

**Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Transkriptomanalysen Pankreatischer Stellatum Zellen in
parakrinen 2D- und 3D-Ko-Kulturen mit
Pankreaskarzinomzelllinien

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

von Anaïs Aurelia Zourelidis
geboren am 02.09.1996 in München
Betreuer: Prof. Dr. med. Jörg Kleeff

Gutachter*innen:
Prof. Dr. Jonas Rosendahl, Halle
Prof. Dr. Martin Loos, Heidelberg

Datum der Verteidigung: 07.08.2023

Referat

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDA) zeichnet sich durch seine hohe Letalität aus. Charakteristisch für das Pankreaskarzinom ist eine ausgeprägte Stromareaktion, wobei Pankreatische Stellatum Zellen (Pancreatic stellate cells, PSC) als Quelle der sogenannten Cancer-associated fibroblasts (CAF) dienen. Diese werden bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Pankreaskarzinogenese rekrutiert, beeinflussen Invasivität und Metastasierung und agieren sowohl über direkten Zellkontakt als auch parakrin mit den Tumorzellen. Ziel dieser Arbeit war daher die Beschreibung der parakrinen Kommunikation zwischen den PSC und Tumorzellen und die Rolle bekannter Signalwege zu frühen Zeitpunkten der Pankreaskarzinogenese mithilfe von PSC-Genexpressionsprofilanalysen. Hierfür wurden drei murine Zell-Zell-kontaktlose in vitro Ko-Kulturmodelle (Standard-, 3D- und Inverse-Ko-Kultur) mit unterschiedlich fortgeschrittenen PDA-Tumorzellarten etabliert und zu 24 h und 72 h RNA extrahiert und sequenziert. In der Standard-Ko-Kultur wurden PSC mithilfe eines Zellkultureinsatzes getrennt von Tumorzellen kultiviert. Ein neuartiges Magnetic-Levitation-3D-Ko-Kultur-Modell mit inaktiven PSC wurde etabliert. In der Inversen-Ko-Kultur erfolgte die Kultivierung der Zellen getrennt auf der Ober- und Unterseite der Membran des Einsatzes. Die Änderung der Genexpressionsprofile ist schon früh, bereits ab 24 h in PSC nachweisbar und intensiviert sich zudem im zeitlichen Verlauf. Insgesamt werden proliferationsfördernde Signalwege und Zytokin-Zytokin-Interaktionen in den Ko-Kulturen signifikant verstärkt exprimiert. Gene diverser relevanter Signalwege, so auch beispielsweise des PI3K-AKT-Signalwegs und des TGF β -Signalwegs werden signifikant stärker in behandelten PSC exprimiert. Die Änderung des Genexpressionsprofils ist in Inversen-Ko-Kultur-Modellen am stärksten ausgeprägt. Auch eine Zuordnung der PSC zu definierten CAF-Subgruppen ist hier teilweise möglich. In den 3D-Modellen kann sowohl eine Inaktivierung der PSC als auch ein Einfluss der Tumorzellen auf den Zytokin-Stoffwechsel nachgewiesen werden, wobei weitere Experimente notwendig sind, um das Verhalten der PSC in einem multizellulären 3D-Sphäroid besser zu verstehen. Je nach Modell besteht eine deutliche Heterogenität in den RNA-Expressionsprofilen von PSC und eine unterschiedliche Empfänglichkeit der PSC hinsichtlich der Einflüsse von KPC-Tumorzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die vielfältigen Reaktionen von PSC in parakriner Ko-Kultur je nach eingesetzter Kulturmethode und Tumorzellart und beleuchten einen Teil des komplexen Wechselspiels von PSC mit Tumorzellen.

Zourelidis, Anais: Transkriptomanalysen Pankreatischer Stellatum Zellen in parakrinen 2D- und 3D-Ko-Kulturen mit Pankreaskarzinomzelllinien, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 91 Seiten, 2023

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Klassifikation der Pankreastumore	1
1.1.2 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms	1
1.1.3 Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms	1
1.1.4 Pathogenese des Pankreaskarzinoms	2
1.2 Pankreatische Stellatum Zellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten	3
1.2.1 Physiologische Funktion der Pankreatischen Stellatum Zellen	3
1.2.2 Rolle des Bindegewebes im Pankreaskarzinom	4
1.2.3 Subpopulationen der Tumor-assoziierten Fibroblasten	5
1.3 Mausmodelle zur Rekapitulation des humanen Pankreaskarzinoms	5
1.3.1 Genetisch Modifizierte Mausmodelle	5
1.3.2 KRAS ^{G12D/+} -Mausmodell	6
1.3.3 KRAS ^{G12D/+} -TRP53 ^{R172 h/+} -Mausmodell	6
1.4 Next Generation Sequencing und RNA-Sequenzierung	7
2. Zielstellung	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Material	9
3.2 Methoden	14
3.2.1 Zellkultur	14
3.2.2 Methodik der PSC-Isolation	15
3.2.3 PSC 3D-Kultur und Levitation	17
3.2.4 Etablierung verschiedener Ko-Kultur-Modelle	18
3.2.5 Vorversuch zur Zeitpunktauswahl der RNA-Extraktion	22
3.2.6 mRNA-Extraktion und Vermessung	23
3.2.7 RNA-Sequenzierung und Bioinformatische Auswertung	23
3.2.8 cDNA-Herstellung	26
3.2.9 Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction	26
3.2.10 Primerdesign	28
3.2.11 Aufbereitung und Fixierung der Zellen für immunzytochemische Färbungen	28

3.2.12	Immunzytochemie	29
3.2.13	Oil-Red O Färbung	30
3.2.14	Fluoreszenz-Immunzytochemie	31
3.2.15	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	31
3.2.16	Statistische Methoden	32
4.	Ergebnisse	33
4.1	Auswahl der zu untersuchenden Zeitpunkte für die Ko-Kultur-Modelle	33
4.2	Reinheit und zellspezifische Charakteristika der PSC-Kulturen	34
4.2.1	Morphologie der PSC im Verlauf der Zeit nach Isolation	34
4.2.2	Färbungen von PSC auf Zellkultureinsatz-Membran	35
4.2.3	Immunzytochemische Färbungen von 2D-PSC	36
4.3	Immunzytochemische Färbungen der 3D-PSC	37
4.4	Immunzytochemische Färbungen KC-, KC921- und KPC-Zellen	39
4.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Inversen-Ko-Kultur	40
4.6	RNA-Sequenzierung	42
4.6.1	Beurteilung der RNA-Ausbeute	42
4.6.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Daten und des Alignments	43
4.6.3	Korrelation der Proben untereinander	43
4.6.4	Quantitative Expression von epithelialen und Fibroblasten-Markern	45
4.6.5	Überblick der differentiellen Genexpressionsanalyse aller Modelle	45
4.6.6	Analysen der Standard-Ko-Kulturen	46
4.6.7	Entwicklung der PSC in 3D-Kultur im zeitlichen Verlauf	48
4.6.8	Unterschiede der 2D- und magnetischen 3D-Kultivierung	49
4.6.9	Einflüsse der KPC-Tumorzellen auf 3D-PSC	52
4.6.10	Analysen der Inversen-Ko-Kultur-Modelle	54
4.6.11	Globale Analyse der KPC-Ko-Kulturen	59
4.6.12	Vergleich der Standard- und Inversen-KPC-Ko-Kulturen	61
4.6.13	Subgruppen-Analysen der PSC der Ko-Kultur-Modelle	62
5.	Diskussion	64
5.1	Auswirkungen der Tumorzellen auf PSC	64
5.1.1	Proliferations- und migrationsfördernde Einflüsse	64
5.1.2	Beeinflussung des EZM-Stoffwechsels	64
5.1.3	Zytokin-Stoffwechsel und parakrine Kommunikation	66
5.1.4	Tumor-assoziierte Signalwege im PDA und in PSC	68

