) war auffällig, dass die mRNA-Expression von *EPHB2* invers zur Genexpression von RSPO4 war und die nachgewiesene mRNA von RSPO3 ähnlich zu *PROX1* war. (Abb.3.4C, 3.5C).

3.1.4 mRNA-Expression von LGR in PDAC-Zelllinien

Wie bereits bekannt ist, gehören LGRs der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembran Protein-Superfamilie an und bilden gemeinsam mit RSPO und Ringfinger-Proteinen (ZRN3, RNF43) einen ternären Komplex, der die Ausschaltung des Wnt-Rezeptors hemmt [91]. Inwieweit diese Rezeptoren im PDAC exprimiert werden und welche Rolle sie in einer möglichen Aufrechterhaltung des PDAC besitzen, sollten die folgenden Experimente zeigen. Zu diesem Zweck erfolgte die Untersuchung der mRNA-Grundexpression von *LGR4*, *LGR5* und *LGR6* in BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. Die Messung der mRNA erfolgte wie in den Vorexperimenten in 3.1.3.

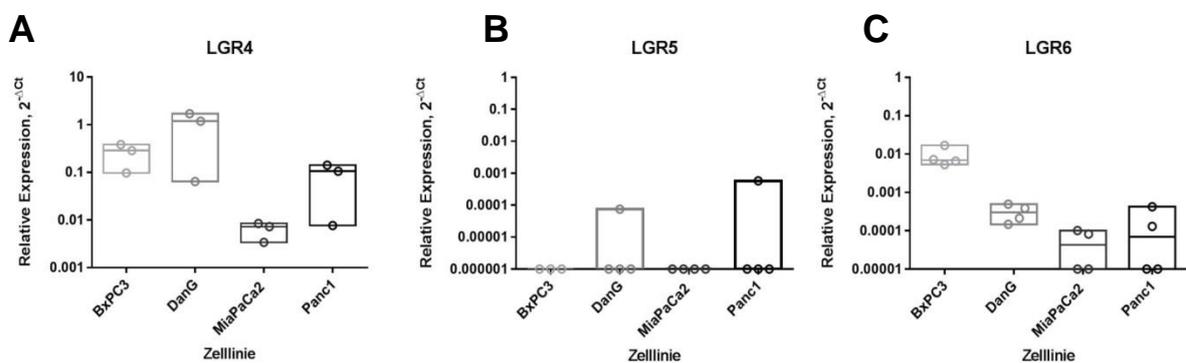


Abbildung 3.6: LGR-Expression auf mRNA-Ebene. Ergebnisse der relativen mRNA-Expression von LGR4, 5, 6 mittels qRT-PCR in BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. A: Alle Zelllinien zeigten LGR4-Genexpression auf einem unterschiedlichen Niveau. B: PDAC-Zellen wiesen eine insgesamt niedrige LGR5-mRNA-Expression auf. C: PDAC-Zellen wiesen eine niedrige LGR6-Genexpression auf. BxPC3 zeigte die höchste LGR6-mRNA-Expression in PDAC-Zellen. Ergebnisse der LGR-Genexpression wurden auf GAPDH normiert. ANOVA und Benferroni Post-Hoc Test. $n \geq 3$. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Während LGR4 und LGR6 von allen PDAC-Zelllinien exprimiert wurde (Abb.3.6A, C), zeigte LGR5 eine insgesamt niedrige mRNA-Expression (Abb.3.6B). DanG und Panc1 wiesen eine geringe LGR5 mRNA-Expression auf. Dabei war in Panc1 eine höhere Expression als in DanG zu beobachten, die jedoch nicht signifikant war. In BxPC3 und MiaPaCa2 lag die LGR5-Genexpression unterhalb der Nachweisgrenze.

Die LGR4 mRNA-Expressionsanalysen zeigten in BxPC3 und DanG eine höhere Expression gegenüber MiaPaCa2 und Panc1. BxPC3 zeigte hier eine sichtbar höhere LGR4-Genexpression als MiaPaCa2 und Panc1. DanG wies insgesamt die höchste LGR4-Genexpression auf und zeigte ebenfalls im Vergleich zu MiaPaCa2 und Panc1 eine deutlich höhere Expression auf. Vergleicht man BxPC3 und DanG miteinander, wird

3. Ergebnisse

deutlich, dass die LGR4-mRNA in DanG höher war. Insgesamt ließ sich in den epithelialen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC3 und DanG eine insgesamt stärkere LGR4-Expression nachweisen. (Abb.3.6A)

Zelllinie	BxPC3	DanG	MiaPaCa2	Panc1
Gen				
LGR4	+++	++++	++	+++
LGR5	-	+	-	+
LGR6	++	+	+	+

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der LGR Expression. In grün markiert sind positive Nachweise für entsprechende RSPO-mRNA-Expression. Rot markiert eine relative Expression($2^{-\Delta Ct}$) unterhalb der Nachweisgrenze. Bewertungssystem für die mRNA-Expressionshöhe bezogen auf die höchste mRNA-Expression in DanG für LGR4. , - : $2^{-\Delta Ct} < 0$, mRNA-Expression unterhalb der Nacheisgrenze; + : $2^{-\Delta Ct} < 0,01$, Expression nachweisbar; ++ : $2^{-\Delta Ct} = 0,001-0,1$, niedrige Expression; +++ : $2^{-\Delta Ct} = >0,1-1$, mäßige mRNA-Expression; ++++ : $2^{-\Delta Ct} = >1$, hohe mRNA-Expression.

3.1.4.1 LGR6 mRNA-Expression

Wie bereits beschrieben wurde, zeigte die Untersuchung der mRNA-Grundexpression von LGR6 eine insgesamt niedrige Expression in den untersuchten Tumorzellen. BxPC3 wies im Vergleich zu den anderen untersuchten PDAC-Zelllinien die höchste LGR6-Expression auf. Den höchsten signifikanten Expressionsunterschied zeigte BxPC3 im Vergleich zu MiaPaCa2. Gegenüber Panc1 und DanG war ebenfalls eine signifikante LGR6-mRNA-Expression zu dokumentieren. DanG bot insgesamt die zweithöchste LGR6-Genexpression, diese war im Vergleich zu MiaPaCa2 signifikant höher.

Gesamt betrachtet zeigten auch hier die epithelialen Zelllinien BxPC3 und DanG die höhere Expression von LGR6 gegenüber mesenchymalen Pankreastumorzelllinien. BxPC3 zeigte hierbei sogar eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu allen anderen Zelllinien (Abb.37).

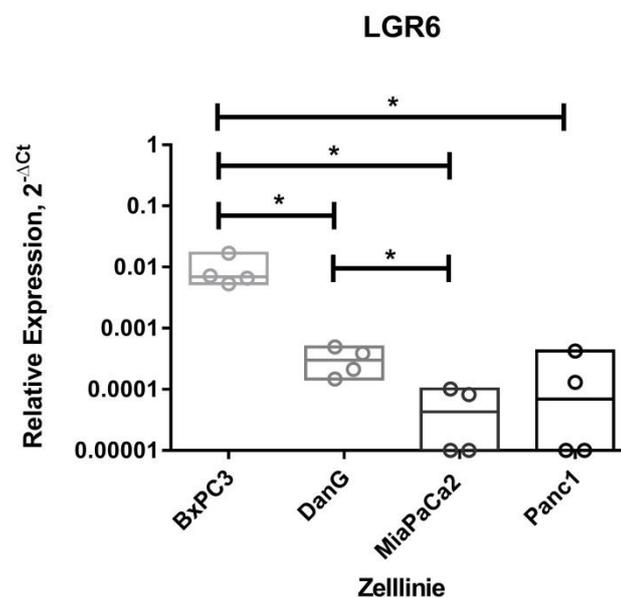


Abbildung 3.7: mRNA Expressionsunterschiede von LGR6. Dargestellt ist die relative Expression von LGR6 auf mRNA-Ebene. BxPC3 zeigt eine signifikant höhere Expression von LGR6 im Vergleich zu anderen Pankreaskarzinomzelllinien. ANOVA und Benferroni Post-Hoc Test. n=4. *, p < 0,05.

3. Ergebnisse

3.1.4.2 LGR6 Splice-Variantenanalyse

Im Nationalen Zentrum für Biotechnologieinformation (NCBI), einem Institut für Datenverarbeitung und Datenspeicherung in der Molekularbiologie, werden drei mRNA-Splice-Varianten von LGR6 aufgeführt [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59352>]. Zur genaueren Untersuchung dieser drei Isoformen wurden Primer zur Detektion der unterschiedlichen Splice-Varianten entworfen. Wie im Abschnitt 2.2.2 „Konzipierte Primer zur LGR6-Splicevarianten-Analyse“ beschrieben, wurden vier Primer entworfen, welche die Splicevarianten 1 (LGR6_V1), 2 (LGR6_V2), 3 (LGR6_V3) sowie alle Splicevarianten zusammen (LGR6_V1-3) detektieren sollen. Die aus der Verdünnungsreihe aufgetragenen Produkte bestätigen in der Gelelektrophorese das Funktionieren der Primer (Abb. 3.8).

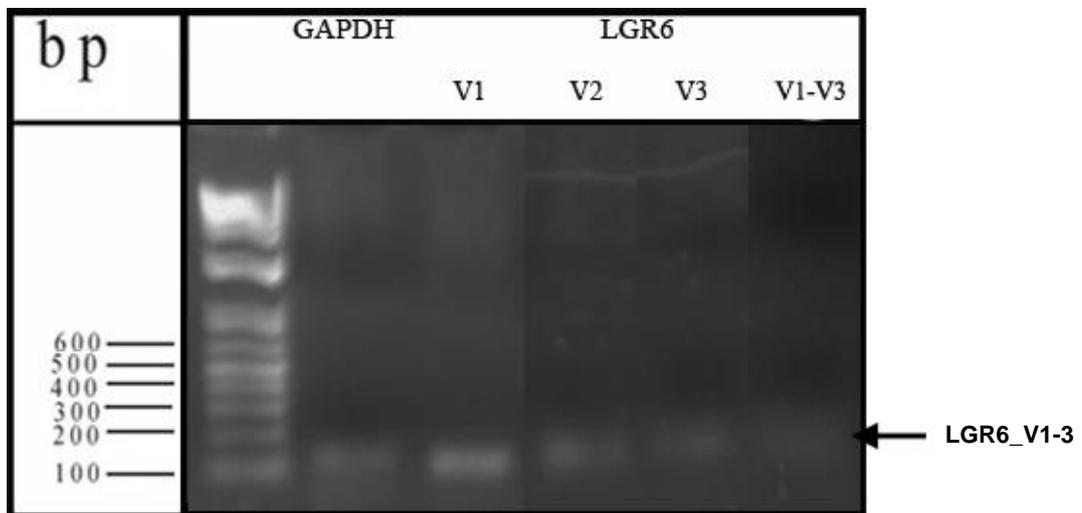


Abbildung 3.8: Überprüfung der konzipierten Primer in der qRT-PCR. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der qRT-PCR-Produkte aus der Primertitrierung zum Nachweis spezifischer Produkte. Es wurden Primer für die LGR6-Splicevarianten LGR6_V1, LGR6_V2, LGR6_V3, LGR6_all und für GAPDH verwendet.

Die Firma *Qiagen* bietet in diesem Zusammenhang spezifische Primer zur Detektion aller LGR6-Splicevarianten (Hs_LGR6_1_SG) und für die LGR6-Splicevariante 2 (Hs_LGR6_va.1_SG) an.

Zur Verifizierung der Spezifität der selbstkonstruierten Primer wurden die relativen Genexpressionen der von der Firma *Qiagen* erstellten Primer mit den Ergebnissen der selbstkonzipierten Primer verglichen (Abb. 3.9).

3. Ergebnisse

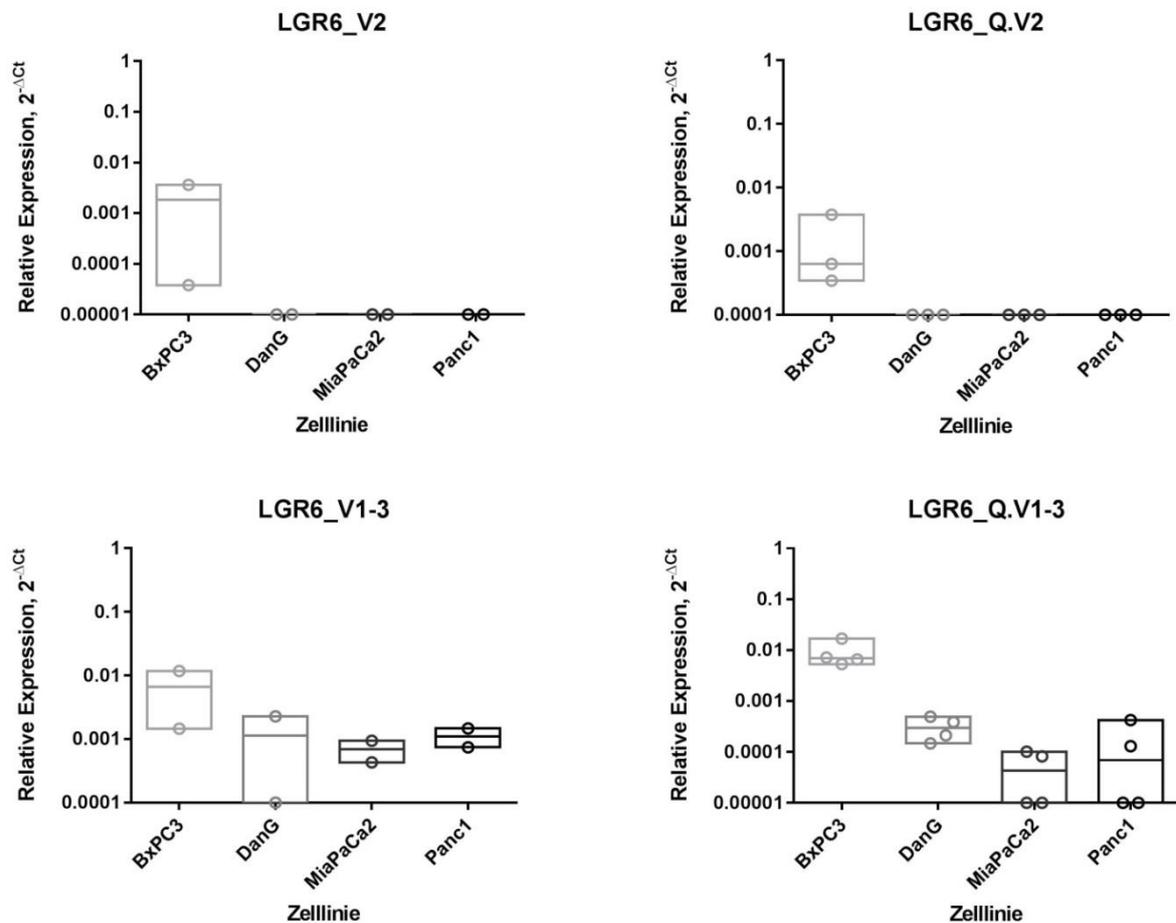


Abbildung 3.9: Vergleich selbst entworfener Primer mit Primern der Firma Qiagen. Zu sehen sind vergleichbare Ergebnisse der qRT-PCR mit selbstdesignten Primern (LGR6_V2, LGR6_V1-V3) und Primern der Firma Qiagen (LGR6_Q.V2), LGR6_Q.V1-3). Dargestellt ist die relative Expression der Splicevarianten von LGR6, V2 und V1-3 in den Zelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. n=2.

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen, zeigten die Genanalysen der selbst entworfene Primer vergleichbare Ergebnisse zu denen der Firma *Qiagen* bereitgestellten Primern LGR6_Q.V2 und LGR6_Q.V1-3.

Auch hier erfolgte die Datenerhebung mit Hilfe des qRT-PCR im StepOne™ PCR System und eine Standardisierung der Daten auf GAPDH. Für die LGR6-Expressionsanalysen in den Pankreaskarzinomzellen wurden Primer zur Detektion aller Isoformen der Firma *Qiagen* LGR6_Q.V1-3 verwendet.

3. Ergebnisse

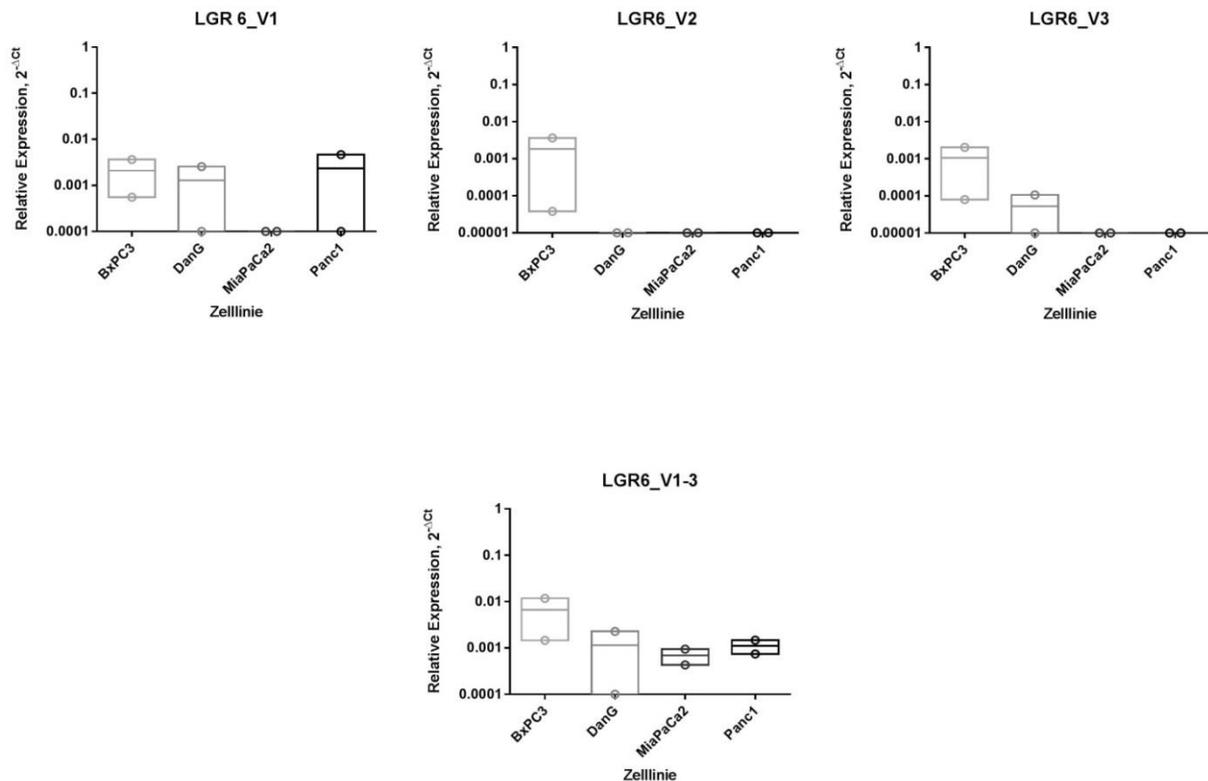


Abbildung 3.10: LGR6 Splicevarianten-Analyse. Genexpression der LGR6 Splicevarianten V1, V2, V3 und V1-3 in den Pankreaskarzinomzelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. BxPC3 exprimiert alle LGR6-Isoformen. Gezeigt sind die relativen Expressionen der qRT-PCR mit selbst entworfenen Primern für LGR6. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH normiert. n=2.

Die Genanalysen der LGR6-Splicevarianten zeigten eine unterschiedliche mRNA-Expression der Splicevarianten (Abb. 3.10). BxPC3 stellte die einzige Zelllinie dar, welche alle drei Varianten exprimiert, während DanG, MiaPaCa2 und Panc1 Differenzen aufwiesen. LGR6 V1 zeigte von allen Varianten die breiteste Genexpression; sie war neben BxPC3 auch in DanG und Panc1 nachweisbar. In Panc1 fiel eine vergleichbare Expression zu BxPC3 auf, wohingegen DanG eine niedrigere mRNA-Expression aufwies. Der Nachweis einer relativen Genexpression von LGR6 V2 war nur in BxPC3 möglich. LGR6 V3 war neben BxPC3 auch in DanG nachweisbar. MiaPaCa2 zeigte als einzige Zelllinie in den Einzeluntersuchungen der LGR6-V1-V3 Genexpression eine nicht quantifizierbare mRNA Expression. In den Expressionsanalysen aller Splicevarianten konnte jedoch eine geringe LGR6 mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abb. 3.9 und 3.10).

3. Ergebnisse

In Zusammenschau aller Ergebnisse der Genexpressionsanalysen konnten die untersuchten PDAC-Zelllinien mit Hilfe der *ZEB1*-Genexpression morphologisch in epitheliale und mesenchymale Zellen unterschieden werden (Abb. 3.3). In den Zelllinien waren sowohl etablierte Wnt-Zielgene (Abb. 3.4) als auch *RSPO1/2/3/4* und *LGR4/5/6* nachweisbar (Abb. 3.5, Abb. 3.6).

Dabei waren Unterschiede in den mRNA-Expression zwischen epithelialen und mesenchymalen Zelllinien auffällig. Insbesondere *RSPO1* und *RSPO4* zeigten höhere mRNA-Levels in den mesenchymalen Zellen. *LGR4* und *LGR6* mRNA-Expressionen waren in den epithelialen Zelllinien höher. Die Untersuchung der *LGR6*-Expression ergab signifikant höhere mRNA-Levels in den epithelialen PDAC-Zellen. Zur weiteren Spezifizierung wurden drei bekannte Splicevarianten von *LGR6* mit Hilfe selbst konzipierter Primer untersucht. In den Untersuchungen konnten die vorherigen Ergebnisse bestätigt werden. *BxPC3* exprimiert als einzige PDAC-Zelllinie alle drei beschriebenen Splicevarianten.

3. Ergebnisse

3.1.5 Einfluss von RSPO2 auf die Genexpression von RSPO1/4 und LGR6

In der Arbeit von Ilmer et al. 2015 wurde gezeigt, dass RSPO2 allein einen stimulierenden Effekt auf den Wnt-Signalweg hat und somit als Wnt-Signalverstärker auch in PDAC fungiert. Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Genexpression von RSPO und LGR unter Wnt-Signalverstärkung im Sinne eines positiven Feedback-Loops erhöht ist, wurden dem Versuchsaufbau von Ilmer et al. 2015 entsprechend PDAC-Zelllinien mit 20 ng/mL RSPO2 über 48 Stunden behandelt [96]. Mit diesem Versuchsansatz sollte die Wnt-abhängige Genexpression von RSPO1/4 sowie von LGR6 untersucht werden. RSPO2 gilt neben RSPO3 als potentester Wnt-Signalverstärker von allen RSPOs [97].

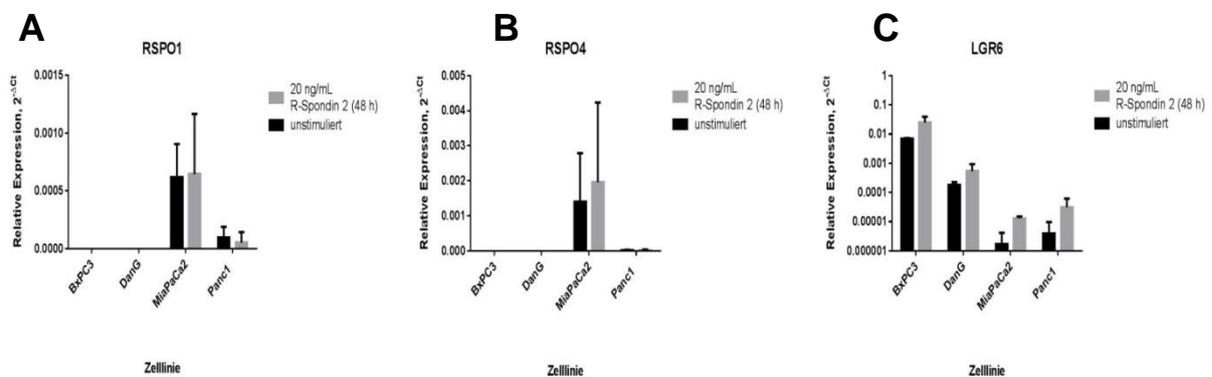


Abbildung 3.11: Wnt-abhängige RSPO1/4 und LGR6 Genexpression. Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von RSPO1/4 sowie LGR6 nach exogener RSPO2 Behandlung für 24 Stunden in den Zelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. Die schwarzen Balken zeigen unbehandelte Zellen als Kontrollen (0 ng/mL), die grauen Balken zeigen die Ergebnisse nach RSPO2-Behandlung (20 ng/mL). **A, B:** RSPO-Genexpression bleibt nach exogener RSPO2-Behandlung unverändert. **C:** Gesteigerte LGR6 Genexpression nach 24 Stunden Behandlung mit RSPO2 in BxPC3 und DanG. Die Werte der relativen Genexpression wurden auf das *Housekeeping*-Gen GAPDH normiert. Multipler t-Test und Bonferroni Post-Hoc Test. $n \geq 2$.

Die Untersuchungen der RSPO1- und RSPO4-Genexpression zeigten gegenüber den Kontrollen keine signifikante Erhöhung der Genexpression nach 24 Stunden. Wie in den Vorexperimenten in 3.1.4. gezeigt, weisen BxPC3 und DanG eine mRNA-Expression unter der Nachweisgrenze auf.

Im Kontrast dazu zeigten BxPC3 und DanG nach Behandlung mit RSPO2 eine erhöhte LGR6-Expression auf transkriptioneller Ebene. Die LGR6-Genexpression war nach RSPO2-Behandlung in BxPC3 4-fach höher, in DanG 3-fach höher verglichen mit den

3. Ergebnisse

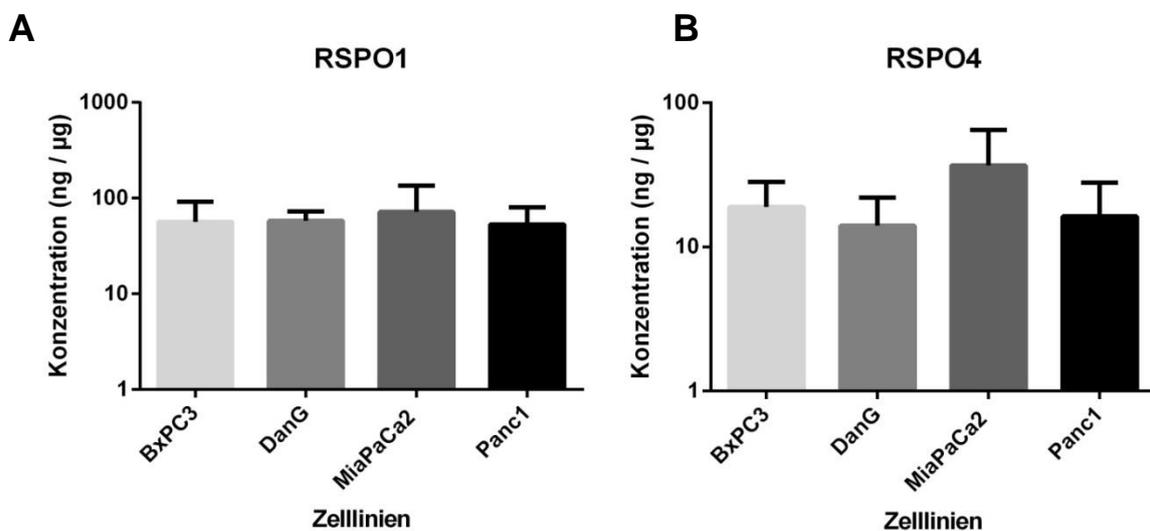
Kontrollen und damit nicht signifikant erhöht (Abb.3.11D). MiaPaCa2 und Panc1 boten aufgrund der sehr geringen Genexpression eine höhere, jedoch ebenfalls nicht signifikant erhöhte LGR6-Genexpression.

Zusammenfassend war unter Zugabe von RSPO2 nach 24 Stunden keine sichtbare Erhöhung der RSPO1- und RSPO4-mRNA-Expression nachweisbar. Eine relevante transkriptionelle Erhöhung von LGR6 war hingegen bereits nach 24 Stunden zu beobachten.

3.2 Proteinanalysen in duktalem Pankreaskarzinomzellen

3.2.1 RSPO-Konzentrationsbestimmungen

Aufbauend auf den Ergebnissen aus den Analysen der RSPO1- und RSPO4-Genexpression, in denen ein Expressionsunterschied zwischen mesenchymalen und epithelialen Zelllinien auffällig war, konzentrierte sich die weitere Untersuchung auf diese beiden RSPOs. Die nachfolgenden Experimente dienten der Überprüfung der Frage, ob eine Selbststimulierung von PDAC-Zellen durch RSPO-Sekretion möglich sei. Eine Hypothese ist, dass Pankreaskarzinomzellen eine relevante Menge an RSPO selbst bilden und sezernieren, um den Wnt-Signalweg autokrin zu verstärken. Zur Bestimmung der RSPO-Konzentration wurde ein spezifischer Sandwich ELISA von Zelllysats und Überstand durchgeführt. Für die Proteinisolierung wurden Zellen bis zu einer Konfluenz von 60-70% inkubiert. Die RSPO-Konzentrationsbestimmung des Zelllysats wurde auf die Gesamtproteinmenge in Mikrogramm normiert. Die Proteinkonzentration im Kulturmedium wurde auf das Volumen pro Milliliter angegeben.



3. Ergebnisse

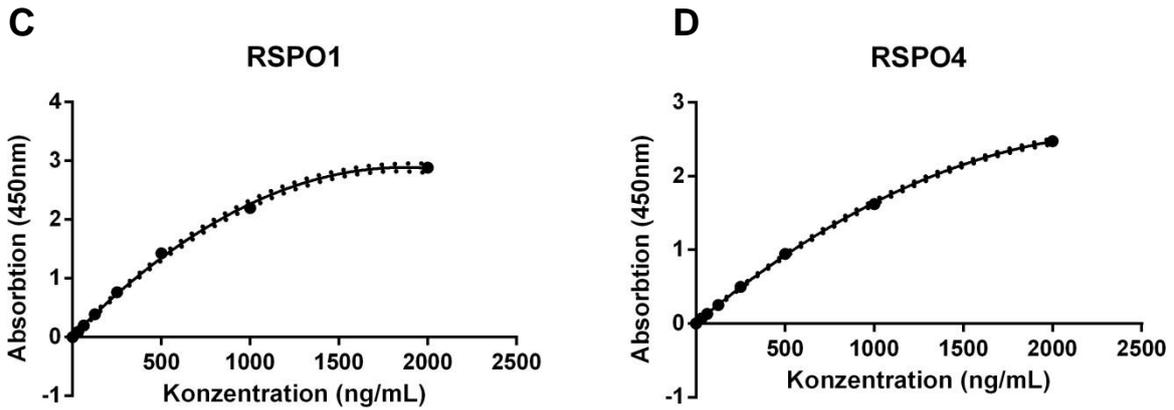


Abbildung 3.12: Intrazelluläre RSP0-Expression. Bestimmung der RSP01- und RSP04-Proteinkonzentration in den duktaalen Pankreaskarzinomzelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. **A:** Alle Zelllinien zeigten eine vergleichbare intrazelluläre RSP01-Produktion. **B:** MiaPaCa2 zeigt die höchste intrazelluläre RSP04-Bildung. Angegeben ist die Konzentration in ng pro μg Gesamtprotein des Zelllysats. Durchführung mittels spezifischem Sandwich ELISA. **C, D:** Alle Ergebnisse wurden auf die entsprechende BSA-Standardkurve bezogen. $n=2$.

Ein signifikanter Unterschied der RSP01-Proteinkonzentrationen im Zelllysate der PDAC-Zellen konnte nicht nachgewiesen werden (Abb.3.12A). Nur RSP04 zeigte in MiaPaCa2 eine sichtbar höhere Konzentration im Zelllysate, welche statistisch nicht signifikant war. BxPC3, DanG und Panc1 zeigten keine Unterschiede in der RSP04-Konzentration (Abb.3.12B). In der Zusammenschau aller Ergebnisse war die RSP01-Proteinkonzentration höher als die RSP04-Proteinkonzentration.

Zum Nachweis von RSP0s in den Zellüberständen wurde zusätzlich die RSP01- und RSP04-Proteinkonzentration bestimmt. Dazu wurde 1 ml Überstand aus einer 175 cm^2 Zellkulturflasche entnommen. Im Anschluss erfolgte, wie in 2.2.3.3 beschrieben, die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels spezifischem Sandwich-ELISA.

3. Ergebnisse

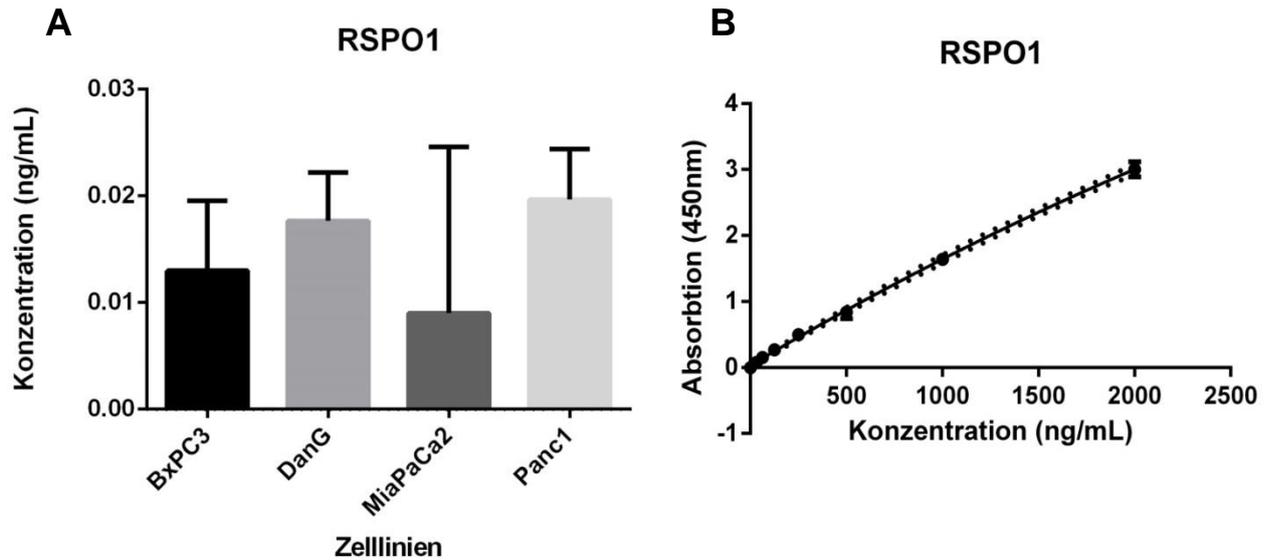


Abbildung 3.13: RSP01-Nachweis im Zellüberstand. Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung von RSP01 in unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien mittels spezifischem Sandwich-ELISA mit entsprechender Standardkurve (B). Überstand nach 3 Tagen Wachstum, bei einer Konfluenz von 60-70%. Lediglich in BxPC3, DanG und Panc1 ist eine geringe RSP01 Sekretion nachweisbar. RSP04 ist im Überstand von duktalem Pankreaskarzinomzelllinien nicht nachweisbar. n=2.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung im Zelllysat der PDAC-Zelllinien zeigte eine sehr niedrige Sekretion in allen untersuchten Zelllinien (Abb.3.13). Insgesamt war die RSP01-Konzentration in BxPC, DanG und Panc1 etwa gleich hoch. In MiaPaCa2 war der RSP01-Nachweis am niedrigsten. Bei der Untersuchung von RSP04 im Lysat des Zellkulturmediums konnte kein positiver Nachweis von RSP04-Proteinkonzentrationen gefunden werden.

3.2.2 Durchflusszytometrische Analysen von LGR4 und LGR6

Als Oberflächenrezeptoren sollten LGR4 und LGR6 auf der Zelloberfläche von duktalem Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden. Dazu wurden durchflusszytometrische Untersuchungen verwendet. Auf die weitere Untersuchung von LGR5 wurde verzichtet, da bereits verschiedene Arbeiten zu LGR5 als Wnt-Zielgen existieren [38]. Zudem war die LGR5-Genexpression im Großteil der PDAC-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze.