5.1.5	Zuordnung der PSC zu CAF-Subgruppen	70
5.2	Einfluss der Ko-Kultur-Modelle auf das Verhalten der PSC	71
5.2.1	Ko-Kultur-Modelle: Standard-, 3D- und Inverse-Ko-Kultur	71
5.2.2	Verhalten von PSC in multizellulären Sphäroiden	72
5.2.3	Einfluss der Tumorzellen auf PSC in 3D-Kultur	73
5.2.4	Inaktivität von PSC in magnetischer 3D-Kultur	74
5.3	Ausblick	75
6.	Zusammenfassung	76
7.	Literatur	77
8.	Thesen	85
9.	Anlagen	86

Anhang:

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	Alpha smooth muscle actin
ACTA2	Actin alpha 2
ADM	azinär-duktale Metaplasie
apCAF	Antigen-presenting CAF
BSA	Bovines Serumalbumin
CAF	Cancer-associated fibroblast
cDNA	complementary DNA
CK19	Cytokeratin 19
csCAF	Complement-secreting CAF
CTGF	Connective tissue growth factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAP	Fibroblast activation protein alpha
FBS	Fetal Bovine Serum
FPKM	Fragments per kilo base per million mapped reads
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GEMM	Genetisch Modifiziertes Mausmodell
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GO-Analyse	Gene Ontology Term Enrichment-Analyse
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
iCAF	Inflammatory CAF
IGFBP4	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 4
IL11	Interleukin 11
IL6	Interleukin 6
KC-Zellen	murine duktale Pankreaszellen mit KRAS ^{G12D/+} ; p48-Cre Mutation
KC921-Zellen	murine Tumorzelllinie mit KRAS ^{G12D/+} ; p48-Cre Mutation
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KPC-Zellen	murine Tumorzelllinie mit KRAS ^{G12D/+} ; TRP53 ^{R172 h/+} ; p48-Cre Mutation
LIF	Leukämiehemmender Faktor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
myCAF	Myofibroblastic CAF

NaCl	Natriumchlorid
n. s.	nicht signifikant
OT	Objektträger
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Pankreatisches duktales Adenokarzinom
PSC	Pancreatic stellate cell
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonucleic Acid
RNASeq	RNA-Sequenzierung
RT	Raumtemperatur
TGF β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Vcan	Versican

Auf eine Aufführung aller Genabkürzungen wird an dieser Stelle verzichtet. Diese können beispielsweise in der GeneCards[®] database eingesehen werden [1].

1. Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

Um einen Überblick über die komplexe Erkrankung „Pankreaskarzinom“ zu erhalten, werden im Folgenden die verschiedenen Arten von Pankreaskarzinomen, die epidemiologische Relevanz, Diagnostik, Therapiemöglichkeiten und die Pathogenese der Erkrankung dargestellt.

1.1.1 Klassifikation der Pankreastumore

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDA) ist mit über 90 % die am häufigsten vorkommende maligne Raumforderung im Pankreas. Weitere bösartige Neoplasien wie endokrine Tumore und Azinuszellkarzinome sind mit einer Häufigkeit von je 1-2 % Raritäten [2; 3]. So wird oft, wie auch in dieser Arbeit, nur die Begrifflichkeit „Pankreaskarzinom“ verwendet, gemeint ist hier das PDA.

1.1.2 Epidemiologie des Pankreaskarzinoms

Das PDA zeichnet sich durch seine Aggressivität und hohe Letalität aus. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren liegt die 5-Jahre-Überlebensrate weltweit unter 10 %. Aufgrund mangelnder Früherkennungsmethoden wird es in über der Hälfte aller Fälle erst in einem fortgeschrittenen, metastasierten Stadium diagnostiziert. Dies ist vor allem prognostisch entscheidend: während die 5-Jahre-Überlebensrate in einem lokalisierten Stadium bis zu 30 % betragen kann, ist sie mit etwa 3 % in metastasierten Stadien sehr gering. Auch wenn bekannte Risikofaktoren, wie beispielsweise das Rauchen, Übergewicht oder hohes Alter existieren, ist immer noch unklar, welche Mechanismen genau zu der Entstehung des PDA führen [4]. Durch den demographischen Wandel gewinnt das PDA zusätzlich an Bedeutung. Schätzungen der International Agency for Research on Cancer besagen, dass die weltweite Mortalität des PDA in den nächsten 10 Jahren bis zum Jahr 2030 um das 1,3-fache [5] und in 20 Jahren um das 1,7-fache [6] gestiegen sein wird.

1.1.3 Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms

Das PDA verursacht in frühen Stadien wenige, oft unspezifische klinische Symptome. Hierzu können unter anderem neu aufgetretene Oberbauch- oder Rückenschmerzen, ein schmerzloser Ikterus, in späten Stadien auch Kachexie oder Aszites gehören. Wie oben bereits erwähnt, ist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oft schon weit fortgeschritten. Da derzeit allerdings keine geeignete Früherkennungsmethode existiert, wird aufgrund der geringen Inzidenz in nicht-selektierten Bevölkerungsgruppen kein Screening für das PDA bei asymptomatischen Erwachsenen empfohlen. Auch die Therapie des PDA ist begrenzt: Die

Resektion, als einzig potenziell kurativer Therapieansatz, kann nur bei weniger als 20 % aller Patienten zur Anwendung kommen [7]. Eine Gemcitabin- oder Fluorouracil-basierte Chemotherapie, seltener Tyrosinkinaseinhibitoren und Strahlentherapie, können teilweise begleitend in der kurativen oder palliativen Therapie eingesetzt werden, vermögen aber in Summe nicht drastisch die Überlebensrate zu erhöhen [8]. Um Strategien für eine frühzeitige Diagnose und wirksame Therapie des PDA entwickeln zu können, ist daher ein detailliertes Verständnis der molekularen Pathogenese, die zu Initiierung der Erkrankung führt, essenziell.