Um sicherzustellen, dass die betrachteten Zellen die lebende Population repräsentieren, wurden wie in 2.2.3.5 beschrieben, 7-Aminoactinomycin (7-AAD)-Lebendfärbungen vor jeder Messung durchgeführt.

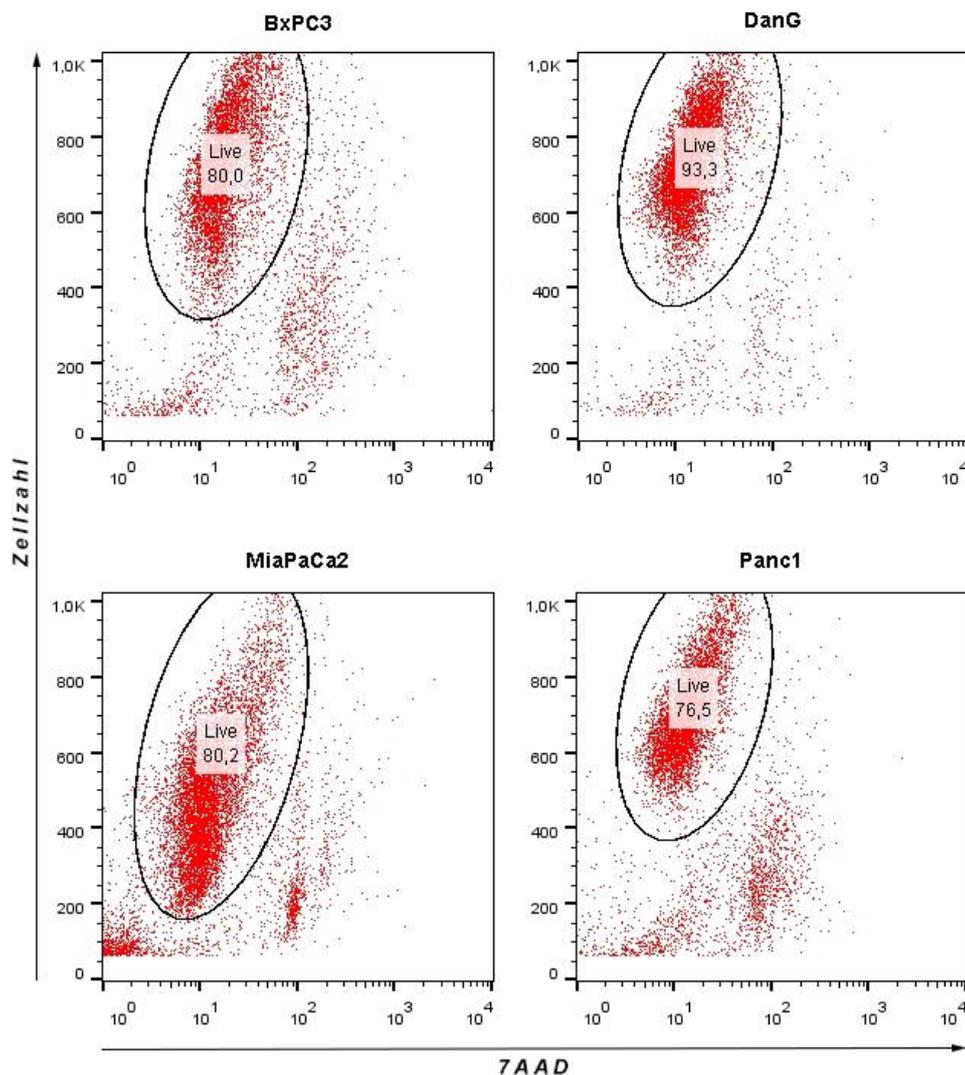
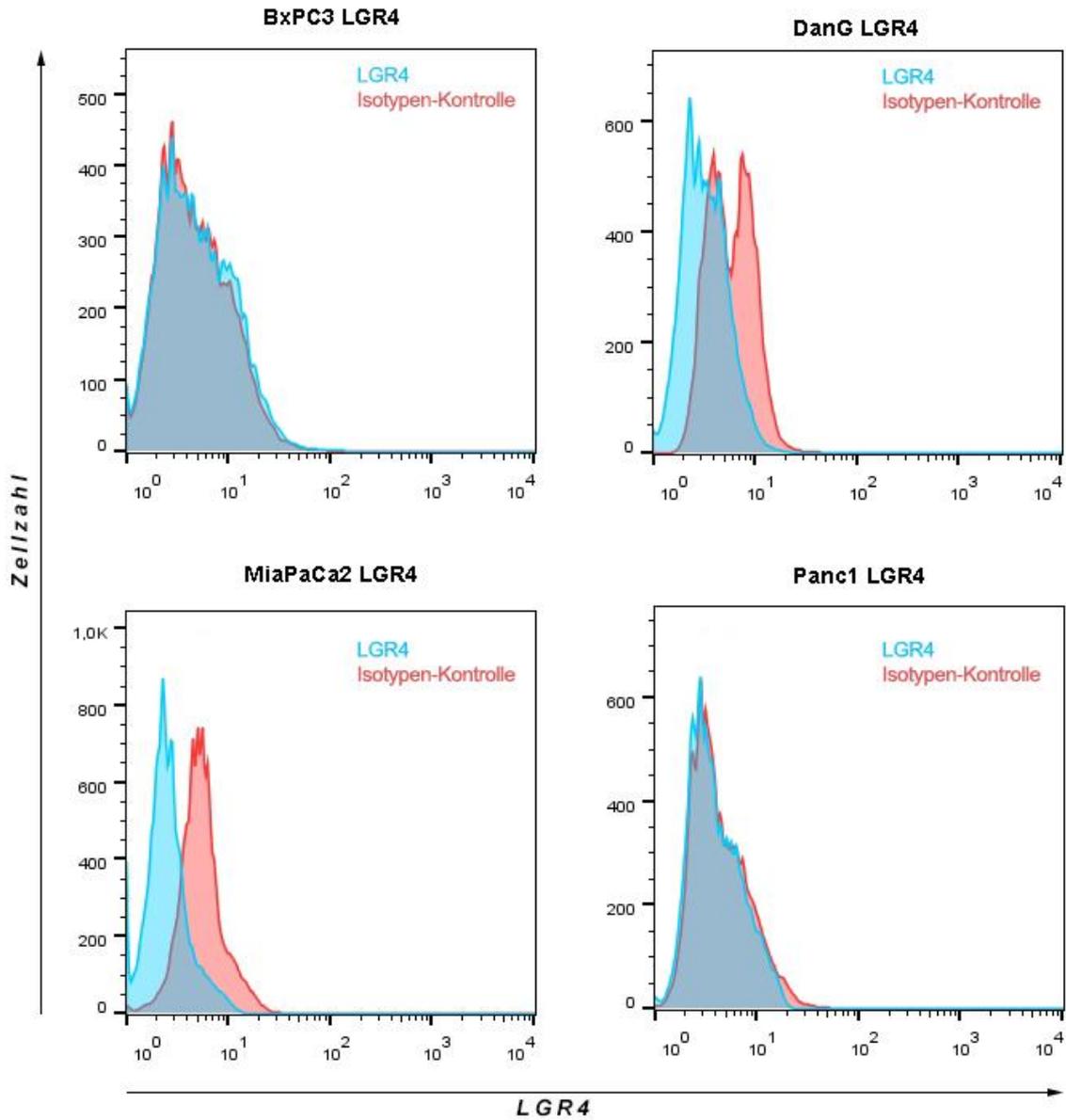


Abbildung 3.14: 7-AAD-Lebendfärbung in PDAC-Zellen. Darstellung der 7-Aminoactinomycin-Färbung der PDAC-Zelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und Panc1. Im linken oberen Quadranten zu sehen ist die Population der lebenden Zellen. Hier dargestellt ist eine exemplarische Darstellung.

3. Ergebnisse

Die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte mit Hilfe einer extrazellulären LGR6-Antikörperfärbung. Die Ergebnisse zeigten keinen positiven Nachweis von LGR4- und LGR6-positiven Zellpopulationen im Rahmen einer Proteinexpression. (Abb.3.16).

A



3. Ergebnisse

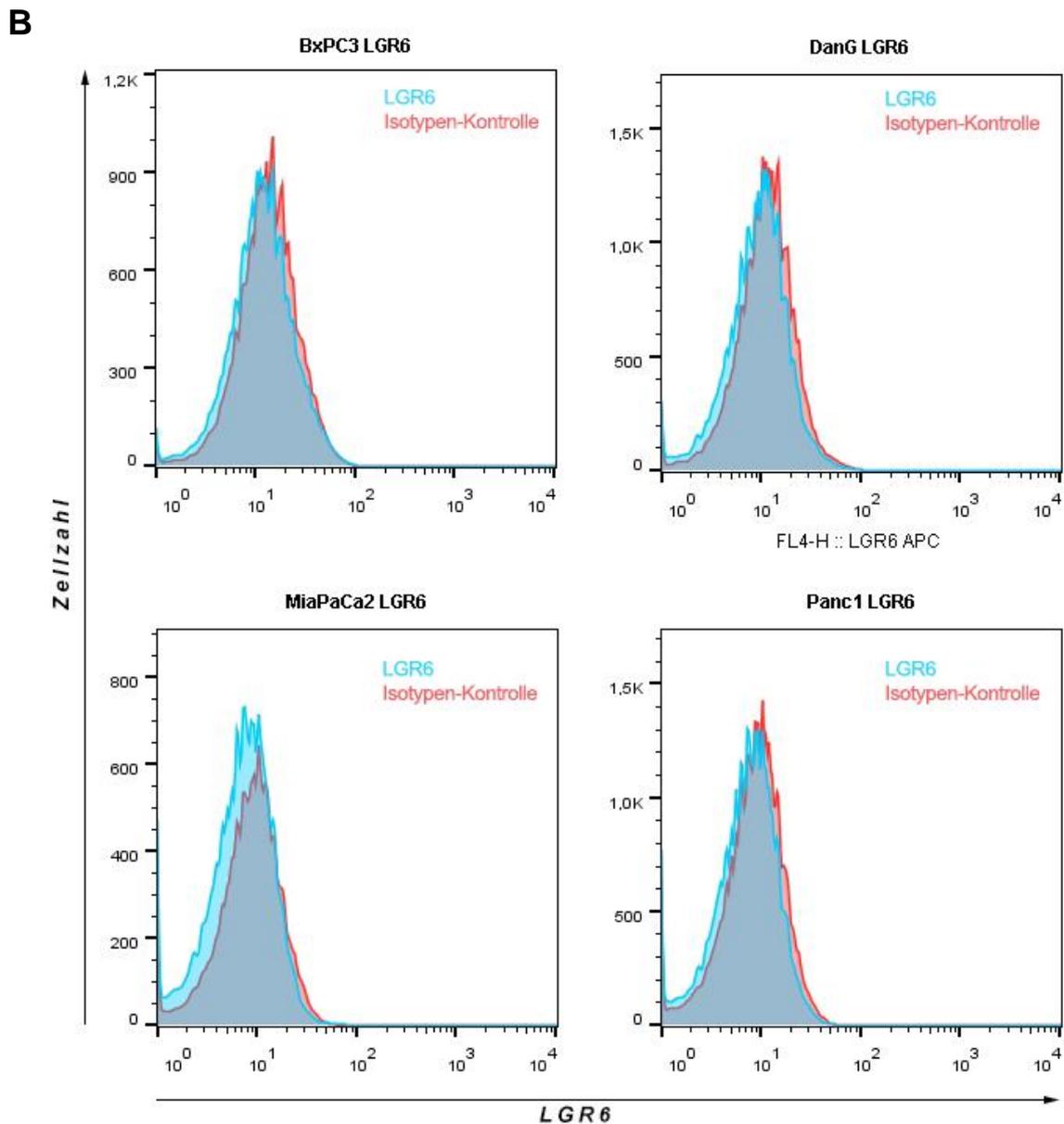


Abbildung 3.15: Durchflusszytometrie der LGR4- und LGR6-Oberflächenfärbung in PDAC-Zellen. Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen von LGR4 und LGR6 in den PDAC-Zelllinien BxPC3, DanG, MiaPaCa2 und DanG. **A:** Kein Nachweis von LGR4 auf der Zelloberfläche. Rot: Isotypenkontrolle IgG2B. Blau: LGR4 PE-gekoppelter Antikörper. **B:** Kein Nachweis von LGR6 auf der Zelloberfläche von. Rot: Isotypenkontrolle IgG1. Blau: LGR6 APC-gekoppelter Antikörper. Darstellung im Histogramm. n≥3.

3. Ergebnisse

Aufgrund der Negativergebnisse wurden die Arbeitsschritte zur Gewinnung, Verarbeitung und Messung der Zellen im Durchflusszytometer optimiert. Dazu wurden zunächst die Methoden zur Ablösung der Tumorzellen in der Zellkultur untereinander verglichen. Die durchflusszytometrischen Messungen der vitalen Population zeigten vergleichbare Ergebnisse beim Lösen mit Hilfe eines Zellschabers und PBST, mit Hilfe von Trypsin und EDTA sowie beim Lösen mit EDTA. Die Verwendung eines Zellschabers zeigte bei epithelial wachsenden Zellen einen leicht größeren Anteil toter Zellen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Auch das Arbeiten mit der Zellsuspension bei maximal 4°C während des gesamten Färbungs- und Messprozesses zeigte keinen höheren Anteil lebender Zellen in der 7AAD-Lebendfärbung im Vergleich zur Arbeit bei Raumtemperatur (Ergebnisse nicht dargestellt). Das Senken der Temperatur auf 4°C bewirkt zwei Effekte: zum einen senkt es den Zellstoffwechsel und verlangsamt das Sterben der Zellen, zum anderen unterbindet es eine mögliche Rezeptorinternalisierung [98].

Das Titrieren der Antikörperkonzentration bei Zelloberflächenfärbungen zeigte ebenfalls keine signifikanten Signalveränderungen in der Durchflusszytometrie von LGR6 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Insgesamt konnte auch nach Optimierung der Arbeitsprozesse der prozentuale Anteil vitaler Zellen nicht erhöht werden und kein Hinweis von LGR4 sowie LGR6 mittels Durchflusszytometrie mit den hier verwendeten Antikörpern gefunden werden.

3.2.3 Nachweis von LGR6 in Pankreaskarzinomzellen mittels Western-Blot

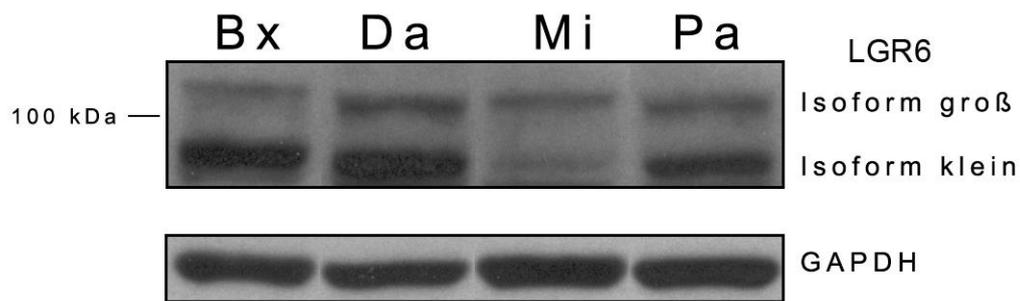
In den Genexpressionsanalysen konnte zum einen LGR6-mRNA in allen PDAC-Zelllinien nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erbrachten zum anderen keinen positiven Nachweis von LGR6-Expression auf der Zelloberfläche von PDAC-Zellen. Um sicher zu gehen, dass eine LGR6 Proteinschreibung stattfindet, wurden Western Blots angefertigt. Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte in einem 15%igen Trenngel. Zur Standardisierung der Ergebnisse wurden die Werte aus den quantitativen Messungen der Farbdichte (*Relative Light Units*), das heißt der Farbmenge pro Flächeneinheit (Densitometrie), auf die des *Housekeeping*-Gens GAPDH bezogen.

Der verwendete Antikörper detektiert laut Hersteller (Santa Cruz) alle drei Isoformen des LGR6-Rezeptors. In den Blots waren zwei unterschiedlich große Isoformen zu unterscheiden. Dabei war es nicht möglich festzustellen, inwieweit eine der im Western-Blot nachgewiesenen Produkte zwei Isoformen beinhaltet. Aus diesem Grund wird im Weiteren von einer großen sowie einer kleinen Isoform gesprochen.

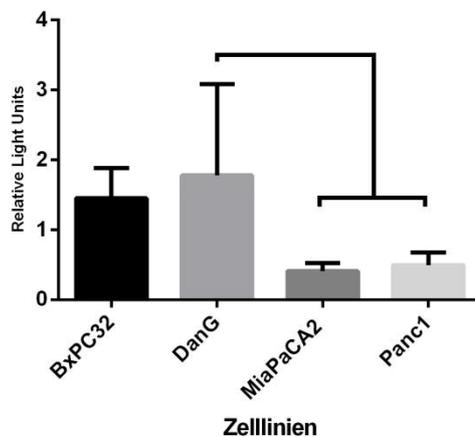
In allen untersuchten Zelllinien waren sowohl die kleine als auch die große LGR6-Isoform im Zelllysat mit Hilfe des Western-Blots nachweisbar (Abb.3.17A). Es zeigte sich, dass die kleine Isoform insgesamt ein stärkeres Signal aufweist. Weiter zeigte sie eine signifikant höhere Expression in BxPC3 und DanG gegenüber MiaPaCa2 und Panc1. In BxPC3 und DanG fanden sich vergleichbare Expressionswerte der kleinen Isoform ebenso wie zwischen MiaPaCa2 und Panc1. Insgesamt zeigte die große Isoform eine niedrigere Proteinexpression in BxPC3 und DanG im Vergleich zur Kleinen.

3. Ergebnisse

A

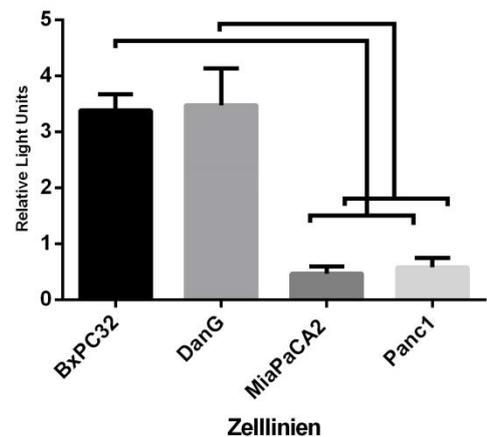


B



Isoform groß

C



Isoform klein

Abbildung 3.16: Western-Blot von LGR6. **A:** Ergebnisse des Western Blots für LGR 6 in duktalem Pankreaskarzinomzellen BxPC3 (**Bx**), DanG (**Da**), MiaPaCa2 (**Mi**), Panc1 (**Pa**). Exemplarische Darstellung eines durchgeführten Western-Blots. **B, C:** Durchschnittliche relative Dichte der LGR6-Expression bezogen auf die des Housekeeping Proteins GAPDH. Zu sehen sind zwei differenzierbare Varianten eine kleine Isoform (**B**) und eine große Isoform (**C**) des LGR-Proteins. Verwendet wurde ein LGR6-Antikörper der Firma Santa Cruz. ANOVA und Benferroni Post-Hoc Test. n=3.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe des Western Blots eine Proteinexpression von LGR6 in allen untersuchten PDAC-Zelllinien nachgewiesen werden. Insgesamt war eine signifikant höhere LGR6-Expression in den epithelialen PDAC-Zelllinien BxPC3 und DanG zu beobachten. Dabei war die Expression der kleinen LGR6-Isoform in allen Zelllinien höher verglichen mit der großen Isoform. In welchem Kompartiment der Zellen LGR6 exprimiert wird, konnte ausgehend von den Ergebnissen aus Durchflusszytometrie und Western Blot nicht geklärt werden.

3.2.4 Untersuchung der Lokalisation von LGR6 in duktalem Pankreaskarzinomzellen

Eine andere Methode, mit dessen Hilfe eine zelluläre Lokalisation nachgewiesen werden kann, stellt die Immunhistochemie dar. LGR6 konnte mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Nach den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, um eine intrazelluläre Lokalisation von LGR6 zu untersuchen. Für die Färbungen wurden je eine epitheliale Zelllinie ausgewählt: BxPC3 als diejenige Zelllinie mit der höchsten LGR6 Expression und Panc1 als mesenchymale Zelllinie.

In Arbeiten wurde beschrieben, dass Zellen bei äußerem Stress, wie das Kultivieren und Färben von Zellen, Oberflächenrezeptoren einziehen können [66]. Aus diesem Grund wurde zur Unterbindung einer möglichen Rezeptor-Internalisierung bis zur Fixierung der Zellen durch Formaldehyd bei einer Temperatur von 4°C gearbeitet [99]. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung ergab sich ein präziseres Bild der LGR6-Lokalisation innerhalb der Zelle.

Begonnen wurde mit einer LGR6-Zelloberflächenfärbung in BxPC3 und Panc1. Mehrmalige Zellfärbungen konnten keinen LGR6-Nachweis auf der Oberfläche von PDAC-Zellen nachweisen (Abb. 3.18A, B).

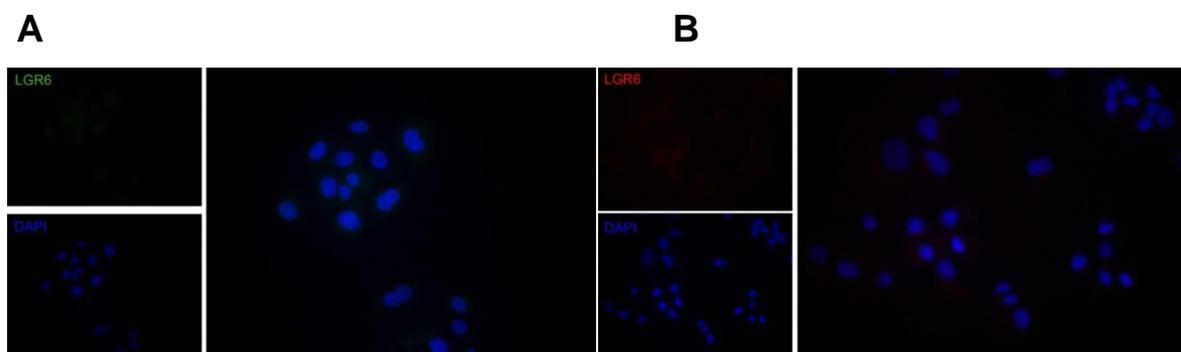


Abbildung 3.17: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreaskarzinomzellen für LGR6.

A: Immunfluoreszenzfärbung von LGR6 in BxPC3 mittels sekundärer Antikörperfärbung. Extrazelluläre Färbungen mit Hilfe FITC-gekoppelter Sekundärantikörper im Phasenkontrastmikroskop. Kein Nachweis von LGR6 auf der Zelloberfläche **B:** Immunfluoreszenzfärbung von LGR6 in Panc1 mittels TexasRed-gekoppelter sekundärer Antikörperfärbung im Phasenkontrastmikroskop. Primär-Antikörper *Human Lgr6* von R&D Systems.

3. Ergebnisse

In der anschließend durchgeführten Intrazellulärfärbung war LGR6 intrazellulär nachweisbar. Es gelang nur in Panc1 LGR6 intrazellulär anzufärben. Die Ergebnisse ergaben einen perinukleären Nachweis von LGR6. Im Gegensatz dazu konnte LGR6 in BxPC3 nicht eindeutig sichtbar gemacht werden (Abb. 3.19A, B). Aufgrund der morphologischen Darstellung, in der sich LGR6 partiell um den Zellkern gebogen konfigurierte, wurde eine Kofärbung mit Golgin-97-Antikörpern durchgeführt. Golgin-97 ist ein Golgi-Komplex-Autoantigen und spezifisch für den Golgi-Apparat [100]. Es zeigte sich eine Überlagerung von LGR6 und Golgin-97 in Panc1-Zellen. Die Kollokalisierung von LGR6 und Golgin-97 wurde verdeutlicht in den vergrößerten Mikrofotografien und den zusammengesetzten Bildern dargestellt (Abb.3.19F). Die Gelbfärbung, entstanden aus der Rotfärbung durch LGR6-Antikörper und der Grünfärbung durch Golgin-97-Antikörper, zeigte die gleiche Lokalisation der beider Proteine an und ließ auf eine Kollokalisierung schließen.

3. Ergebnisse

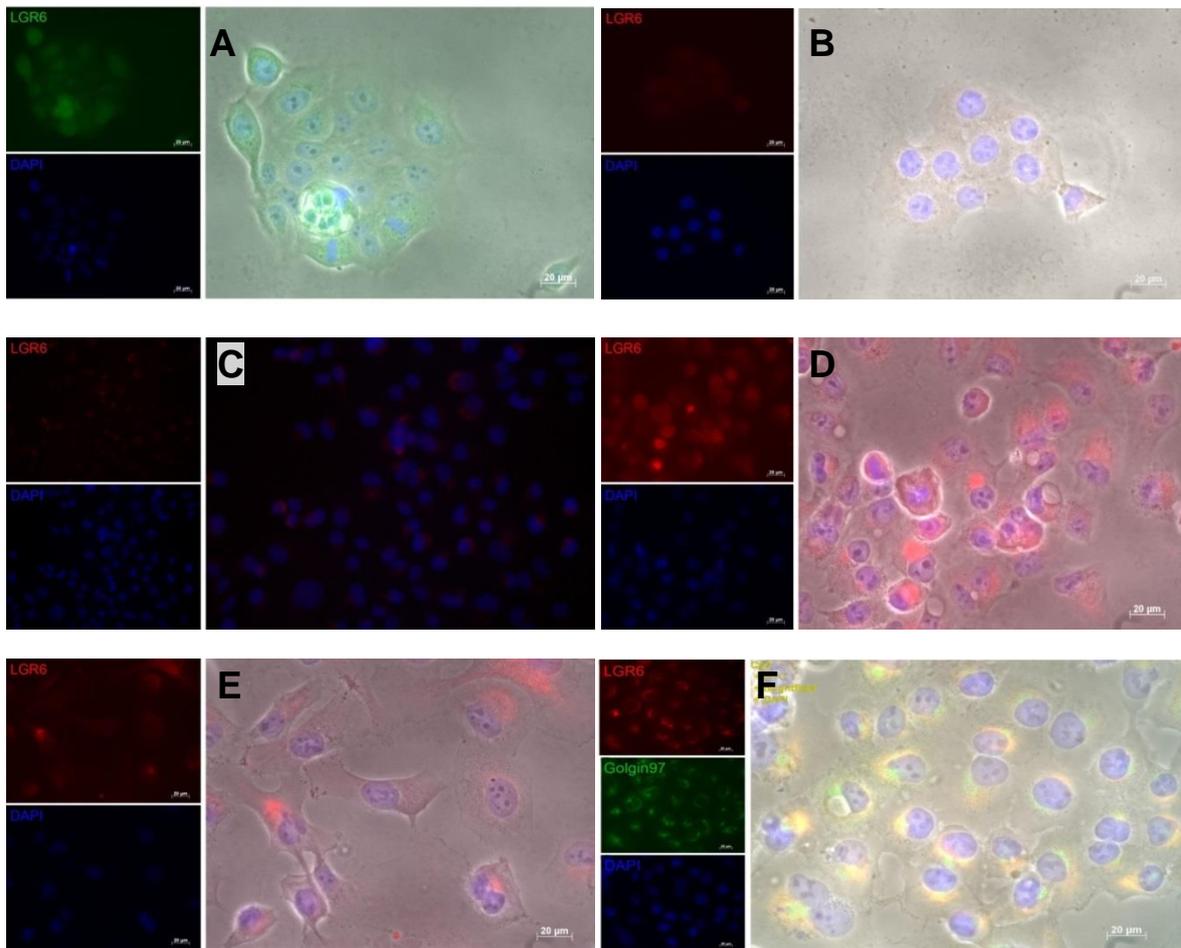


Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzfärbung von Pankreaskarzinomzellen für LGR6 und Golgin-97 .

A, B: Immunfluoreszenzfärbung von LGR6 in BxPC3 mittels sekundärer Antikörperfärbung. Färbungen mit Hilfe FITC-gekoppelter Sekundärantikörper zeigten eine grüne Proteinfärbung. Die sekundäre Antikörperfärbung mit TexasRed färbte die Proteine rot. Aufnahmen mittels Phasenkontrastmikroskop und Konfokalmikroskop. **A:** FITC-gekoppelte Antikörperfärbung in BxPC3 zeigt keinen eindeutigen LGR6-Nachweis. **B:** Sekundäre Antikörperfärbung mit TexasRed in BxPC3. Es zeigte keine LGR6-Anfärbung. **C-E:** Immunfluoreszenzfärbung von LGR6 in Panc1 mittels TexasRed-gekoppelter sekundärer Antikörperfärbung. **C:** LGR6 Färbung in Panc1 mit TexasRed im Phasenkontrastmikroskop. **D,E:** LGR6 Färbung in Panc1 mit TexasRed mittels inverser Konfokalmikroskopie. **F:** Intrazelluläre Zweifachfärbung in Panc1, LGR6 färbt sich rot, Golgin-97 zeigte sich grün angefärbt, die Gelbfärbung zeigt eine Kolokalisation der beiden Proteine an. Primär-Antikörper *Human Lgr6* von R&D Systems. μ -Balken entspricht 20 μ m.

3.3 Einfluss von Gemcitabin auf den LGR/RSPO-Komplex

Ein entscheidendes Problem in der Behandlung des Pankreaskarzinoms ist die intrinsische Chemoresistenz, welche gleichzeitig ein charakteristisches Merkmal von Krebsstammzellen (CSC) ist. Es wurde angenommen, dass sich die RSPO- bzw. LGR-Expression unter chemotherapeutischer Behandlung im Rahmen einer Stimulierung des Wnt-Signalweges verändert. Dazu wurden unbehandelte PDAC-Zelllinien mit dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabin behandelt [101]. Die Veränderungen der Genexpression von RSPO1/4 und LGR4/6 sollten untersucht und einer unbehandelten Kontrollgruppe gegenübergestellt werden. Die gewählten Methoden orientierten sich an den vorherigen Experimenten mit Bestimmung der relativen Genexpression mittels qRT-PCR, der Proteinkonzentration durch spezifischen Sandwich-ELISA und der Proteinexpression mit Hilfe von Western Blot.

3.3.1 Einfluss von Gemcitabin auf die RSPO1/4-Expression

Die RSPO1-Genexpression in Panc1 war signifikant erhöht nach 48 Stunden unter 100 ng/mL Gemcitabin (Abb.3.20B). In MiaPaCa2 konnte ebenfalls eine sichtbare Steigerung der relativen RSPO1-Expression aufgezeigt werden. Die mRNA-Expression von BxPC3 und DanG lag hierbei unterhalb der Nachweisgrenze, ebenso wie bei den Untersuchungen der RSPO4-Genexpression. In MiaPaCa2 war als einzige Zelllinie, eine Erhöhung der RSPO4-mRNA-Expression zu beobachten (Abb.3.20B).

Die RSPO1-Proteinkonzentration im Zelllysat zeigte keine relevanten Unterschiede nach Behandlung mit Gemcitabin. In BxPC3 und DanG waren gering erniedrigte Proteinkonzentrationen von RSPO1 erkennbar, wohingegen Panc1 eine nicht signifikant erhöhte Proteinkonzentration von RSPO1 aufwies (Abb.3.20C). Die Untersuchungen der RSPO4-Proteinkonzentration im Lysat ließen in allen PDAC-Zelllinien eine niedrigere Proteinmenge nach Behandlung mit Gemcitabin dokumentieren. In BxPC3 und DanG waren die Proteinkonzentrationen nach Gemcitabinbehandlung deutlich niedriger in den Kontrollen, eine statistische Signifikanz war nicht nachweisbar. In MiaPaCa2 und Panc1 war eine untereinander vergleichbar erniedrigte RSPO4-Proteinkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. Verglichen mit den beiden epithelialen Zelllinien war die Reduzierung insgesamt geringer (Abb.3.20D).

3. Ergebnisse

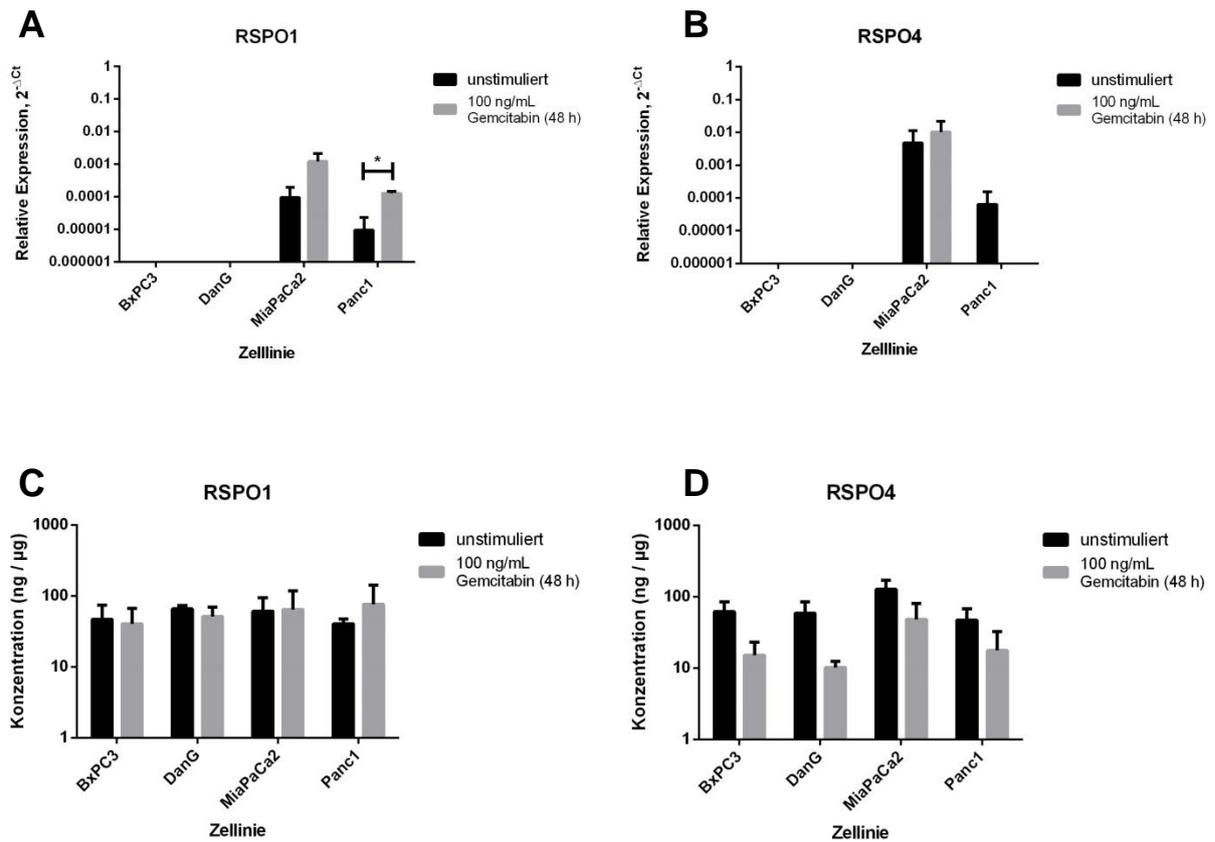


Abbildung 3.19: Expression von RSPO1 und RSPO4 nach Gemcitabinbehandlung. Bestimmung der RSPO1- und RSPO4-Expression nach Behandlung mit Gemcitabin mittels qRT-PCR und spezifischem ELISA. Die schwarzen Balken repräsentieren die unbehandelten Kontrollen (0ng/mL), die grauen Balken zeigen die Ergebnisse nach Gemcitabinbehandlung. **A:** Gemcitabin führte zur signifikanten Erhöhung der RSPO1-Genexpression in MiaPaCa2. **B:** Nach Gemcitabinbehandlung zeigten mesenchymale PDAC-Zellen eine Anstieg der RSPO4-Genexpression. **C:** Keine Veränderung der intrazellulären RSPO1-Bildung unter Gemcitabin. **D:** Es wurde eine verminderte intrazelluläre RSPO4-Konzentration unter Gemcitabin beobachtet. Konzentration ist in ng pro μ g Gesamtprotein des Zelllysats angegeben. Alle Ergebnisse wurden auf die entsprechende Standardkurve bezogen. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. Multipler t- Test und Benferronie Post-Hoc Test. $n=3$.