1.1.4 Pathogenese des Pankreaskarzinoms

Pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) spielen als Vorläuferläsionen eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese des PDA. Es wurde postuliert, dass PanINs aus Azinuszellen über eine sogenannte azinär-duktaile Metaplasie (ADM) entstehen. Durch die Akkumulation genetischer Aberrationen wird ein fortlaufender Prozess von Low Grade über High Grade PanIN-Läsionen bis hin zum invasiven Karzinom durchlaufen [9]. Das PDA als molekular heterogene Erkrankung kann diverse Mutationen beherbergen, wie die in über 90 % aller PDAs vorkommende, aktivierende Mutation im Protoonkogen KRAS, oder die in bis zu 75 % aller PDAs vorhandene, inaktivierende Mutation oder Verlust des Tumorsuppressorgens TRP53 [10]. Für diese Arbeit sind die beiden oben genannten Mutationen als Schlüsselemente der pankreatischen Karzinogenese von wesentlicher Bedeutung. Besonders entscheidend für die Initiierung der Karzinogenese ist die onkogene KRAS-Mutation. Tierversuche mit genetisch modifizierten Mausmodellen (GEMM) ergaben, dass nach Expression von onkogenem KRAS während der murinen Embryogenese in bis zu einem Drittel der adulten Tiere invasive Tumore nachgewiesen werden konnten. Adulte Azinuszellen hingegen waren der Mutation gegenüber größtenteils refraktär [11]. Demnach reicht die alleinige Mutation von KRAS nicht zur Initiierung des PDA aus; weitere Faktoren wie zusätzliche genetische Mutationen, epigenetische Faktoren, sowie das umgebende Mikromilieu sind von Bedeutung. Die vor allem in späteren Stadien der Karzinogenese aufzufindende Mutation im Tumorsuppressorgen TRP53 sorgt in Kombination mit einer KRAS-Mutation für ein deutlich kürzeres Überleben von GEMM [11]. Zusätzlich besteht unter entzündlichen Bedingungen eine erhöhte Empfänglichkeit für die Bildung präneoplastischer Läsionen. Eine Pankreatitis kann die KRAS-medierte PanIN- und PDA-Entstehung erheblich beschleunigen [12]. Eine essenzielle Rolle im Mikromilieu eines Tumors spielen auch die ihn umgebenden Zellen, allen voran Bindegewebszellen, deren Bedeutung im PDA nachstehend erläutert wird.

1.2 Pankreatische Stellatum Zellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten

Im Folgenden sollen die physiologischen Funktionen der Pankreatischen Stellatum Zellen (Pancreatic stellate cells, PSC) beleuchtet werden. Anschließend wird auf die pathophysiologischen Zusammenhänge des Wechselspiels der Fibroblasten mit den Tumorzellen im PDA eingegangen und ein Überblick über die verschiedenen im Tumorbindegewebe vorkommenden Untergruppen der Fibroblasten gegeben.

1.2.1 Physiologische Funktion der Pankreatischen Stellatum Zellen

Obwohl der Ursprung der PSC bis jetzt noch nicht abschließend geklärt ist, wird angenommen, dass sie ähnlich den Sternzellen der Leber, zu denen sie viele Parallelen aufweisen, mesodermaler Herkunft sein könnten. Im ruhenden Zustand speichern PSC Fett und Vitamin A in charakteristischen perinuklären Lipid Droplets. Sie exprimieren Marker wie Glial fibrillary acidic protein (GFAP) oder Vimentin. Im aktivierten Zustand, ausgelöst beispielsweise durch eine Gewebsschädigung, verschwinden die Droplets zunehmend und die namensgebenden langgezogenen Zytoplasma-Ausläufer entstehen. Dieser aktivierte, myofibroblastische Phänotyp exprimiert Alpha smooth muscle actin (α -SMA) als typischen Marker [13]. Obwohl PSC nur unter 5 % der Gesamtheit aller Pankreaszellen ausmachen [14], werden Ihnen vielfältige Funktionen, die entscheidend zur Homöostase des Pankreas beitragen, zugesprochen. So spielen PSC eine wichtige Rolle bei der Instandhaltung der Basalmembran und somit auch der Aufrechterhaltung der Gewebsarchitektur [15]. Durch die Sezernierung von sowohl Matrix-Metalloproteinasen (MMP), als auch deren Inhibitoren, Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMP), halten PSC das Gleichgewicht im Prozess der Erneuerung der extrazellulären Matrix (EZM) aufrecht. Im Falle einer Verletzung werden PSC wie oben beschrieben in einen aktiven Zustand versetzt und produzieren vermehrt EZM, um so zur Wiederinstandsetzung des Gewebes beizutragen. Neben ihrer Bindegewebszell-typischen Funktionen wird den PSC eine Beeinflussung der endokrinen und exokrinen Zellen des Pankreas zugesprochen. Außerdem exprimieren PSC, wie auch Immunzellen, Toll-like Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und können mithilfe dieser sogenannte pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. Auch eine Funktion der PSC als Phagozyten wird beobachtet. Bemerkenswert ist hierbei die vermutlich antiinflammatorische Wirkung, da die PSC nach Phagozytose nekrotischer Azinuszellen die Apoptose einleiten. Bei akuter Pankreatitis fördern PSC den Genesungsprozess durch Unterstützung der azinären Regeneration. In vitro kann eine Autotransformation der PSC von einem ruhenden hin zu einem aktiven Zustand beobachtet werden [13]. Allerdings ist auch in Kultur der Wechsel zurück in eine ruhende Form möglich [16]. Dabei kann auf Systeme der 3D-Kultur wie zum Beispiel Matrigel zurückgegriffen werden [17], um eine erneute Inaktivierung

der PSC zu erreichen. Das Ziel eines derartigen Versuchsaufbaus ist, besser zwischen einer kulturbedingten, artifiziellen und einer pathophysiologischen, wie etwa einer inflammatorisch getriggerten Aktivierung, differenzieren zu können.

1.2.2 Rolle des Bindegewebes im Pankreaskarzinom

Charakteristisch für das PDA ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion. So besteht bis zu 90 % des tatsächlichen Tumolvolumens aus speziellem Tumorbindegewebe [17]. PSC durchlaufen im Falle eines Gewebeschadens eine Transdifferenzierung zu Myofibroblastenartigen Zellen und können als Quelle der sogenannten Cancer-associated fibroblasts (CAFs) dienen [18]. Diese werden schon früh, zu Beginn der Tumorentstehung, rekrutiert und agieren sowohl über direkten Zellkontakt als auch parakrin mit den Tumorzellen und können so Invasivität, Metastasierung und Therapieansprechen des PDA modulieren. Einflüsse der CAFs auf Invasivität und Metastasierung wurden in in-vitro-Experimenten nachgewiesen. In Migrationsassays konnte ein erleichtertes Vordringen muriner Tumorzellen in von bestimmten CAF-erzeugten Matrices und sogar eine von CAF-medierte Tumorzellinvasion beobachtet werden [19]. Zudem können CAF die Wirksamkeit von Medikamenten beeinflussen. Die Effektivität von Chemotherapeutika wird maßgeblich von ihrer korrekten Konzentration am Zielort beeinflusst. Das Bindegewebe im PDA kann hier sowohl eine mechanische als auch eine molekulare Barriere für das Ansprechen des Tumors auf die Therapie bilden. Aktivierte CAF erzeugen ein dichtes, desmoplastisches Stroma, das die Konvektion und Diffusion innerhalb des Tumorbindegewebes schwächt. Hierbei bezeichnet Konvektion den Transport der Moleküle durch eine Druck-getriebene Flüssigkeitsbewegung und Diffusion den Austausch entlang eines Konzentrationsgradienten. Das Stroma des PDA ist hypoperfundiert, ein Großteil der wenigen vorhandenen Blutgefäße ist durch den hohen interstitiellen Druck kollabiert. Das erschwert zusätzlich den Transport der Medikamente zu ihrem vorgesehenen Wirkungsort [20]. In Tierversuchen wurde ein durch Signale der CAF vermindertes Ansprechen der Tumorzellen auf Chemotherapeutika registriert [19]. CAF haben nicht nur eine Tumorwachstums-fördernde Rolle, sondern können auch eine protektive Wirkung aufweisen. Das zeigten Experimente, die mit dem Ziel das Tumorstroma über den knock-out bestimmter Signalwege in GEMM zu minimieren, zu verstärkter Vaskularisation des Tumors und somit zu einer stärkeren Aggressivität führten [21]. Des Weiteren führte eine komplette Depletion von α -SMA exprimierenden CAF in Mäusen zu einem verringerten Überleben der Tiere [22]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass es unterschiedliche Subgruppen von CAF geben muss, die spezifische Aufgaben erfüllen und auf diverse Arten sowohl mit den Tumorzellen als auch untereinander wechselwirken können.