3.3.1 Einfluss von Gemcitabin auf die LGR4/6-Expression

Im Folgenden wurde die LGR6-Expression in unbehandelten PDAC-Zellen (schwarze Balken) und in mit Gemcitabin behandelten Karzinomzellen (graue Balken) untersucht. Es wurden Zellen mit 100 ng/mL Gemcitabin über einen Zeitraum von 48 Stunden behandelt, um den Effekt einer Zytostatikatherapie auf die LGR-Expression zu untersuchen.

Alle PDAC-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte LGR4-Expression nach Gemcitabinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb.3.21A). Auf die LGR6-Genexpression hatte die Gemcitabinbehandlung keine signifikante Auswirkung. BxPC3 wies eine gering erniedrigte LGR6-Genexpression auf. Im Vergleich dazu waren in DanG, MiaPaCa2 und Panc1 keine sichtbar relevanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu beobachten (Abb. 3.21B).

Wie bereits in 3.2.3 erläutert, wurden auch in den Gemcitabin-behandelten Zellen die zwei verschieden großen Isoformen von LGR6 untersucht. In den analysierten PDAC-Zellen war kein signifikanter Unterschied der LGR6-Expression nach Behandlung mit Gemcitabin nachweisbar (Abb.21D, E). Die größere LGR6-Isoform zeigte in BxPC3 eine geringe Erhöhung der Expression.

In Zusammenschau der Ergebnisse konnte in MiaPaCa2 eine erhöhte und in Panc1 eine signifikante erhöhte RSPO1-Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 3.20 A). Im Zelllysate war darüber hinaus in Panc1 eine höhere RSPO1-Konzentration nach Gemcitabinbehandlung zu beobachten (Abb. 3.20 C). In den epithelialen Zelllinien war kein sichtbarer Einfluss auf die RSPO-Expression zu beobachten. Unter Gemcitabin konnte in alle Zellen eine sichtbare Senkung der RSPO4-Konzentration erzielt werden (Abb. 3.20 D).

Die Untersuchungen der Gemcitabineinwirkung auf LGR4 und LGR6 ergaben keine signifikanten Veränderungen der LRG6-Expression (Abb. 3.21 B,C,D,E) und eine signifikante Erhöhung der LGR4-Genexpression nach Gemcitabinbehandlung in allen beobachteten Zelllinien (Abb. 3.21 A).

3. Ergebnisse

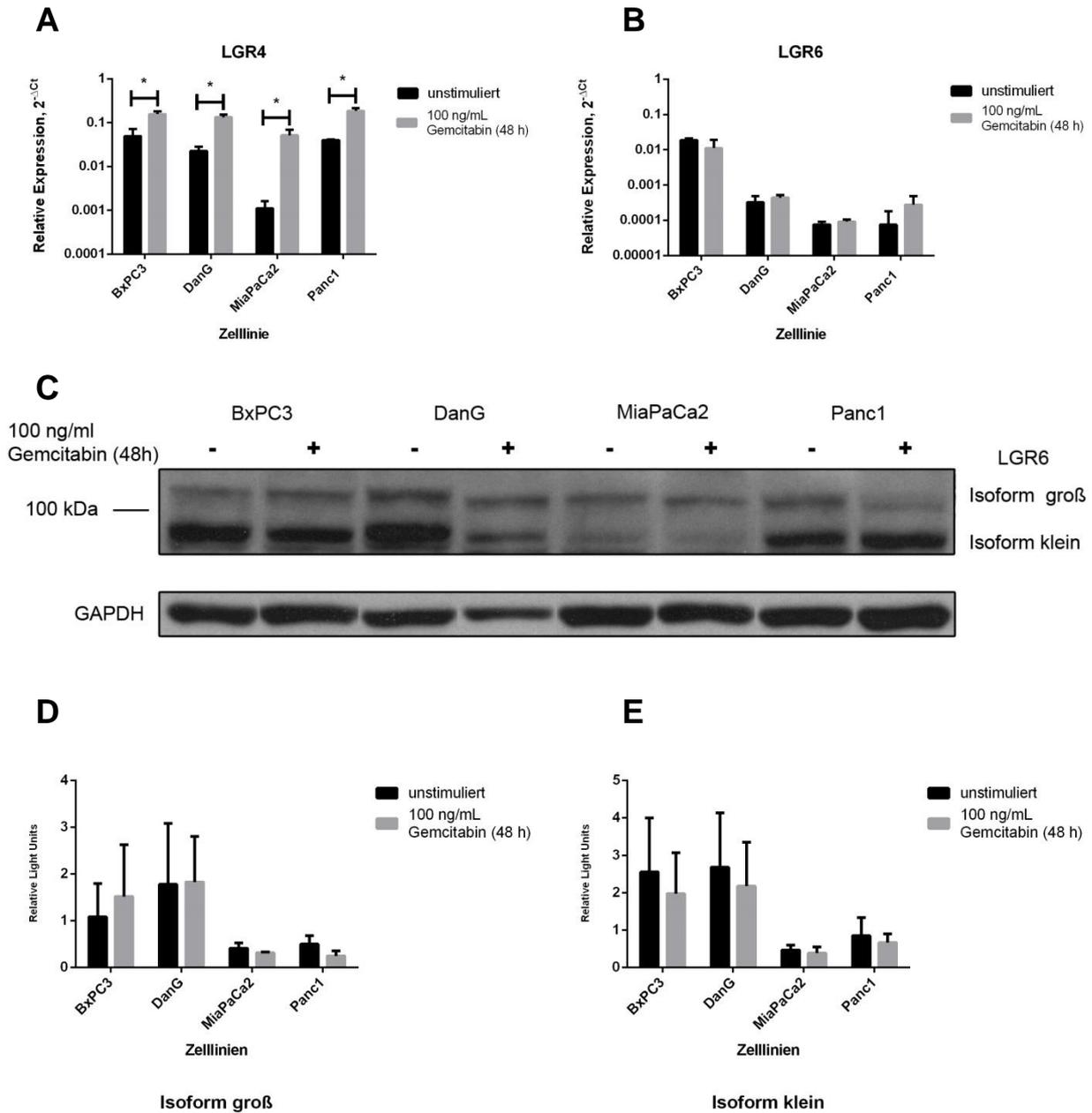


Abbildung 3.20: Expression von LGR6 nach Gemcitabinbehandlung. Ergebnisse der LGR6 Expression in PDAC-Zelllinien nach Gemcitabinbehandlung mit Hilfe von qRT-PCR und Western Blot. Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der Kontrollen (0 ng/mL), die grauen Balken zeigen die Ergebnisse nach Gemcitabinbehandlung (100 ng/mL). **A:** Die Behandlung von PDAC-Zellen mit Gemcitabin führte zur signifikant erhöhter LGR4-Genexpression. **B:** Gemcitabin zeigte keinen Einfluss auf LGR6 Genexpression. **C:** Ergebnisse des Western Blots für LGR 6 in duktales Pankreaskarzinomzellen BxPC3 (**Bx**), DanG (**Da**), MiaPaCa2 (**Mi**), Panc1 (**Pa**). Exemplarische Darstellung eines durchgeführten Western-Blots. **D,E:** Durchschnittliche relative Dichte der LGR6-Expression bezogen auf die des Housekeeping Proteins GAPDH. Zu sehen sind zwei differenzierbare Varianten ein **D:** kleine Isoform und eine **E:** große Isoform des LGR-Proteins. Verwendet wurde ein LGR6-Antikörper der Firma Santa Cruz. Multipler t- Test und Benferronie Post-Hoc Test. n=3.

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Interaktion von RSPO und LGR als Verstärker des Wnt-Signalweges in PDAC-Zellen zu untersuchen. Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Charakterisierung der PDAC-Zelllinien

In den Experimenten wurden vier etablierte PDAC-Zelllinien verwendet. Die Aufteilung erfolgte in mesenchymale und epitheliale Zelllinien auf Grundlage des morphologischen Erscheinungsbildes im Lichtmikroskop und der Genexpression des etablierten Stammzellmarkers *ZEB1*. *ZEB1* ist ein Zink-Finger-Transkriptionsfaktor der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), der nachweislich in mesenchymalen Tumorzellen verstärkt exprimiert wird [102]. Als EMT bezeichnet man den Übergang epithelialer Zellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. EMT in epithelialen Krebszellen fördert die Migration, Invasion und Ausbreitung. Es konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Tumorzellen eine hohe *ZEB1*-Genexpression aufweisen. Daher sollte *ZEB1* zur Abgrenzung von epithelialen PDAC-Zellen dienen [89, 90, 103]. Zusätzlich sollte in den PDAC-Zelllinien mit Hilfe von Genexpressionsanalysen etablierter Wnt-Zielgene wie *AXIN2* [92], *EPHB2* [93] und *PROX1* [104] auf eine mögliche Wnt-Aktivität geschlossen werden.

Die Zelllinien BxPC3 und DanG werden aufgrund ihres morphologischen Erscheinungsbildes im Lichtmikroskop und einer niedrigen *ZEB1*-Genexpression als epitheliale Zelllinien eingeordnet. MiaPaCa2 und Panc1 werden hinsichtlich ihrer Zellmorphologie und hoher *ZEB1*-Genexpression zu den mesenchymalen PDAC-Zellen gezählt.

Eine abnorme Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion fördert die Entwicklung und das Voranschreiten multipler Tumoren und gilt als entscheidender Signalweg bei der Entstehung von Krebsstammzellen (CSC) [105-107]. In PDAC-Zellen bzw. bestimmten Subgruppen wurde in mehreren Veröffentlichungen eine aktive Wnt-Signaltransduktion beschrieben. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Wnt-Signalaktivität während der Pankreaskarzinomentstehung schrittweise erhöht ist [82, 108].

Eine Einschätzung der Wnt-Aktivität ist mit Hilfe der Genexpressionsanalysen nur indirekt möglich. Zur direkten Bestimmungen sind Messungen der Wnt-Aktivität mittels sog. etablierter Wnt/ β -Catenin-abhängigen Reportersystemen wie TOP-/FOPflash oder BAR

4. Diskussion

nötig. Eine Bestimmung der Wnt-Signalaktivität in PDAC-Zellen wurde bereits durch Arensman et al., 2014 [82] und Ilmer et al., 2015 [96] demonstriert.

Arensman et al. verwendeten 2014 β -Catenin-aktivierte Reportertests (BAR) und den Nachweis einer endogenen *AXIN2*-Genexpression. Hierdurch wurden nicht nur sehr unterschiedliche β -Catenin-Transkriptionsaktivitäten in Pankreastumoren und –Zelllinien aufgezeigt, sondern auch eine positive Korrelation zwischen Wnt-Signalaktivität und *AXIN2*-Genexpression nachgewiesen [82].

Durch die Bestimmung der *AXIN2*- und *EPHB2*-Genexpression in dieser Arbeit konnte indirekt auf eine bestehende Wnt-Signalaktivität in den verwendeten PDAC-Zellen geschlossen werden. Wie bereits durch Ilmer et al., 2015 beschrieben, lassen Unterschiede in den Wnt-Zielgenexpressionen eine aktive und zwischen den Zelllinien unterschiedliche Wnt-Signaltransduktion vermuten [96].

Es bleibt zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien insgesamt eine niedrige Wnt-Aktivität aufweisen. Dies hängt nicht zuletzt damit zusammen, dass Mutationen der Wnt-Signalwegkomponenten in PDAC-Zellen untypisch sind [109] und es wahrscheinlicher ist, dass die Anwesenheit anderer Mutationen, wie KRAS, zur Stimulierung dieser Signalachse führen [110]. So ist die nachweisbare Signalaktivität in PDAC vergleichsweise deutlich niedriger als in Tumoren mit nachgewiesener Wnt-Signalwegmutationen wie im kolorektalen Karzinom (CRC) [111].

4.2 RSPO in duktalem Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die Untersuchung der Basisexpression von RSPOs in PDAC-Zelllinien erfolgte mittels qRT-PCR. Bemerkenswert war eine deutlich höhere RSPO-Genexpression in den mesenchymalen verglichen mit den epithelialen Zelllinien. Interessanterweise lagen zu Beginn dieser Arbeit keine Untersuchungen zur Expression von RSPO1 und RSPO4 in humanen PDAC-Zelllinien vor. In dieser Arbeit ließen sich zudem Parallelen zwischen der Expression des etablierten Stammzellmarkers *ZEB1* und von RSPO1 sowie RSPO4 beobachten. Dies würde die Annahme einer für mesenchymalen PDAC-Zellen typischen Expression unterstreichen.

Die Genexpressionsanalysen von RSPO3 ergaben eine insgesamt niedrige mRNA-Expression. In den meisten untersuchten Zelllinien lagen die Expressionen sogar unterhalb der Nachweisgrenze. RSPOs sind in der Lage, den kanonischen Wnt-Signalweg in Zellen zu verstärken [55-57, 112-114]. RSPO2 und RSPO3 sind unter den

4. Diskussion

RSPOs die potentesten Wnt-Signalverstärker in Tumoren [80]. Entsprechend der Daten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ist die RSPO2-Genkopiezahl innerhalb der RSPO-Familie die einzige, die im duktalem Pankreaskarzinom höher ist im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe. Zudem beschreiben Chartier et al. erhöhte RSPO2- und RSPO3-Genexpressionen in Patientengewebe von Pankreastumoren [115]. Einen weiteren Hinweis für eine tragende Rolle in der Unterhaltung des Wnt-Signalweges im PDAC erbrachten Ilmer et al. 2015, indem sie zeigen konnten, dass erhöhte RSPO2-Genexpressionen in Pankreastumoren und ihren Krebsstammzellen in verschiedenen Modellen nachweisbar waren. Zusätzlich waren in Zellen mit hoher Wnt-Signalaktivität auch erhöhte Expressionen von RSPO2 zu beobachten, woraus sich schließen ließ, dass RSPO2 im PDAC als Wnt-Signalverstärker fungiert [96]. Eine Genexpression von RSPO2 konnte in dieser Arbeit nur in einem Teil der PDAC-Zelllinien nachgewiesen werden. Steht die RSPO2-Expression in Korrelation zur Wnt-Signalaktivität, können die gezeigten Ergebnisse zur Annahme einer heterogenen Wnt-Signalaktivität im PDAC führen. Zu erwähnen ist, dass sich die Ergebnisse der genannten Publikationen nur zum Teil auf Zelllinien und überwiegend auf Zellen in Tumorgeweben beziehen. Die gezeigten Daten in dieser Arbeit gehen aus dem Zelllinien-Modell hervor.

Aufgrund der Genexpressionsanalysen konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen hier auf die im PDAC weniger beschriebenen RSPO1 und RSPO4. Besonders interessant sind dabei die Expressionsunterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen, die somit auf eine unterschiedliche Funktion der RSPOs in PDAC-Zellen hinweisen könnte.

Der nächste Schritt war die Untersuchung von RSPO1 und RSPO4 auf Proteinebene. Aus dem Zelllysate wurden mit Hilfe eines Sandwich ELISAs die RSPO-Proteinkonzentrationen bestimmt. Aus den Genexpressionsanalysen wären Konzentrationsunterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen Zelllinien zu erwarten gewesen. Überraschend wiesen alle untersuchten PDAC-Zelllinien eine etwa gleich hohe RSPO1- und RSPO4-Konzentrationen im Zelllysate auf. Zum Zeitpunkt der Arbeit lagen keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

Es wurde bereits gezeigt, dass PDAC-Zellen mehrere Wnt-Liganden exprimieren [116]. Zudem sind RSPOs sezernierte Proteine [54], die neben der Stimulierung der Mikroumgebung von Tumorzellen auch autokrine Signalübertragung funktionieren. In humanen Brust- und Ovarial-Karzinomzelllinien beispielsweise wurde diese Möglichkeit der Aktivierung des Wnt-Signalweges unlängst diskutiert [117]. Es sollte daher untersucht werden, ob die dokumentierten Unterschiede zwischen Gen- und Proteinexpression auf einer aktiven RSPO-Sekretion im Sinne einer autokrinen Stimulierung basieren. Es wurde

4. Diskussion

hypothetisiert, dass bei Zellen mit einer höheren RSPO-Genexpression eine aktive Sekretion in das Zellkulturmedium nachweisbar sein müsste. Folglich wurden die RSPO-Proteinkonzentrationen auch im Kulturmedium mittels Sandwich ELISA bestimmt.

Die Proteinbestimmungen im Zellkulturmedium konnten keine signifikanten RSPO-Konzentrationen im Zellkulturmedium nachweisen. Darüber hinaus waren keine Unterschiede zwischen den PDAC-Zelllinien auffällig. Auf der einen Seite könnte dies gegen eine RSPO-Sekretion der PDAC-Zellen sprechen. Auf der anderen Seite wäre eine direkt Bindung der RSPOs an die extrazelluläre denkbar, so wie es von Nam et al. bereits 2006 beobachtet wurde [55]. Dies wäre ein wichtiger Aspekt, den es zu klären gilt, um den Genexpressionsunterschieden weiter nachzugehen. Es zeigt jedoch auch die Grenzen der Sandwich ELISA-Methode auf. Intrazelluläre und an die Zelloberfläche gebundene RSPOs werden bei der Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysat miterfasst. Eine Differenzierung zwischen zytosolischen und membrangebundenen RSPOs war dabei nicht möglich. Besonders interessant wäre hierbei jedoch eine unterschiedliche intrazelluläre Verteilung der RSPOs in epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmals die Expression von RSPO1 und RSPO4 in verschiedenen PDAC-Zelllinien nachgewiesen. Diese scheinen hierbei für mesenchymale PDAC-Zellen typisch zu sein und mit dem Stammzellmarker ZEB1 zu korrelieren. Die Genexpressionsunterschiede weisen dabei auf mögliche Funktionsunterschiede in epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen hin.