1.2.3 Subpopulationen der Tumor-assoziierten Fibroblasten

Es werden verschiedene Subpopulationen von CAF beschrieben, die unter anderem durch eine unterschiedlich starke Expression von Markern α -SMA und Fibroblast-activation protein (FAP) charakterisiert sind. So wird zwischen Myofibroblastic CAFs (myCAF), die eine hohe α -SMA und FAP Expression aufweisen, und Inflammatory CAFs (iCAF) mit geringer α -SMA Expression, die durch eine starke Zytokinsekretion gekennzeichnet sind, unterschieden. Dynamische Veränderungen von Zellen mit Markern einer CAF-Untergruppe hin zu einer anderen werden in vitro beschrieben. Es wird postuliert, dass eine Transformation hin zu iCAF vor allem durch ein parakrines Signaling der Tumorzellen ausgelöst wird und diese über das ganze Tumorgewebe hinweg verteilt sind, wohingegen myCAF in unmittelbarer Nähe zu Tumorzellen auffindbar sind [17]. Ebenfalls werden sogenannte Antigen-presenting CAFs (apCAF) beschrieben, die über eine Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen eine potenziell immunmodulatorische Wirkung aufweisen [23]. Complement-secreting CAF (csCAF) kommen anscheinend nur in der frühen Karzinogenese vor, zeichnen sich über eine Expression von Genen des Komplement-Systems aus und sind in direkter Nachbarschaft zu malignen duktalem Zellen aufzufinden. Bisher ist jedoch nicht bekannt, zu welchen Zeitpunkten der Karzinogenese wie viele und welche dieser Subtypen welche Aufgaben übernehmen. Zudem ist unklar, ob es weitere relevante Subtypen gibt, die etwa nur in der Karzinogenese wichtig sind, später aber keine Bedeutung mehr haben [24].

1.3 Mausmodelle zur Rekapitulation des humanen Pankreaskarzinoms

GEMM werden seit einigen Jahren zur Erforschung des PDAs eingesetzt. Im Folgenden sollen die Grundzüge von GEMM sowie das $KRAS^{G12D/+}$ -Mausmodell und das $KRAS^{G12D/+}$ - $TRP53^{R172 h/+}$ -Mausmodell vorgestellt werden. Beide Modelle werden häufig zur Rekapitulation der humanen Erkrankung verwendet.

1.3.1 Genetisch Modifizierte Mausmodelle

Durch die Option der genetischen Modifikation und Erzeugung von Organismen mit bestimmten Mutationen können Tumormodelle mit Mäusen kreiert werden, die eine gute Annäherung an die humane Tumorerkrankung darstellen. GEMM stellen somit eine wichtige Quelle zur Erforschung der Pathogenese von Tumoren und auch des PDAs dar. Die Expression von gewünschten Mutationen kann durch die Verwendung von Cre-Rekombinase Systemen orts- und zeitspezifisch erreicht werden. Über die Adressierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie p48 oder PDX-1, die eine entscheidende Rolle in der frühen Organogenese des Pankreas spielen, kann in transgenen Mäusen eine Organ-spezifische Expression der jeweiligen Mutation erzielt werden [25].

In dieser Arbeit finden zwei unterschiedliche GEMM Verwendung: ein KC-Mausmodell mit einer KRAS^{G12D}-Mutation (p48-Cre-KRAS^{G12D/+}-Mausmodell) sowie ein KPC-Modell mit einer zusätzlichen TRP53^{R271H}-Mutation (p48-Cre-KRAS^{G12D/+}-TRP53^{R172 h/+}).

1.3.2 KRAS^{G12D/+}-Mausmodell

Das KC-Mausmodell wurde erstmalig von Hingorani et al. etabliert [26]. Bei Vorliegen einer KRAS^{G12D}-Mutation führt eine G-A Transition in Codon 12 des KRAS Gens zu einem Tausch der Aminosäure Glycin durch Aspartat im exprimierten K-ras Protein, was eine Aktivierung wesentlicher Bestandteile des Downstream-KRAS-Effektor-Signalwegs zur Folge hat. Um das Mausmodell zu erzeugen, wird zunächst durch einen Knock-in eine loxP-STOP-loxP-KRAS^{G12D}-Kassette in den endogenen KRAS-Lokus eingefügt. Die Expression des onkogenen KRAS wird erst nach der Cre-medierten Entfernung der STOP-Sequenzen möglich. Durch die Kreuzung von LSL-KRAS^{G12D}-Mäusen mit Tieren, die einen Cre-Knock-in am Locus des pankreasspezifischen Promotors P48 aufweisen, wird eine ortsspezifische Expression der Mutation möglich. Das durchschnittliche Überleben von Mäusen des Genotyps p48^{+/-Cre}-LSL-KRAS^{G12D} beträgt 16 Monate. Es treten gering- bis hochgradige PanINs auf, die mit steigendem Alter der Mäuse auch an Aggressivität zunehmen. Bei älteren Mäusen fällt ein Ersatz des Parenchyms durch desmoplastisches Bindegewebe und eine Infiltration von Entzündungszellen auf. Relativ selten treten nach einer längeren Latenzzeit von circa 8 Monaten auch invasive und metastasierende PDAs auf. Hierbei weisen die Orte der Metastasierung bei den Mausmodellen eine starke Übereinstimmung mit denen der humanen Erkrankung auf [25]. Durch seine Parallelen zur Klinik des humanen PDA und dem Vorkommen einer Bandbreite an Vorläuferläsionen ist das KC-Mausmodell sehr gut geeignet, um vor allem frühe Stadien der Erkrankung zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden sowohl Zellen einer KC-Tumorzelllinie (KC921), als auch duktale primäre Pankreaszellen aus 8 Wochen alten KC-Mausmodellen verwendet. In den Pankreata adulter Mäuse kann über eine Caerulein-Behandlung eine Entzündung induziert werden, die das Wachstum von PanINs begünstigt [12]. Auch die in dieser Arbeit verwendeten duktalem Primärzellen stammen aus Mäusen, die eine 2-tägige Caerulein-Behandlung durchliefen.

1.3.3 KRAS^{G12D/+}-TRP53^{R172 h/+}-Mausmodell

Zusätzlich zu der KRAS^{G12D}-Mutation weist das anschließend von Hingorani et al. etablierte KPC-Mausmodell eine TRP53^{R271h}-Mutation auf. Diese Punktmutation ist das orthologe Korrelat der bei humanen PDAs am häufigsten vorkommenden Mutation im Tumorsuppressorgen TP53 [11]. Das TRP53 Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der im Falle zellulären Stresses Gene des Zellzyklus und der Apoptose reguliert und so durch einen Arrest des Zellzyklus eine Entartung der Zelle verhindern kann. Punktmutationen im TRP53 Gen können die globale Struktur des

zugehörigen Proteins p53 oder die Bindungsstelle der DNA-bindenden Domäne stören und so durch Akkumulation des Proteins in der Zelle zu einer mangelnden Funktion führen [27]. Viele der Eigenschaften des humanen PDAs werden im KPC-Mausmodell rekapituliert. Nach 2-3 Monaten bilden sich bei KPC-Mäusen invasive PDAs aus. Zudem entwickeln die Mäuse eine Kachexie und eine Metastasierung in Leber, Lunge und Peritoneum. Das durchschnittliche Überleben der KPC-Mäuse ist mit 5 Monaten im Vergleich zu dem der KC-Mäuse stark verkürzt [11]. Eine der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien stammt ebenfalls aus dem KPC-Mausmodell.

1.4 Next Generation Sequencing und RNA-Sequenzierung

Sequenzierungsmethoden ermöglichen eine Momentaufnahme aller transkribierten Gene einer Zelle zu einem beliebigen Zeitpunkt. Dadurch können die molekularen Netzwerke, die hinter Erkrankungen stehen, besser erforscht und verstanden werden. Es existieren mehrere Ansätze, die eine Erschließung des Transkriptoms mithilfe von cDNA-Bibliotheken zum Ziel haben. Microarrays, die mit einem Hybridisierungs-Prinzip arbeiten, sind kostengünstig, allerdings auch begrenzt durch bereits vorhandene Kenntnisse bezüglich des zu untersuchenden Genoms. Weitere Methoden haben die Sequenzierung der cDNA zum Ziel. Ursprünglich wurden Niedrigdurchsatz-Methoden wie die Sanger-Sequenzierung zur Detektion der Basenabfolge angewendet. Bei nachfolgenden Hochdurchsatz-Verfahren wie der seriellen Analyse der Genexpression (SAGE) werden Isoformen nicht detektiert und nur ein Teil der Transkripte ermittelt. Die RNA-Sequenzierung (RNASeq) nutzt als Next-Generation-Sequencing-Methode Deep-Sequencing-Technologien und ist zunehmend populärer geworden. Vorteile der RNASeq sind die mögliche Detektion bisher unbekannter Sequenzen, posttranskriptioneller Änderungen und genomischer Polymorphismen. Ergebnisse zeigen zudem eine hohe Reproduzierbarkeit. Bei der Quantifizierung der Genexpressions-Level ist der RNASeq im Vergleich zu anderen Methoden keine Grenze gesetzt. Am häufigsten wird RNASeq jedoch, wie auch in dieser Arbeit, für die Ermittlung der differentiellen Genexpression zwischen zwei Konditionen verwendet [28].

2. Zielstellung

Um Fortschritte in Prävention und Screening des PDA zu erzielen, ist besonders ein Verständnis der frühen Prozesse bei der Entstehung des PDA von Interesse. Über die Zell-Zell-kontaktlose Ko-Kultur PSC murinen Wildtyps mit verschiedenen murinen Pankreastumorzellen sollen die Auswirkungen der Tumorzellen auf PSC genauer untersucht werden. Im Fokus steht die frühe parakrine Aktivierung von PSC durch lösliche Faktoren und gegebenenfalls ihre Transformation hin zu CAF. Die verwendeten Tumorzelllinien, KC- und KPC-Zellen, weisen die häufigsten Mutationen des humanen PDA auf und sollen hier annähernd ein frühes und ein fortgeschritteneres Stadiums der Erkrankung simulieren. Mithilfe einer anschließenden Genexpressionsanalyse der PSC zu zwei Zeitpunkten (24 h und 72 h) sollen Signalwege beleuchtet werden, die in der Aktivierung der PSC hin zu CAF und bei ablaufenden Prozessen des Tumorbindegewebes eine Rolle spielen könnten. Außerdem soll ermittelt werden, ob die PSC beispielsweise aufgrund der Expression typischer Marker einer bereits definierten Subgruppe zugeordnet werden können. In-vitro-Versuche können immer nur einen Teil des komplexen Wechselspiels der Verhältnisse in vivo abbilden. Deshalb sollen verschiedene Ko-Kultur-Modelle etabliert werden, über die eine möglichst gute Annäherung an in-vivo-Verhältnisse erreicht werden soll. In einem Standard-Ko-Kultur-Modell mit Zellkultureinsätzen als einfachste Variante stehen PSC und Tumorzellen über das Medium im Austausch. In einem Inversen-Ko-Kultur-Modell mit Wachstum beider Zellen auf je einer Seite der Membran des Zellkultureinsatzes soll das Verhalten von PSC bei Tumorzellwachstum in unmittelbarer Nachbarschaft jedoch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt beobachtet werden. Abschließend soll ein Ko-Kultur-Modell mit magnetisch-levitierten PSC in 3D-Kultur etabliert werden, um die ruhende, inaktive Form der PSC abzubilden. Da die 3D-Kultur eine neuartige Methodik der PSC-Inaktivierung darstellt, soll die Inaktivität der PSC zunächst überprüft werden und die Unterschiede zur 2D-Kultur und anderen Zellkultur-Methoden der Inaktivierung beleuchtet werden. Anschließend soll auch der Einfluss von KPC-Tumorzellen auf 3D-PSC betrachtet werden. Die Einflüsse der verschiedenen Tumorzellen in den jeweiligen gleichartigen Modellen (Standard- und Inverse-Ko-Kultur) sollen ermittelt werden. Aber auch die Wirkung der gleichen Tumorzellart (KPC-Zellen) auf PSC in drei unterschiedlichen Modellen (Standard-, Inverse- und 3D-Ko-Kultur) soll verglichen werden. Insbesondere soll bei den verschiedenen Vergleichen auch die zeitliche Entwicklung des Transkriptoms, von 24 h zu 72 h, miteinbezogen werden. Darüber hinaus sollen hierbei auch die verschiedenen Einflüsse der Ko-Kultur-Modelle auf die PSC untersucht und von den Einwirkungen der Tumorzellen abgegrenzt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
2-Propanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin aus Rinderserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aquatex® Eindeckmittel	Merck, Darmstadt
Bleicitrat	Leica, Wetzlar
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cedukol®	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Epoxidharz	Science Services, München
Essigsäure	ROTH, Karlsruhe
Ethanol 100 %	Fisher Chemical, Waltham, USA
FLEX Antibody Diluent, K8006	Agilent, Santa Clara, USA
Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, USA
Formaldehydlösung 37 %	ROTH, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hoechst Färbelösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	SERVA, Heidelberg
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumcacodylatpuffer	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Nicotinamide	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nycodenz	Alere Technologies AS, Oslo, Norwegen
Oil-Red O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Osmiumtetroxid	ROTH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (1x Dulbecco's)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Potassiumchlorid	Merck, Darmstadt
Potassiumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
Sodiumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Sodiumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Staufen im Breisgau
Triton X-100	Ferak, Berlin
Uranylacetat	Chemapol, Prag, Tschechien
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Tabelle 2: Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, K3468	Agilent, Santa Clara, USA
Dako LSAB [®] 2 System-HRP, K0609	Agilent, Santa Clara, USA
Direct-zol RNA Microprep Kits, R2062	ZYMO Research Europe GmbH, Freiburg
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 4368814	Thermo Scientific [™] , Dreieich