Die Untersuchung der RSPOs zeigt zudem Gemeinsamkeiten der RSPO1- und RSPO4-Expression. Sowohl RSPO1 als auch RSPO4 weisen Unterschiede zwischen Gen- und Protein-Expression auf. Eine aktive Sekretion in die Mikroumgebung der Zellen konnte mit Hilfe der Proteinbestimmungen im Zellkulturmedium nicht nachgewiesen werden. Damit konnte die Hypothese einer autokrinen Stimulierung der PDAC-Zellen schlussendlich nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine Möglichkeit zur Untersuchung einer Sekretion von RSPOs wäre die Immunhistochemie. Die Genexpressionsanalysen von RSPO2 und RSPO3, erbrachten letztendlich mit den hier verwendeten Methoden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien. Dennoch ist eine Diskrepanz zwischen Genexpression und Proteinexpression, ähnlich wie im Fall von RSPO1 und RSPO4, durchaus denkbar. Somit ist nicht auszuschließen, dass trotz niedriger Genexpression eine relevante Proteinumschreibung stattfinden kann.

4.3 LGR in duktalem Pankreaskarzinomzelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit wurden epitheliale und mesenchymale PDAC-Zelllinien unterschieden. Durch Expressionsunterschiede von LGR im Zusammenhang mit der Zellmorphologie sollte in erster Linie eine mögliche Rolle als Stammzellmarker im PDAC untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass mesenchymale Krebszellen, welche durch beispielsweise EMT entstehen, Eigenschaften von Krebsstammzellen einschließlich Selbsterneuerung und Medikamentenresistenz aufweisen [118].

Zur Untersuchung der LGR-Expression wurden Genexpressionsanalysen mit Hilfe von qRT-PCR durchgeführt, welche insbesondere bei den *LGR4* und *LGR6*-Expressionen interessante Ergebnisse aufwiesen. In den Untersuchungen der *LGR4*-Expression waren neben einer Genexpression in allen untersuchten PDAC-Zelllinien auch Unterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen zu beobachten. Insgesamt war die *LGR4*-mRNA Expression in den epithelialen verglichen mit den mesenchymalen Zellen unterschiedlich. Literaturrecherchen zeigen bezüglich der *LGR4*-Expression kontroverse Ergebnisse. Van den Broeck et al. beschreiben neben erhöhten Genexpressionen etablierter PDAC-Stammzellmarker, Krebsstammzelleigenschaften markierende Gene, darunter *LGR4*, in einer Subpopulation von PDAC-Zellen in Tumorgewebe. Die Zellen der beschriebenen Subpopulation wurde als tumorös, epithelial und chemoresistent charakterisiert [119]. Andererseits veröffentlichten Carr et al. in ihren „*G-Protein coupled Receptor*“-Analysen (*GPCR Arrays*), dass *LGR4* in Pankreastumorgewebe verglichen mit normalem Pankreasgewebe herunterreguliert ist [120]. An dieser Stelle soll daran erinnert werden, dass die Ergebnisse der Arbeiten in Tumorgewebe generiert wurden, während in der vorliegenden Arbeit Zelllinien untersucht wurden.

Die *LGR5*-Genexpressionsanalysen ergaben insgesamt sehr niedrige *LGR5*-mRNA Expressionen in den untersuchten PDAC-Zelllinien. *LGR5* ist ein vielfach untersuchtes Wnt-Zielgen [121] und Simon et al. konnten signifikant mehr *LGR5*-positive Zellen mit signifikant höheren *LGR5*-mRNA-Leveln in Pankreaskarzinomen verglichen mit nicht-neoplastischem Pankreasgewebe nachweisen [122]. Es scheint so, dass manche Zellen wie z.B. Stammzellen, eine hohe *LGR5*-Genexpression aufweisen können. Aufgrund fehlender Anreicherung von CSCs konnte dies jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden. Für diese Annahme sprechen Ergebnisse, welche die Arbeit von Amsterdam et al. aufzeigt. Hier wurde *LGR5* in seiner Eigenschaft als Stammzellmarker im PDAC untersucht und die Lokalisation des etablierten Stammzellmarkers *Nanog* [123] und *LGR5* in normalen Pankreasgeweben sowie in karzinomatösen Pankreasgeweben mit Hilfe von Immunhistochemie verglichen. Nachweislich waren sowohl *Nanog*- als auch *LGR5*-

4. Diskussion

Expressionen in den β -Zellen des endokrinen Pankreas lokalisiert. Darüber hinaus waren einzelne, versprengte und desorganisierte sowie für LGR5 und Nanog positive Inseln in der Nähe exokriner Ausführungsgänge zu beobachten. Diese Ergebnisse unterstreichen die von Amsterdam et al. postulierte Theorie einer möglichen Stammzellnische in den Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas, die durch LGR5 charakterisiert werden [41]. In Bezug auf die erwähnten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen insbesondere in den mesenchymalen Zelllinien wäre daher eine stärkere LGR5-Genexpression zu erwarten gewesen.

Die Genexpressionsanalysen von LGR6 ergaben sehr interessante Ergebnisse mit deutlichen Unterschieden in der LGR6-Expression. **Insbesondere epitheliale Zelllinien, wie BxPC3, zeigen hier im Vergleich zu mesenchymalen Zelllinien signifikant höhere LGR6-Expressionen. Die insgesamt höhere LGR6-mRNA-Expression in den epithelialen Zellen scheint dabei mit dem Stammzellmarker ZEB1 eine inverse Korrelation aufzuweisen. LGR6 scheint demnach typisch für epitheliale Zellen im PDAC zu sein.**

Bislang wurden LGR6-mRNA-Expressionen nur mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen in Schweißdrüsen, in adulten Stammzellen und in differenzierten Zellen der Haut beschrieben. Hierbei zeigten differenzierte Zellen eine vergleichsweise niedrigere LGR6-Genexpression [124]. Dem *The Human Protein Atlas* zufolge weist gesundes Pankreasgewebe LGR6-Proteinexpression, aber keine LGR6-mRNA-Expression auf. Im Pankreaskarzinom variiert die LGR6-Proteinexpression zudem sehr stark (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000133067-LGR6/tissue>). Veröffentlichungen zur LGR6-Grundexpression in PDAC-Zelllinien lagen zum Zeitpunkt der Arbeit nicht vor.

Zusammenfassend konnte erstmals eine LGR4- sowie LGR6-Genexpression in PDAC-Zelllinien nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigen insbesondere die epithelialen Zellen deutlich höhere LGR-Expressionen im Vergleich zu mesenchymalen Zellen. Hierbei scheint der Unterschied in epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen in Bezug auf die LGR6-mRNA Expression größer zu sein. Im Hinblick auf die hier beschriebenen sowie bereits veröffentlichten Ergebnisse zu LGR5 lag der Fokus im Weiteren auf LGR4 und LGR6.

4.3.1 LGR6 in PDAC

Nach den Untersuchungen der Genexpressionen sollten LGR4 und LGR6 auf der Proteinebene untersucht werden. In der Literatur werden LGR als Zelloberflächenproteine beschrieben [125]; aus diesem Grund wurde die Durchflusszytometrie zum Nachweis von LGR auf der Zelloberfläche verwendet. Überraschenderweise konnten mit den hier verwendeten Materialien keine LGR4- oder LGR6-positiven Zellpopulation dokumentieren werden. Im Rahmen der Fehleranalysen wurden die Arbeitsschritte optimiert. Zunächst wurde untersucht, ob das zum Lösen der Zellen in der Zellkultur verwendet Trypsin/EDTA, Einfluss auf den Anteil lebender Zellen oder auf die Zelloberfläche hat. Im Folgenden wurden Trypsin/EDTA, EDTA allein bzw. ein Zellschaber zum Lösen der Zellen verwendet. Einen weiteren interessanten Aspekt hierzu veröffentlichten Arancibia-Carcamob et al., die durch das Senken der Temperatur auf 4°C, neben einem reduzierten Zellstoffwechsel und einem verlängerten Zellüberleben, auch die Hemmung einer mögliche Rezeptorinternalisierung beobachteten [98]. Im Anschluss wurden die Zellen unter Raumtemperatur und bei 4°C auf LGR4 und LGR6 für die Durchflusszytometrie gefärbt. Auch unter den aufgeführten Maßnahmen waren LGR4 und LGR6 nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar. Es musste eine etablierte Methode zur Erfassung von Proteinen aller Zellkompartimenten erfolgen, sodass zunächst Western Blots für LGR6 angefertigt wurden. Hiermit konnten die Ergebnisse aus den Genexpressionsanalysen bestätigt werden. Auch auf Proteinebene weisen epitheliale Zellen signifikant höhere LGR6-Expressionen auf. Die Ergebnisse implizieren, dass LGR4 und LGR6 womöglich nicht auf der Zelloberfläche von PDAC-Zellen exprimiert werden. Ähnliche Beobachtungen beschreiben Carmon et al., die sog. Internalisierungen (Einziehungen) von LGRs in große intrazelluläre Endosomen dokumentierten. Dabei können diese an RSPO gebunden sein, sind aber auch ungebunden nachweisbar [66].

Bereits in den Untersuchungen im Western Blot fielen das Vorhandensein unterschiedlicher LGR6-Isoformen auf. Das *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59352>) listet drei LGR6-Isoformen. Die Isoform 1 ist die einzige Isoform mit einem Signalpeptid. Diese markieren Proteinen für den nachfolgenden Transport durch den sekretorischen Weg zum Endoplasmatische Retikulum (ER) [126]. Isoform 2 weist eine hohe Strukturhomologie zu Isoform 1 auf, besitzt jedoch kein Signalpeptid. Der Isoform 3 fehlen neben dem Signal-Peptid ein wichtiger Teil der extrazellulären Regionen im Vergleich zu den anderen Isoformen. Strukturanalysen von Peng et al. zufolge wird die Bindungsstelle der RSPOs an LGR4-6 von Leucin-reichen Regionen (LRR) LRR3-LRR9 gebildet [127]. Diese liegen

4. Diskussion

interessanterweise in der extrazellulären Domäne, die bei Isoform 3 nicht zu finden ist. Aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen den Isoformen und der gezeigten engen Parallelen von Gen- und Proteinexpression, wurden selbstkonzipierte LGR6-Primer für weitere Genanalysen verwendet. Zur einfacheren Unterscheidung wurden die mRNA-Splice-Varianten kurz als „Varianten“ und die LGR6-Protein-Isoformen kurz als „Isoformen“ bezeichnet. Auf den ersten Blick sind Unterschiede in den Genexpressionsanalysen zwischen den Splice-Varianten auffällig. Vorzugsweise wird die Variante 1 (LGR6_V1) sowohl in epithelialen als auch in mesenchymalen PDAC-Zellen exprimiert. Dem entgegen werden die LGR6-Varianten 2 und 3 (LGR6_V2, _V3) nur von epithelialen PDAC-Zellen exprimiert. In den angefertigten Western Blots wurde ein Antikörper verwendet, der alle drei Isoformen bindet. Eine exakte Unterscheidung der LGR6-Isoformen war in den Western Blots jedoch nicht möglich. Ausgehend von der Proteinmasse wurde die große Isoform als Isoform 1 identifiziert. Inwieweit die als kleine Isoform bezeichnete, die Isoformen 2 und 3 gemeinsam repräsentieren oder nur eine der Isoformen, konnte mit den angefertigten Western Blots nicht näher belegt werden. Insbesondere Isoform 1 weist in den epithelialen PDAC-Zelllinien eine deutlich höhere Expression auf. Auffallend ist zudem, dass die Expression der kleineren Isoform in den epithelialen Zelllinien mehr als doppelt so hoch verglichen mit der größeren Isoform 1 ist. In den mesenchymalen Zellen hingegen ist die kleine Isoform in etwa so hoch exprimiert wie Isoform 1. **Hieraus lässt sich schließen, es bestehen Expressionsunterschiede von LGR6 zwischen epithelialen und mesenchymalen Zelllinien. Darüber hinaus weisen die LGR6-Isoformen Expressionsunterschiede in epithelialen Zelllinien auf, wohingegen kein signifikanter Expressionsunterschied der LGR6-Isoformen in mesenchymalen Zelllinien zu bestehen scheint.**

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, welche Aufschluss über die Lokalisation von LGR6 erbringen sollten. Tatsächlich waren in den immunhistochemischen Färbungen perinukleär konzentrierte Ansammlungen von LGR6, vereinbar mit dem trans-Golgi-Netzwerk, zu beobachten. Durch eine Zweifachfärbung für LGR6 und dem Golgi-Apparat konnte diese Annahme bestätigt werden. Auch Snyder et al. publizieren eine lediglich sehr schwache Expression von LGR5, als Strukturhomologen von LGR6, auf der Zelloberfläche einer embryonalen Zelllinie. In der Konfokalmikroskopie war LGR5 ebenfalls überwiegend in einem perinukleären Kompartiment der Zellen, dem trans-Golgi-Netzwerk, zu finden [128]. Diese Beobachtungen können so interpretiert werden, dass LGRs in stammzellartige Tumorzellen weniger an der Zelloberfläche exprimiert werden, sondern vielmehr im intrazellulären Kompartiment zu finden sind. Hierfür spricht, dass zum einen in der mesenchymalen PDAC-Zelllinie Panc1 LGR6 im

4. Diskussion

Golgi-Apparat konzentriert ist und zum anderen in der epithelialen Zelllinie BxPC3 nicht. **Es kann somit gefolgert werden, dass LGR6 von PDAC-Zellen exprimiert wird und in mesenchymalen PDAC-Zellen vermehrt im Golgi-Apparat lokalisiert ist.** Hinzu kommt, dass die Isoform 1 ein Signal-Peptid aufweist und am sekretorischen Transport der Zelle teilnehmen sollte. Folglich kann postuliert werden, dass es sich bei dem Nachweis von LGR6 im Trans-Golgi-Apparat mesenchymaler PDAC-Zellen um die LGR6 Isoform 1 handeln könnte. Ein weiterer entscheidender Aspekt in diesem Zusammenhang ist der in der Immunfluoreszenzfärbung verwendete LGR6-Antikörper. Laut Hersteller bindet dieser an die größte LGR6-Isoform 1 mit 967 Aminosäuren (AS) und untermauert die Identifizierung von Isoform 1 in mesenchymalen PDAC-Zellen. Hieraus lässt sich jedoch keine Aussage über die Lokalisation der Isoformen in der epithelialen Zelllinie ableiten. Ebenso ist eine Expression der LGR6-Isoform 1 an anderer Stelle innerhalb der Zelle nicht gänzlich auszuschließen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit scheint sie jedoch nicht im Trans-Golgi-Apparat epithelialer PDAC-Zellen lokalisiert zu sein. Zudem könnten verschiedenen Lokalisationen von LGR6 auf unterschiedliche Funktion in mesenchymalen und epithelialen PDAC-Zellen hinweisen. Dies wird durch die Expressionsunterschiede der LGR6-Isoformen zusätzlich bestärkt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass PDAC-Zelllinien LGR6 exprimieren. Insbesondere die Expressionsunterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen sind dabei auffallend. LGR6 scheint als Stammzellmarker im PDAC ungeeignet zu sein. PDAC-Zellen mit einer hohen LGR6-Genexpression sind tendenziell morphologisch epithelial und weisen niedrige *ZEB1*-mRNA Expressionen auf. Mesenchymale PDAC-Zellen weisen hingegen niedrige LGR6-Genexpressionen auf. LGR6 wird nicht nur in epithelialen PDAC-Zellen signifikant höher exprimiert, die bekannten LGR6-Isoformen weisen darüber hinaus Expressionsunterschiede innerhalb dieser Zellen auf. Die LGR6-Expression in mesenchymalen PDAC-Zellen ist hingegen niedriger und es scheinen keine Expressionsunterschiede zwischen den LGR6-Isoformen zu bestehen. Zudem kann die LGR6-Isoform 1 im Golgi-Apparat einer mesenchymalen PDAC-Zelllinie nachgewiesen werden und spricht für eine konstitutive Internalisierung sowie den Transport in das Trans-Golgi-Netzwerk in mesenchymalen PDAC-Zellen. Die Lokalisation von LGR6 in epitheliale Zelllinien bleibt weiterhin nachzuweisen. Die Expressionsunterschiede sowie verschiedene Lokalisationen innerhalb epithelialer und mesenchymaler PDAC-Zellen lässt auf eine unterschiedliche LGR6-Funktion im PDAC zu schließen. Weiterführende Untersuchungen der LGR6-Isoformen scheinen nicht nur deshalb weiter interessant zu werden.

4.4 RSPO2-Stimulationsversuche

Ein Stimulationsaufbau mit Hilfe exogen zugeführten RSPOs sollte zeigen, inwieweit RSPOs auf die Genexpression des RSPO-LGR-Komplexes Einfluss nimmt. Die Ergebnisse sollten Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion des RSPO-LGR-Komplexes in der Wnt-Signaltransduktion ermöglichen und zur Identifizierung möglicher Wnt-Zielgene im PDAC beitragen.

Alle vier humanen RSPOs sind in der Lage den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu aktivieren. Heute weiß man, dass RSPOs einen gemeinsamen Funktionsmechanismus besitzen und dass LGR4/5/6 als ihre Rezeptoren fungieren [67, 129]. Kim et al. postulieren zudem unterschiedliche Wirkungen auf den Wnt-Signalweg. RSPO2 und RSPO3 wurden als potente Wnt-Signalverstärker in embryonalen Zelllinien identifiziert, während RSPO1 und RSPO4 einen vergleichsweise geringen Effekt auf das zytosolische β -Catenin-Level haben [114]. Auf Grundlage der Publikationen von Kim et al. [114, 129] sowie der von Ilmer et al. demonstrierten, induzierten Wnt-Signalaktivität nach exogener RSPO2-Stimulation in PDAC-Zellen [96], wurde RSPO2 für die Stimulationsversuche in PDAC-Zelllinien ausgewählt.