Tabelle 3: Medien, Lösungen und Enzyme der Zellkultur

Bezeichnung	Bezugsquelle
Advanced D-MEM/F-12, 12634010	Gibco [™] , Paisley, UK
Amphotericin B, A2942	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bambanker Einfriermedium, BB01	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren
Collagenase P	Roche, Mannheim
DMEM/F-12, HEPES, 11330032	Gibco [™] , Paisley, UK
DMEM-high glucose, D5796	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM-low glucose, D5546	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Machery-Nagel, Düren
FBS Superior, S0615	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HBSS, 14170088	Gibco [™] , Paisley, UK
Kollagen I, Rat Tail, 354236	Corning [™] , Fisher Scientific, Schwerte
NanoShuttle [™] -Nanopartikel	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nutrient Mixture F-12 Ham, N6658	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PancreaCult [™] Organoid Growth Medium (Mouse)	STEMCELL [™] , Vancouver, Kanada
Penicillin-Streptomycin, 15140122	Gibco [™] , Paisley, UK
Pronase	Roche, Mannheim
StemPro [®] Accutase [®] , A11105-01	Gibco [™] , Paisley, UK
Trypsin-EDTA (0,05 %), 25300062	Gibco [™] , Paisley, UK

Tabelle 4: Zellen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Duktale Pankreaszellen aus transgenen Mäusen mit KRAS ^{G12D/+} , p48-Cre (KC)-Mutation, Alter: 8 Wochen, 2 Tage Caerulein-Behandlung	Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Labor Dr. Kong
KPC-Zellen, Pankreastumorzelllinie aus transgener Maus mit p48-Cre-KRAS ^{G12D/+} -TRP53 ^{R172h/+} (KPC)-Mutation, Genotypisierung der Maus erfolgt	Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Labor Dr. Kong
KC921, Pankreastumorzelllinie aus transgener Maus mit p48-Cre-KRAS ^{G12D/+} (KC)-Mutation, Alter: 58 Wochen, Genotypisierung der Maus erfolgt	Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, Labor Dr. Kong
Pankreatische Stellatum Zellen, Primärzellkulturen aus C57BL/6J Mäusen, Alter: 7-10 Wochen	Charles River, Sulzfeld (C57BL/6J Mäuse)
RAW 264.7 Zelllinie	ATCC, Manassas, USA

Tabelle 5: Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anti-Alpha-Smooth Muscle Actin Antikörper (17H19L35), Rabbit Monoclonal	Thermo Scientific™, Dreieich
Anti-FAP Antikörper (ab53066), Rabbit polyclonal	Abcam, Cambridge, UK
Anti-GFAP Antikörper (ab7260), Rabbit polyclonal	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Vimentin Antikörper, clone 2113 ZooMAb® Rabbit Monoclonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytokeratin 19 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (SA30-06)	Invitrogen, Thermo Scientific™, Dreieich
E-Cadherin (H-108) rabbit polyclonal antibody	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077), Goat polyclonal Secondary Antibody	Abcam, Cambridge, UK
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4	Agilent, Santa Clara, USA

Tabelle 6: Primer und qPCR

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Bezugsquelle
5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus		Solis BioDyne, Tartu, Estland
ACTA2 Maus 128bp as	GCTGGTATAGGTGGTTTCGTG GA	metabion international AG, Planegg
ACTA2 Maus 128bp s	GCTACGAACTGCCTGACGG	
B2M Maus 150bp as	CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT	
B2M Maus 150bp s	ACGTAACACAGTTCACCCG	
IGFBP4 113bp as	AGGTGTCCCCACGATCTTCA	
IGFBP4 113bp s	GCGAACATCCCAACAACAGC	
IL11 Maus 102bp as	CAGGAGGGATCGGGTTAGGA	
IL11 Maus 102bp s	GATAGAGTCGTTGCCCTGG	
IL6 Maus 74bp as	AGTCTCCTCTCCGGACTTGT	
IL6 Maus 74bp s	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	
LIF Maus 89bp as	CAGGTGGCATTACAGGGGT	
LIF Maus 89bp s	GCAGGGATTGTGCCCTTACT	
RPL37A Maus 92bp as	AGAGGTGGTGTGTAGGTCCA	
RPL37A Maus 92bp s	CCAAGATGAAGAGACGAGCCG	
TGFβ Maus 94bp as	AGCCCTGTATCCGTCTCCT	
TGFβ Maus 94bp s	CTGCTGACCCCCACTGATAC	
TNFα Maus as	GAGGCCATTTGGGAATTCT	
TNFα Maus s	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
100 µm Cell Strainer	Corning™, Kaiserslautern
24-Well-Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well-Multiwellplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well-Multiwellplatte mit zellabweisender Oberfläche	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Collagen I, Coated Plate, 6-Well, A1142801	Gibco™, Paisley, UK
Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einwegskalpell	Servoprax GmbH, Wesel
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filter Top Suspensionskulturflasche, 25 cm ² , 75 cm ² , 125 cm ² , CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filter Top Zellkulturflasche, 25 cm ² , 75 cm ² , 125 cm ² , CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kupfer-Grids	Plano, Wetzlar
Millicell Hanging Cell culture Insert, PET 1 µm, 6-Well	Merck, Darmstadt
Objektträger	Süsse Labortechnik, Gudensberg
Parafilm® M	Pechiney Plastic Packaging, Ohio, USA
Petrischale, 94 x 16 mm, 145 x 20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, epT.I.P.S.	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen CELLSTAR®, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten, CELLSTAR®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritzen, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 µm	VWR International GmbH, Darmstadt
Sterican® Insulinkanüle, 26G x 1/2"	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml	Qiagen, Hilden
SuperFrost™ Mikroskop Objektträger	Thermo Scientific™, Dreieich
Thin Cert®™ Einsatz 6-Well, 0,4 µm, 1 µm, 3 µm Poren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Tabelle 8: Geräte und Software

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
24-Well Holding Drive	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well Holding Drive	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Well Levitating Drive	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Analysewaage ABS-N	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern
Bioanalyzer 2100	Agilent, Santa Clara, USA
Biometra T3 Thermocycler	Analytik Jena AG, Jena
Einfrierbox für Zellen, CellCamper®	NeoLab®, Heidelberg
Glas-Deckgläser für Haemacytometer	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt

GraphPad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, USA
Kryotom Microm HM 560 Cryostat	Thermo Scientific™, Dreieich
Magnetrührer Variomag Poly 15	HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
MagPen™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Nano Drop One	Thermo Scientific™, Dreieich
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
NovaSeq System	Illumina, San Diego, USA
NovoSmart Software	Novogene Co., Beijing, China
Pipetten Eppendorf Reference® 2	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus™	Hirschmann™, Eberstadt
Primer-BLAST Tool	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA
Rotor-Gene Q PCR Cyclor	Qiagen, Hilden
Rotor-Gene Q Software 2.3.5.	Qiagen, Hilden
Software AxioVision SE64 Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Software ImageSP	Unitary Enterprise "SYSPROG", Minsk, Belarus
Thermo Heraeus Sicherheitswerkbank Klasse II	HERAsafe®, Thermo Electron Corporation, Dreieich
Transmissionselektronenmikroskop EM 900	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Ultramikrotom UltracutS	Leica, Wetzlar
Variospeed SSCCD Kamera SM-1k-120	TRS Tröndle Restlichtverstärkersysteme, Moorenweis
Vortexer Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries SI™, New York, USA
Wasserbad, WNB7	Memmert GmbH, Schwabach
Zellinkubator, Heracell 150i	Thermo Scientific™, Dreieich
Zentifuge Heraeus™ Multifuge™ X3R	Thermo Scientific™, Dreieich
Zentrifuge Heraeus™ Primo™ R	Thermo Scientific™, Dreieich
Zentrifuge VWR Micro1207	VWR International bvba, Leuven, Belgien

Tabelle 9: Sonstige Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Pap Pen	Kisker Biotech, Steinfurt
Pinzette	Diverse
Kühlplatte 4 °C	Diverse

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Tabelle 10: Rezepte der in der Zellkultur verwendeten Medien

Bezeichnung	Substanz	Menge [%]
PSC-Medium	DMEM-low glucose	42
	Nutrient Mixture F-12 Ham	40
	FBS Superior, S0615	16
	Penicillin-Streptomycin	1
	Amphotericin B	1
KPC-Medium	DMEM-high glucose	89
	FBS Superior	10
	Penicillin-Streptomycin	1
RAW-Medium	DMEM/F-12, HEPES	89
	FBS Superior	10
	Penicillin-Streptomycin	1
DMEM-Advanced-Medium	Advanced D-MEM/F-12 Medium	89
	FBS Superior	10
	Penicillin-Streptomycin	1
OGM-Medium	PancreaCult™ OGM Mouse Basal Medium	95
	PancreaCult™ OGM Mouse Supplement	5

Kultivierung PSC: PSC wurden für immunhistochemische Färbungen und Vorversuche in PSC-Medium in 25 cm² großen Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 70-80 % Konfluenz mit Trypsin-EDTA (0,05 %) gesplittet. Einige Medienwechsel nach der Isolation wurde PSC-Medium ohne Amphotericin B verwendet. Für Ko-Kultur-Experimente wurden PSC in Passage 1 bis 2 verwendet und in DMEM-Advanced-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zentrifugation der Zellen fand mit 336g bei 23 °C für 10 min statt.

Kultivierung KPC-Zelllinie: KPC-Zellen wurden in KPC-Medium in 75 cm² großen Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 70-80 % Konfluenz mit Trypsin-EDTA (0,05 %) gesplittet. Für Experimente wurden aufgrund ihres immortalisierten Wachstumsverhaltens KPC auch in höheren Passagen von Passage 1 bis zu Passage 15 verwendet. Die Zentrifugation der Zellen fand mit 336g bei 23 °C für 10 min statt.

Kultivierung KC921-Zelllinie: KC921-Zellen wurden in DMEM-Advanced-Medium in 75 cm² großen Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 70-80 % Konfluenz mit Trypsin-EDTA (0,05 %) gesplittet. Für Experimente wurden aufgrund ihres immortalisierten Wachstumsverhaltens KC921 auch in höheren Passagen von Passage 1 bis zu Passage 15 verwendet. Die Zentrifugation der Zellen fand mit 336g bei 23 °C für 10 min statt.

Kultivierung RAW 264.7 Zelllinie: RAW 264.7 Zellen wurden in RAW-Medium in Suspensionskulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 70-80 % Konfluenz mit Trypsin-EDTA (0,05 %) gesplittet. Die Zentrifugation der Zellen fand mit 336g bei 23 °C für 10 min statt.

Kultivierung duktale KC-Zellen: Duktale KC-Zellen wurden in OGM-Medium auf Kollagen I beschichteten 6-Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei 80-90 % Konfluenz mit Accutase gesplittet. Die Zentrifugation der Zellen fand mit 300g bei 4 °C für 5 min statt.

3.2.2 Methodik der PSC-Isolation

Tabelle 11: Rezept GBSS ohne NaCl

<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
Calciumchlorid	0,1126 g
Magnesiumchlorid	0,105 g
Magnesiumsulfat	0,0171 g
Potassiumchlorid	0,185 g
Potassiumdihydrogenphosphat	0,015 g
Sodiumdihydrogenphosphat	0,0598 g
Sodiumbicarbonat	1,135 g
D-Glucose	0,5 g
Aqua dest	500 ml

Rezept GBSS ohne NaCl für 500 ml: Alle Substanzen werden einzeln auf einer Analysewaage abgewogen, in insgesamt 500 ml Aqua dest auf einem Magnetrührer mithilfe eines Rührfisches gelöst und steril filtriert (Tabelle 11).

Rezept GBSS mit NaCl für 500 ml: Zu 500 ml GBSS ohne NaCl werden 7 g NaCl zugegeben.

Tabelle 12: Rezepte der Lösungen A-C

<i>Lösung</i>	<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>
<i>A</i>	10 % Collagenase P	50 µl
	10 % Pronase	20 µl
	1 % DNase I	1 ml
	GBSS mit NaCl	10 ml
<i>B</i>	BSA	30 mg
	GBSS mit NaCl	10 ml
<i>C</i>	GBSS ohne NaCl	5 ml
	Nycodenz	1,435 g

Die Lösungen B und C wurden am Vortag der Isolation hergestellt, steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Die Lösung A wurde stets frisch zum Zeitpunkt der Isolation hergestellt (Tabelle 12).