Bei den Genexpressionsanalysen von RSPO1 und RSPO4 ließen sich keine signifikanten Veränderungen nach 24 Stunden unter RSPO2-Einwirkung feststellen. Die LGR6-Genexpression nach Stimulation mit RSPO2 zeigt hingegen in allen PDAC-Zelllinien bereits nach 24 Stunden eine Erhöhung der mRNA-Expression. Somit lässt sich sagen, dass die exogene Stimulation mit RSPO2 zu einer Erhöhung der Genexpression von LGR6 führt. In Verbindung mit der durch RSPO2 induzierten Wnt-Signalaktivität in PDAC [96], kann LGR6 als mögliches Wnt-Zielgen im PDAC identifiziert werden. Darüber hinaus wiesen die Zelllinien mit einer hohen Expression der etablierten Wnt-Zielgene *AXIN2* und *EPHB2* eine entsprechend höhere LGR6-Genexpression auf.

Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob die Ergebnisse auf dem Protein-Level reproduzierbar sind. Hierfür bieten sich die bereits beschriebenen Methoden (Sandwich ELISA/Western Blot) an. Eine fundierte Aussage zu formulieren, ist angesichts der RSPO2-Wirkungsdauer von 24 Stunden nur bedingt möglich. Die Ergebnisse weisen jedoch eindeutig auf einen stimulierenden Effekt von RSPO2 auf die LGR-Genexpression hin.

4.5 Expression des RSPO-LGR-Komplexes nach Gemcitabinbehandlung

Das duktales Pankreaskarzinom ist häufig gegenüber konventioneller Chemotherapie und Radiotherapie resistent. Die Chemoresistenz führt im Hinblick auf den Mangel an therapeutischen Alternativen zu einer insgesamt sehr schlechten Prognose. Seit langem ist Gemcitabin die Standardtherapie für fortgeschrittene PDACs. Jedoch ist Gemcitabin allein nicht sehr effektiv und es kommt nicht selten zu Chemoresistenzen [130].

Eine Behandlung mit Gemcitabin soll insbesondere die Zahl differenzierter Zellen senken. Im Umkehrschluss sollen CSCs aufgrund ihrer Fähigkeit der Chemoresistenz überleben. Folglich sollte unter Einfluss von Gemcitabin eine Veränderung der RSPO-LGR-Expression zu beobachten sein, falls alle Mitglieder dieses Komplexes einen Beitrag zur CSC-haftigkeit leisten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden vier PDAC-Zelllinien mit 100 ng/mL Gemcitabin [131] über 48 Stunden [101] behandelt und die Veränderungen der Expression von RSPO1/4 und LGR4/6 auf Gen- und Protein-Ebene untersucht. Dieser Versuchsaufbau sollte zeigen, welche Rolle der RSPO-LGR-Verstärkerkomplex in der Entstehung von Chemoresistenzen spielt, um mögliche Zielstrukturen neuer Therapieoptionen zu identifizieren.

4.5.1 RSPO unter Gemcitabinbehandlung

Die Behandlung mit Gemcitabin führt bereits nach 48 Stunden zu einer Erhöhung der RSPO-Genexpression in mesenchymalen PDAC-Zelllinien. In epithelialen PDAC-Zellen scheint die Behandlung mit Gemcitabin hingegen keinen Einfluss auf die RSPO-mRNA-Expression zu nehmen. Um die Beobachtungen aus den Genanalysen zu bestätigen, wurden die Messungen der RSPO-Proteinkonzentrationen mittels ELISA wiederholt. Überraschenderweise waren Änderungen der RSPO-Proteinkonzentrationen im Zelllysat nach Gemcitabineinwirkung kaum sichtbar. Nach Behandlung mit Gemcitabin lässt sich sogar eine erniedrigte RSPO1-Konzentration in den epithelialen PDAC-Zelllinien erkennen. Mesenchymale Zelllinien, insbesondere Panc1, scheinen hingegen nach der Gemcitabinbehandlung leicht erhöhte RSPO1-Konzentrationen aufzuweisen. Diese Ergebnisse waren sowohl auf Gen- als auch auf Protein-Ebene nachweisbar. Die erhöhte RSPO1-Expression der CSC-ähnlichen, mesenchymalen Zelllinien unter Gemcitabineinwirkung spricht für eine mögliche Beteiligung von RSPO1 in der Chemoresistenzentwicklung im PDAC.

Interessanterweise war im Gegensatz zu RSPO1 infolge der Behandlung mit Gemcitabin

eine sichtbare Reduktion der RSPO4-Konzentration im Zelllysate mesenchymaler Zellen nachweisbar.

4.5.2 LGR4/6 unter Gemcitabinbehandlung

Vor dem Hintergrund dass Gemcitabin zur Aktivierung des Wnt-Signalweges führt, wurde hypothesiert, dass dies auch die LGR4- und LGR6-Expression nach der Behandlung erhöhen könnte.

Und tatsächlich ist bereits nach 48 Stunden unter Gemcitabin eine signifikante Erhöhung der LGR4-Genexpression zu beobachten. Diese Ergebnisse sprechen für eine höhere LGR4-Expression in den überlebenden, also CSC-ähnlichen Zellen. Einen geringeren Einfluss scheint Gemcitabin auf die mRNA-Expression von LGR6 zu haben. Nach 48 Stunden waren keine signifikanten Veränderungen der LGR6-Expression nachweisbar. Die Proteinuntersuchungen bestätigten diese Ergebnisse. Insbesondere die kleinere LGR6-Isoform scheint unter Gemcitabin weniger exprimiert zu werden. Aber auch die große Isoform zeigt niedrigere Expressionen in den mesenchymalen Zellen nach der Behandlung. Unter Gemcitabineinwirkung sollte die Zahl differenzierter Zellen reduziert sein und eine erniedrigte LGR6-Expression würde diese Hypothese untermauern.

Weitere Fragen werfen jedoch die Expressionsergebnisse der Isoform 1 in den epithelialen Zellen auf, welche unter Gemcitabin teilweise unbeeinflusst und in BxPC3 sogar erhöht sind. Gerade diese Beobachtungen befeuern jedoch die Annahme möglicher unterschiedlicher Funktionen der LGR6-Isoformen im PDAC und verstärken das Interesse weiterführender Untersuchungen.

Zusammengefasst zeigen die Experimente mit Gemcitabin eine mögliche Teilhabe von RSPO1 an der Entstehung der Chemoresistenz im PDAC. Die LGR6-Expression scheint unter Gemcitabin insgesamt reduziert. Unterschiede bei der Expression der LGR6-Isoformen bekräftigen die Hypothese möglicher unterschiedlicher Funktionen von LGR6-Isoformen im PDAC. Hingegen zeigt LGR4 nach Gemcitabinbehandlung eine signifikante Expressionserhöhung. Angesichts eines Versuchsaufbaus mit einem Beobachtungsintervall von 48 Stunden sollten auch hier Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen.

4.6 Ausblick

In der vorgelegten Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass humane PDAC-Zelllinien sowohl RSPO1/4 als auch LGR6 exprimieren. Insbesondere auf dem mRNA-Level waren Unterschiede in der RSPO-Expression zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen zu beobachten. Die Proteinkonzentrationen von RSPO1 und RSPO4 waren in allen beobachteten Zelllinien vergleichbar, zeigten jedoch in den Genexpressionsanalysen Unterschiede zwischen den Zelllinien. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass eine RSPO-Sekretion in mesenchymalen PDAC-Zellen im Rahmen einer autokrinen Stimulation stattfindet. Mit den angewandten Methoden konnte dies bislang nicht bestätigt werden; eine Sekretion von RSPOs mit anschließender Bindung an die Zelloberfläche [55] wäre jedoch vorstellbar. Immunhistochemische Zellfärbungen wären eine geeignete Methode, um eine Zelloberflächenbindung nachzuweisen. Die Untersuchung der RSPO-Lokalisierung könnte zudem Aufschluss über die Diskrepanz zwischen Genexpression und Proteinkonzentration in den epithelialen und mesenchymalen Zellen geben. Ein Nachweis auf der Zelloberfläche kann in diesem Fall eine aktive Funktion von RSPOs in PDAC-Zellen verdeutlichen.

Die LGR6-Expression in epithelialen Zellen war höher im Vergleich zu den mesenchymalen Zellen. Die Untersuchungen der LGR6-Isoformen ergaben ebenfalls Expressionsunterschiede. Trotz der nachweislich höheren Expression in den epithelialen PDAC-Zelllinien, gelang der Nachweis von LGR6 erstmals in mesenchymalen PDAC-Zellen. Um der Frage nachzugehen, ob LGR6 ein Marker in epithelialen PDAC-Zellen ist oder als ein Stammzellmarker in PDAC fungieren könnte, sollten Untersuchungen der drei LGR6-Isoformen mit jeweils spezifischen Antikörpern erfolgen. Die LGR6-Isoform 1 war im Golgi-Apparat einer mesenchymalen Zelllinie nachweisbar, über die Isoform 2 und 3 konnten jedoch keine genauen Ergebnisse bezüglich der Expression eruiert werden. In dieser Arbeit stand ein Antikörper zur Detektion der LGR6-Isoform 1 zur Verfügung. Daher sollten Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Isoformen 2 und 3 als nächste Schritte eingeplant werden. Western Blots und Immunhistochemie können mit Hilfe der spezifischen Antikörper Expressionsunterschiede, Ergebnisse zur Verteilung und Aufschluss über verschiedene Rollen der LGR6-Isoformen in epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen geben.

4. Diskussion

Der Stimulationsversuch mit RSPO2 hat gezeigt, dass die exogene Zugabe eines LGR-Liganden zur Expressionserhöhung von LGR6 führt und identifiziert es als mögliches Wnt-Zielgen. Zum einen muss für die Verifizierung der Ergebnisse, eine Wiederholung auf dem Protein-Level erfolgen. Hierzu empfiehlt sich der beschriebene Western Blot. Zum anderen ist ein Versuchsaufbau, der den Einfluss von RSPOs über einen längeren Zeitraum und zu unterschiedlichen Zeitpunkten dokumentiert, wichtig, um eine fundierte Aussage über den RSPO-Einfluss im Hinblick auf den RSPO-LGR-Komplex treffen zu können.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Gemcitabinbehandlung, sollte auch hier die RSPO- und LGR-Expression an unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden. Es wäre interessant über einen bestimmten Zeitraum mit Gemcitabin behandelte Zellen, Gemcitabin-resistente Zellen und unbehandelte Zellen bezüglich ihrer RSPO-LGR-Expression gegenüberzustellen. Dies wäre eine Möglichkeit die Rolle des RSPO-LGR-Komplexes in der Chemoresistenzentstehung im PDAC zu untersuchen. Auch vor dem Hintergrund einer möglichen Rolle von LGR6 als Stammzellmarker im PDAC, wäre dieser Versuchsaufbau passend. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Expression der LGR6-Isoformen unter Gemcitabin unterschiedlich stark verändert. Eine Senkung der Expression einer der LGR6-Isoformen durch Gemcitabin würde dafür sprechen, dass LGR6 als epithelialer Marker in Frage kommt. Eine Erhöhung einer der Isoformen könnte zudem als ein Stammzellmarker im PDAC genutzt werden.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die Wnt-Signalaktivität in dieser Arbeit nicht direkt untersucht wurde. Es lassen sich daher keine Aussagen über die Wnt-Signalaktivität in den verwendeten PDAC-Zelllinien treffen. Um einen Kausalzusammenhang zwischen der RSPO-LGR-Expression sowie einer erhöhten Wnt-Signaltransduktion belegen zu können, muss eine Untersuchung der Wnt-Signalaktivität in den untersuchten Zelllinien erfolgen. Nur hierdurch kann die Rolle des RSPO-LGR-Komplexes in der Wnt-Signalaktivität und der Entstehung oder Aufrechterhaltung im PDAC letztlich untersucht werden. Etablierte Methoden sind, wie bereits in 4.1 erwähnt die TOP-/FOPflash und BAR-Systeme. Hierauf aufbauend können Stimulationsexperimente wie diese, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, den direkten Einfluss des RSPO-LGR-Verstärkerkomplexes in der Wnt-Signaltransduktion untersuchen.

5. Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom (PDAC) zählt zu den Tumorerkrankungen mit einer sehr schlechten Prognose. Neben zahlreichen bekannten Signalwegen ist dem Wnt-Signalweg eine sehr wichtige Rolle im Entstehungsprozess von Karzinomen zuzuordnen. Ein regulatorisches Element in der Wnt-Signalkette ist der Wnt-Signalverstärkerkomplex, bestehend aus *Leucine-Rich Repeat containing G-Protein-coupled Receptor* (LGR) und ihren Liganden, den R-Spondinen (RSPO). Inwieweit dem Wnt-Signalweg in der Entstehung des PDAC eine tragende Rolle zukommt, ist Teil intensiver Forschungsbemühungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Grundexpression von RSPO und LGR in PDAC-Zelllinien zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen bei der Untersuchung zur Rolle des RSPO-LGR-Komplexes im Wnt-Signalweg, insbesondere im PDAC, beitragen.

Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR zur Genexpressionsanalyse und ELISA zur Messung der RSPO-Konzentration konnte erstmals die Expression von RSPO1 und RSPO4 in humanen PDAC-Zelllinien nachgewiesen werden. Die Proteinanalyse ergab vergleichbare RSPO1- und RSPO4-Proteinkonzentrationen in den PDAC-Zelllinien. Im Vergleich dazu wies die Genexpressionsanalyse auf bestehende Unterschiede zwischen epithelialen sowie mesenchymalen Zellen und somit auf Unterschiede zwischen differenzierten und schlecht differenzierten Tumorzellen hin. Mesenchymale PDAC-Zellen weisen sowohl höhere RSPO1- als auch RSPO4-mRNA Expressionen auf. Die Hypothese einer aktiven RSPO-Sekretion in das Zellkulturmedium durch PDAC-Zellen im Sinne einer autokrinen Stimulierung, als Erklärung der Diskrepanz zwischen Protein- und mRNA-Expression, konnte abschließend nicht belegt werden. Eine Sekretion und autokrine Stimulation durch Bindung von RSPOs an die Zelloberfläche ist bislang nicht wiederlegt worden.

Ein wesentlicher Teil dieser Doktorarbeit war es, den bereits als Stammzellmarker in der Haut, einschließlich Haarfollikel [75, 76], den Geschmackspapillen [77], der Lunge [78] und in Brustdrüsengewebe [75] beschriebenen Rezeptor LGR6 zu untersuchen. Die Beschreibung eines Stammzellmarkers im PDAC wäre eine wichtige Entdeckung zur Identifizierung hoch aggressiver und chemoresistenter PDAC. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen, Durchflusszytometrie, Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung konnte die LGR6-Expression erstmals in PDAC-Zelllinien nachgewiesen werden. Auch hier sind Unterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen PDAC-Zellen nachweisbar. Insgesamt war die LGR6-Expression in epithelialen PDAC-Zelllinien deutlich höher im Vergleich zu den mesenchymalen Zelllinien. Weiterführende Untersuchungen der drei bislang bekannten LGR6-Isoformen

5. Zusammenfassung

erfolgten unter anderem mit selbstentworfenen und für die LGR6-Splicevarianten spezifischen Primern. Trotz einer nachweislich höheren LGR6-Expression in den epithelialen Zelllinien, gelang der Nachweis der großen LGR6-Isoform erstmals im Golgi-Apparat einer mesenchymalen PDAC-Zelllinie per Immunfluoreszenzfärbung.

Durch exogene Stimulierung mit RSPO2 sollte die Aktivierung des RSPO-LGR-Komplexes mit konsekutiver Wnt-Signalverstärkung untersucht werden. In einem Stimulationsexperiment mit dem Wnt-Signalverstärker RSPO2 konnte mit Hilfe von quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden, dass die Genexpression von LGR6 erhöht war.

Ein besonderer, klinisch relevanter Aspekt ist die Chemoresistenz des PDAC. Der Wnt-Signalweg ist neben der Krebsentstehung auch in die CSC-Bildung und Chemoresistenzentwicklung involviert. Zur Untersuchung einer möglichen Funktion von RSPO1/4 und LGR6 in chemoresistenten Tumorzellen wurden PDAC-Zelllinien mit dem Zytostatikum Gemcitabin über 48 Stunden behandelt. Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR, ELISA und Western Blot wurden behandelte Zellen mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Die Behandlung von PDAC-Zellen mit Gemcitabin zeigt sehr unterschiedliche Veränderungen in der RSPO- und LGR-Expressionen. Es können sowohl Unterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen Zelllinien als auch zwischen mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Auf Gen-Ebene kommt es in behandelten Zellen zu deutlich erhöhten Expressionen von RSPO1 sowie RSPO4 in den mesenchymalen PDAC-Zelllinien und zu einer signifikant erhöhten LGR4-Genexpression in allen untersuchten PDAC-Zelllinien. Auf Proteinebene führt Gemcitabin zur Reduzierung der nachweisbaren RSPO4-Konzentration im Zelllysat. Nach Behandlung mit Gemcitabin scheint die LGR6-Genexpression insgesamt niedriger zu sein. Auch scheinen LGR6-Isoformen Unterschiede aufzuweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dar, dass sowohl RSPO1/4 als auch LGR6 in PDAC exprimiert werden. Insbesondere auf Gen-Ebene wurden dabei Unterschiede zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen deutlich. Die exogene Stimulierung des Wnt-Signalweges durch den Wnt-Signalverstärker RSPO2 erhöht die LGR6-Genexpression deutlich. Im Kontrast dazu führt die Behandlung mit Gemcitabin zu einer niedrigeren LGR6-Expression und weist somit auf LGR6 als möglichen epithelialen Marker im PDAC hin. Spannend scheint indes auch die Untersuchung der LGR6-Isoformen zu sein, welche Unterschiede in der Expression von LGR6-Isoformen im PDAC aufweisen. Diese könnten in Zukunft Anknüpfungspunkte diagnostischer und sogar therapeutischer Strategien sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Kamisawa, T., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2016. **388**(10039): p. 73-85.
2. Raimondi, S., et al., *Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(3): p. 349-58.
3. Deutschland, R.K.-I.u.d.G.d.e.K.i., *Bauchspeicheldrüsenkrebs (Pankreaskarzinom)*. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html, 2015.
4. Reissfelder, C., et al., [*Pancreatic carcinoma*]. Chirurg, 2007. **78**(11): p. 1059-71; quiz 1072.
5. *Nationale Fallsammlung Familiäres Pankreaskarzinom*. <http://www.fapaca.de/>.
6. Keane, M.G., et al., *A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer*. BMJ Open, 2014. **4**(11): p. e005720.
7. Fan, Z., et al., *Application of contrast-enhanced ultrasound in the diagnosis of solid pancreatic lesions--a comparison of conventional ultrasound and contrast-enhanced CT*. Eur J Radiol, 2013. **82**(9): p. 1385-90.
8. Miura, F., et al., *Diagnosis of pancreatic cancer*. HPB (Oxford), 2006. **8**(5): p. 337-42.
9. Park, H.S., et al., *Preoperative evaluation of pancreatic cancer: comparison of gadolinium-enhanced dynamic MRI with MR cholangiopancreatography versus MDCT*. J Magn Reson Imaging, 2009. **30**(3): p. 586-95.
10. Rijkers, A.P., et al., *Usefulness of F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography to confirm suspected pancreatic cancer: a meta-analysis*. Eur J Surg Oncol, 2014. **40**(7): p. 794-804.
11. DeWitt, J., et al., *Comparison of endoscopic ultrasonography and multidetector computed tomography for detecting and staging pancreatic cancer*. Ann Intern Med, 2004. **141**(10): p. 753-63.
12. Agarwal, B., et al., *Endoscopic ultrasound after preoperative chemoradiation can help identify patients who benefit maximally after surgical esophageal resection*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(7): p. 1258-66.
13. Tamburrino, D., et al., *Selection criteria in resectable pancreatic cancer: a biological and morphological approach*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(32): p. 11210-5.
14. van Heek, N.T., et al., *Hospital volume and mortality after pancreatic resection: a systematic review and an evaluation of intervention in the Netherlands*. Ann Surg, 2005. **242**(6): p. 781-8, discussion 788-90.
15. Bramhall, S.R., et al., *Treatment and survival in 13,560 patients with pancreatic cancer, and incidence of the disease, in the West Midlands: an epidemiological study*. Br J Surg, 1995. **82**(1): p. 111-5.
16. Katz, M.H., C.H. Crane, and G. Varadhachary, *Management of borderline resectable pancreatic cancer*. Semin Radiat Oncol, 2014. **24**(2): p. 105-12.
17. Hartwig, W., et al., *Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome*. Ann Surg, 2011. **254**(2): p. 311-9.
18. Wagner, M., et al., *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Br J Surg, 2004. **91**(5): p. 586-94.
19. Sultana, A., et al., *Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2607-15.
20. Burris, H.A., 3rd, et al., *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. J Clin Oncol, 1997. **15**(6): p. 2403-13.
21. Moore, M.J., et al., *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, 2007. **25**(15): p. 1960-6.

6. Literaturverzeichnis

22. Von Hoff, D.D., et al., *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*. N Engl J Med, 2013. **369**(18): p. 1691-703.
23. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
24. Pelzer, U., et al., *Best supportive care (BSC) versus oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (OFF) plus BSC in patients for second-line advanced pancreatic cancer: a phase III-study from the German CONKO-study group*. Eur J Cancer, 2011. **47**(11): p. 1676-81.
25. Wang-Gillam, A., et al., *Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet, 2016. **387**(10018): p. 545-57.
26. Neoptolemos, J.P., et al., *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(12): p. 1200-10.
27. Seufferlein, T., et al., *[S3-guideline exocrine pancreatic cancer]*. Z Gastroenterol, 2013. **51**(12): p. 1395-440.
28. Barker, N. and H. Clevers, *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells*. Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1681-96.
29. Cheung, T.H. and T.A. Rando, *Molecular regulation of stem cell quiescence*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(6): p. 329-40.
30. Mimeault, M., R. Hauke, and S.K. Batra, *Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(3): p. 252-64.
31. Lin, H., *The stem-cell niche theory: lessons from flies*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(12): p. 931-40.
32. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
33. Ferraro, F., C.L. Celso, and D. Scadden, *Adult stem cells and their niches*. Adv Exp Med Biol, 2010. **695**: p. 155-68.
34. Xie, T. and A.C. Spradling, *decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary*. Cell, 1998. **94**(2): p. 251-60.
35. Kimble, J.E. and J.G. White, *On the control of germ cell development in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1981. **81**(2): p. 208-19.
36. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
37. Tumber, T., et al., *Defining the epithelial stem cell niche in skin*. Science, 2004. **303**(5656): p. 359-63.
38. Barker, N., et al., *Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1003-7.
39. Koblas, T., et al., *Isolation and characterization of human CXCR4-positive pancreatic cells*. Folia Biol (Praha), 2007. **53**(1): p. 13-22.
40. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors*. Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
41. Amsterdam, A., et al., *LGR5 and Nanog identify stem cell signature of pancreas beta cells which initiate pancreatic cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **433**(2): p. 157-62.
42. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
43. Rahman, M., et al., *The cancer stem cell hypothesis: failures and pitfalls*. Neurosurgery, 2011. **68**(2): p. 531-45; discussion 545.
44. Li, Y., et al., *Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(9): p. 799-806.

6. Literaturverzeichnis

45. Wicha, M.S., S. Liu, and G. Dontu, *Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift*. *Cancer Res*, 2006. **66**(4): p. 1883-90; discussion 1895-6.
46. Deutschland, R.K.-I.u.d.G.d.e.K.i., *Krebs gesamt*. http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html;jsessionid=C577F19BB30D34374BD0C2F81FA66190.2_cid363, 2015.
47. Turashvili, G., et al., *Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis*. *Pathobiology*, 2006. **73**(5): p. 213-23.
48. Bejsovec, A., *Flying at the head of the pack: Wnt biology in Drosophila*. *Oncogene*, 2006. **25**(57): p. 7442-9.
49. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. *Organogenesis*, 2008. **4**(2): p. 68-75.
50. Duchartre, Y., Y.M. Kim, and M. Kahn, *The Wnt signaling pathway in cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016. **99**: p. 141-9.
51. Li, L. and W.B. Neaves, *Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters*. *Cancer Res*, 2006. **66**(9): p. 4553-7.
52. Fodde, R. and T. Brabletz, *Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(2): p. 150-8.
53. Reya, T. and H. Clevers, *Wnt signalling in stem cells and cancer*. *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
54. Kazanskaya, O., et al., *R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis*. *Dev Cell*, 2004. **7**(4): p. 525-34.
55. Nam, J.S., et al., *Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(19): p. 13247-57.
56. Jin, Y.R. and J.K. Yoon, *The R-spondin family of proteins: emerging regulators of WNT signaling*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(12): p. 2278-87.
57. de Lau, W.B., B. Snel, and H.C. Clevers, *The R-spondin protein family*. *Genome Biol*, 2012. **13**(3): p. 242.
58. Kamata, T., et al., *R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1676**(1): p. 51-62.
59. Parma, P., et al., *R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy*. *Nat Genet*, 2006. **38**(11): p. 1304-9.
60. Kim, K.A., et al., *Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium*. *Science*, 2005. **309**(5738): p. 1256-9.
61. Papapietro, O., et al., *R-spondin 2 signalling mediates susceptibility to fatal infectious diarrhoea*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 1898.
62. Kazanskaya, O., et al., *The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development*. *Development*, 2008. **135**(22): p. 3655-64.
63. Seshagiri, S., et al., *Recurrent R-spondin fusions in colon cancer*. *Nature*, 2012. **488**(7413): p. 660-4.
64. Bruchle, N.O., et al., *RSPO4 is the major gene in autosomal-recessive onychia and mutations cluster in the furin-like cysteine-rich domains of the Wnt signaling ligand R-spondin 4*. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(4): p. 791-6.
65. Barker, N., S. Tan, and H. Clevers, *Lgr proteins in epithelial stem cell biology*. *Development*, 2013. **140**(12): p. 2484-94.
66. Carmon, K.S., et al., *R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(28): p. 11452-7.
67. de Lau, W., et al., *Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling*. *Nature*, 2011. **476**(7360): p. 293-7.

6. Literaturverzeichnis

68. Glinka, A., et al., *LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling*. EMBO Rep, 2011. **12**(10): p. 1055-61.
69. Ruffner, H., et al., *R-Spondin potentiates Wnt/beta-catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e40976.
70. Van Schoore, G., et al., *Expression pattern of the orphan receptor LGR4/GPR48 gene in the mouse*. Histochem Cell Biol, 2005. **124**(1): p. 35-50.
71. Mustata, R.C., et al., *Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells ex vivo*. EMBO Rep, 2011. **12**(6): p. 558-64.
72. Mazerbourg, S., et al., *Leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor 4 null mice exhibit intrauterine growth retardation associated with embryonic and perinatal lethality*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2241-54.
73. Barker, N., et al., *Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(1): p. 25-36.
74. Jaks, V., et al., *Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells*. Nat Genet, 2008. **40**(11): p. 1291-9.
75. Snippert, H.J., et al., *Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin*. Science, 2010. **327**(5971): p. 1385-9.
76. Fullgrabe, A., et al., *Dynamics of Lgr6(+) Progenitor Cells in the Hair Follicle, Sebaceous Gland, and Interfollicular Epidermis*. Stem Cell Reports, 2015. **5**(5): p. 843-55.
77. Ren, W., et al., *Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells ex vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(46): p. 16401-6.
78. Oeztuerk-Winder, F., et al., *Regulation of human lung alveolar multipotent cells by a novel p38alpha MAPK/miR-17-92 axis*. EMBO J, 2012. **31**(16): p. 3431-41.
79. Hao, H.X., et al., *ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 195-200.
80. Hao, H.X., X. Jiang, and F. Cong, *Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer*. Cancers (Basel), 2016. **8**(6).
81. Pasca di Magliano, M., et al., *Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1155.
82. Arensman, M.D., et al., *WNT7B mediates autocrine Wnt/beta-catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma*. Oncogene, 2014. **33**(7): p. 899-908.
83. Pujal, J., G. Capella, and F.X. Real, *The Wnt pathway is active in a small subset of pancreas cancer cell lines*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(1): p. 73-9.
84. Shibayama, Y., et al., *(Pro)renin receptor is crucial for Wnt/beta-catenin-dependent genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8854.
85. Wang, L., et al., *Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta-catenin stabilization*. Cancer Cell, 2009. **15**(3): p. 207-19.
86. Nawroth, R., et al., *Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells*. PLoS One, 2007. **2**(4): p. e392.
87. Morris, J.P.t., S.C. Wang, and M. Hebrok, *KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 683-95.
88. Zembruski, N.C., et al., *7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry*. Anal Biochem, 2012. **429**(1): p. 79-81.
89. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1487-95.
90. Arumugam, T., et al., *Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5820-8.

6. Literaturverzeichnis

91. Krausova, M. and V. Korinek, *Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer*. Cell Signal, 2014. **26**(3): p. 570-9.
92. Lustig, B., et al., *Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(4): p. 1184-93.
93. Batlle, E., et al., *Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB*. Cell, 2002. **111**(2): p. 251-63.
94. Petrova, T.V., et al., *Transcription factor PROX1 induces colon cancer progression by promoting the transition from benign to highly dysplastic phenotype*. Cancer Cell, 2008. **13**(5): p. 407-19.
95. Deer, E.L., et al., *Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2010. **39**(4): p. 425-35.
96. Ilmer, M., et al., *RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells*. Cancer Res, 2015. **75**(9): p. 1883-96.
97. Zhu, C., et al., *LGR4 acts as a key receptor for R-spondin 2 to promote osteogenesis through Wnt signaling pathway*. Cell Signal, 2016. **28**(8): p. 989-1000.
98. Arancibia-Carcamo, I.L., et al., *Studying the Localization, Surface Stability and Endocytosis of Neurotransmitter Receptors by Antibody Labeling and Biotinylation Approaches*, in *The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology*, J.T. Kittler and S.J. Moss, Editors. 2006: Boca Raton (FL).
99. Li, Z., W. Zhang, and M.W. Mulholland, *LGR4 and Its Role in Intestinal Protection and Energy Metabolism*. Front Endocrinol (Lausanne), 2015. **6**: p. 131.
100. Griffith, K.J., et al., *Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1693-702.
101. Cioffi, M., et al., *The miR-17-92 cluster counteracts quiescence and chemoresistance in a distinct subpopulation of pancreatic cancer stem cells*. Gut, 2015. **64**(12): p. 1936-48.
102. Zheng, X., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer*. Nature, 2015. **527**(7579): p. 525-30.
103. Meidhof, S., et al., *ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(6): p. 831-47.
104. Saukkonen, K., et al., *PROX1 and beta-catenin are prognostic markers in pancreatic ductal adenocarcinoma*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 472.
105. Zeilstra, J., et al., *Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3655-61.
106. Schwarz-Romond, T., *Three decades of Wnt signalling*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2664.
107. Anastas, J.N. and R.T. Moon, *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(1): p. 11-26.
108. Yu, L., et al., *Rab11a sustains GSK3beta/Wnt/beta-catenin signaling to enhance cancer progression in pancreatic cancer*. Tumour Biol, 2016. **37**(10): p. 13821-13829.
109. Sano, M., et al., *Activation of WNT/beta-Catenin Signaling Enhances Pancreatic Cancer Development and the Malignant Potential Via Up-regulation of Cyr61*. Neoplasia, 2016. **18**(12): p. 785-794.
110. Witkiewicz, A.K., et al., *Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6744.
111. Novellasdemunt, L., P. Antas, and V.S. Li, *Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms*. Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **309**(8): p. C511-21.
112. Binnerts, M.E., et al., *R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14700-5.
113. Wei, Q., et al., *R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15903-11.

6. Literaturverzeichnis

114. Kim, K.A., et al., *R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2588-96.
115. Chartier, C., et al., *Therapeutic Targeting of Tumor-Derived R-Spondin Attenuates beta-Catenin Signaling and Tumorigenesis in Multiple Cancer Types*. Cancer Res, 2016. **76**(3): p. 713-23.
116. Zhang, Y., et al., *Canonical wnt signaling is required for pancreatic carcinogenesis*. Cancer Res, 2013. **73**(15): p. 4909-22.
117. Bafico, A., et al., *An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells*. Cancer Cell, 2004. **6**(5): p. 497-506.
118. Zhang, P., Y. Sun, and L. Ma, *ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance*. Cell Cycle, 2015. **14**(4): p. 481-7.
119. Van den Broeck, A., et al., *Human pancreatic cancer contains a side population expressing cancer stem cell-associated and prognostic genes*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73968.
120. Carr, J.C., et al., *Differentiation of small bowel and pancreatic neuroendocrine tumors by gene-expression profiling*. Surgery, 2012. **152**(6): p. 998-1007.
121. Yamamoto, Y., et al., *Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations*. Hepatology, 2003. **37**(3): p. 528-33.
122. Simon, E., et al., *The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35486.
123. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
124. Ohe, S., et al., *Maintenance of sweat glands by stem cells located in the acral epithelium*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **466**(3): p. 333-8.
125. Loh, E.D., S.R. Broussard, and L.F. Kolakowski, *Molecular characterization of a novel glycoprotein hormone G-protein-coupled receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **282**(3): p. 757-64.
126. Emanuelsson, O., et al., *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence*. J Mol Biol, 2000. **300**(4): p. 1005-16.
127. Peng, W.C., et al., *Structure of stem cell growth factor R-spondin 1 in complex with the ectodomain of its receptor LGR5*. Cell Rep, 2013. **3**(6): p. 1885-92.
128. Snyder, J.C., et al., *Constitutive internalization of the leucine-rich G protein-coupled receptor-5 (LGR5) to the trans-Golgi network*. J Biol Chem, 2013. **288**(15): p. 10286-97.
129. Kim, K.A., et al., *R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation*. Cell Cycle, 2006. **5**(1): p. 23-6.
130. Kreutzer, J.N., M. Ruzzene, and B. Guerra, *Enhancing chemosensitivity to gemcitabine via RNA interference targeting the catalytic subunits of protein kinase CK2 in human pancreatic cancer cells*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 440.
131. Adikrisna, R., et al., *Identification of pancreatic cancer stem cells and selective toxicity of chemotherapeutic agents*. Gastroenterology, 2012. **143**(1): p. 234-45 e7.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mir vom Beginn meines Medizinstudiums, über die Studienzeit sowie bei der Arbeit im Labor, bis zur Fertigstellung der Promotionsarbeit mit Rat und Tat, wie auch moralisch zur Seite standen und mich unterstützt haben.

Im Besonderen möchte ich den folgenden Personen meinen Dank aussprechen, die mich in der Zeit meiner Promotion gefördert und gefordert haben.

Mein Dank gilt Dr. Matthias Ilmer, meinem Doktorvater, für die Betreuung während der Entstehung und Fertigstellung der Arbeit. Dafür dass er mich für die Forschung begeistert hat, für seine unendliche Geduld die er nicht nur während des Korrekturlesens aufgebracht hat. Ich danke ihm dafür, dass er mich auch nach Rückschlägen motivieren konnte und für den sehr großen Anteil den er an dieser Arbeit trägt.

Herrn Prof. Alexandr Bazhin der es mir nicht nur ermöglicht hat in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie experimentell forschen zu dürfen. Vielmehr danke ich ihm für sein breites und fundiertes Wissen sowie seinen Erfahrungen an denen er mich in zahlreichen Besprechungen teilhaben lies. Ich danke ihm dafür, dass er mir bei Problemen stets weiterhalf, für seine sympathische Art und für das aufmerksame Korrekturlesen.

Meinen Kollegen der AG Bazhin/Ilmer und der experimentellen Forschung Chirurgie, insbesondere Karin Enderle und Ines Nachtigall danke ich für die Hilfe beim Erlernen der Methodik und für die Unterstützung während sowie neben der Arbeit im Labor.

Einen besonderen Dank gilt meinen Eltern für eine unbeschwerte Jugend, die mir moralische Werte sowie Prinzipien mit auf den Weg gaben und es mir ermöglichten Medizin zu studieren. Vielen Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir ein Vorbild im Leben und im Beruf seid.

Meinem Bruder und seiner Freundin für das Korrekturlesen und die hilfreichen Ratschläge.

Meinen Großeltern die mir beim Aufwachsen stets mit ihrer Lebenserfahrung weiterhalfen und mir immer gezeigt haben wie stolz sie auf mich sind und mich somit motivierten.

Meinem guten Freund David Pfeifer der mich zur experimentellen Forschung gebracht hat und mich immer angespornt hat. Danke für deine Freundschaft.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Leipzig, 13.08.2019

Daniel Härtwig

Ort, Datum

Daniel Härtwig