Primärzellkulturen der PSC wurden mithilfe der Methodik der Dichtegradientenzentrifugation aus Pankreata 7 bis 10 Wochen alter C57BL/6J Mäuse gewonnen. Um etwaige Einflüsse des Geschlechts der Mäuse auszugleichen, wurde bei der Auswahl der Tiere auf eine symmetrische Geschlechterverteilung geachtet. Dabei wurden PSC aus 4 bis 10 Mäusen gepoolt. Die verwendete Methodik der Nycodenz-Dichtezentrifugation ähnelt bis auf einige Modifikationen im Wesentlichen der bereits von Apte et al. beschriebenen, etablierten Methodik der PSC-Isolation [14]. Die im Folgenden angegebenen Mengen der Lösungen reichen für die Pankreata aus zwei Mäusen. Zunächst wurden die Mäuse durch die schnelle und effektive Methode der manuellen zervikalen Dislokation getötet, um die Leidenszeit der Tiere zu minimieren und den Selbstverdau des Pankreas so gering wie möglich zu halten. Nach Eröffnung der Bauchhöhle und Aufsuchen des Pankreas wurde dieses unter semisterilen Bedingungen mit einer Präparierschere und Pinzette aus den Mäusen entfernt und in 30 ml HBSS in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gekühlt zur Zellkulturbank zur Weiterverarbeitung transportiert. Anschließend wurden die Pankreata in eine Petrischale transferiert und insgesamt 1 ml der Enzymlösung A mit 26G x 1/2" Insulinkanülen an mehreren Stellen in das Gewebe injiziert. Die Pankreata wurden in 9 ml Enzymlösung A für 7 min im Wasserbad bei 37 °C unter Schütteln verdaut. Nach Entnahme der Pankreata aus der Lösung wurden diese mit Skalpell und Pinzette sehr fein zerkleinert und zurück in die schon im vorherigen Schritt verwendete Enzymlösung A gegeben. Es erfolgte ein weiterer Verdau für 20 min im Wasserbad bei 37 °C unter Schütteln. Hierbei wurden, um Kontaminationen zu vermeiden, die Zentrifugenröhrchen mit Parafilm verschlossen und horizontal mit Gewichten beschwert im Wasserbad gelagert, um eine optimale Verdauung der Suspension zu ermöglichen. Die Mischung wurde anschließend durch einen 100 µm Cell Strainer in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert und der Filter zwei Mal mit je 15 ml HBSS gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 450g bei 4 °C für 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 10 ml GBSS mit NaCl resuspendiert, erneut mit 450g bei 4 °C für 6 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig und unter Vermeidung von Bläschenbildung mit 4,75 ml Lösung B resuspendiert und 4 ml Lösung C zugegeben. Mit einer 1000 µl Pipette wurden langsam 3 ml Lösung B auf die Suspension aufgeschichtet, ohne die gebildeten Schichten zu stören. Nach der Zentrifugation mit 1400g bei 4 °C für 20 min ohne Abbremsen konnte die entstandene weiße, flockig-krümelige Schicht zwischen den Gradienten sorgfältig abpipettiert werden. Dies geschah mit besonderer Vorsicht, um die Schichten nicht zu vermischen. Di10e Zellen wurden in 15 ml GBSS resuspendiert und mit 450g bei 4 °C für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit PSC-Medium resuspendiert, die Zellen in einer Zählkammer gezählt und je nach Ausbeute in eine oder mehrere 25 cm² große Zellkulturflaschen überführt. Am darauffolgenden

Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach der Isolation wurden die Zellen in engmaschigen Zeitabständen lichtmikroskopisch begutachtet, um über typische, bekannte morphologische Veränderungen und Eigenschaften der PSC eine Bestätigung der Reinheit der Kultur zu erhalten und den Erfolg der Isolation zu sichern. Für Aufnahmen der lebenden Zellen wurde das Mikroskop Axiovert 200 verwendet.

3.2.3 PSC 3D-Kultur und Levitation

Als Weiterentwicklung der 2D-Kultivierung von Zellen sind in den letzten Jahren verschiedene Arten der 3D-Kultur immer populärer geworden. Zellen werden hierbei nicht als Monolayer kultiviert, sondern mithilfe von Trägersystemen oder über Träger-freie-Systeme in 3D-Kultur gehalten. Zu letzteren zählen Agitations-basierte Ansätze, die sogenannte Hanging-Drop-Methode oder auch die magnetische 3D-Kultur. Ein Vorteil von Träger-freien-Systemen ist unter anderem, dass die Notwendigkeit, Proteasen und andere Enzyme zu verwenden, um beispielsweise Kollagene zu verdauen und „reine“ Zellen für Analysen wiederzugewinnen, entfällt. Während in 2D-Kultur Zellen nur in einer Ebene wachsen und kommunizieren, sind über die räumliche Anordnung in 3D-Kultur Zell-Zell-Interaktionen in einem viel größeren Ausmaß möglich. Die Zellmorphologie unterscheidet sich deutlich zwischen 3D- und 2D-Kultur, außerdem wird vermehrt Euchromatin zu Heterochromatin umgewandelt. Offene Fragen in der Anwendbarkeit von 3D-Kultur-Modellen bestehen derzeit unter anderem noch in der lichtmikroskopische Analysierbarkeit und einer teils schwierigen Reproduzierbarkeit [29]. Bei der Anwendung von 3D-Kulturen bei PSC wird die zellspezifische Eigenschaft der PSC-Aktivierung durch die Plastik-Oberfläche eines Zellkulturgefäßes umgangen. In vorangegangenen Arbeiten wurde Matrigel als Träger-basiertes System der 3D-Kultur zur PSC-Inaktivierung verwendet [17]. Die in dieser Arbeit verwendete Methodik der magnetischen 3D-Kultur, erstmalig etabliert von Souza et al. [30], weist die Vorteile der trägerfreien Systeme auf, zudem wirken keine Scherkräfte wie beispielsweise bei Agitations-basierten Techniken. Die Größe des Sphäroids beziehungsweise die Anzahl der eingesetzten Zellen ist zudem nicht so stark limitiert wie bei der Hanging-Drop-Methode. Für die Etablierung der magnetischen 3D-Kultur werden Zellen mit Polylysin-beschichteten Eisenoxid- und Gold-Nanopartikeln inkubiert. Durch einen äußerlich aufgelegten Magneten werden die Zellen schließlich innerhalb des normalen Kultur-Mediums in Levitation gebracht [29]. In der richtigen Konzentration angewendet sind die verwendeten Partikel nicht toxisch und üben keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen aus [31].

Für die Erzeugung der magnetischen 3D-Kultur wurden zu PSC in Passage 1-2 einer 70-80 % konfluenten 25 cm² großen Zellkulturflasche 75 µl Shuttle™-PL Nanopartikel in das frisch

gewechselte DMEM-Advanced-Medium hinzugegeben. Sie wurden für mindestens 8 h mit diesen inkubiert und die Aufnahme des NanoShuttles™ in die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert (Abbildung 1A). Anschließend wurden die Zellen mit HBSS gewaschen, trypsinisiert und mit 336g bei 23 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml DMEM-Advanced-Medium resuspendiert, die Zellsuspension gezählt und $5 \cdot 10^5$ PSC in ein Well einer 6-Well-Platte mit zellabweisender Oberfläche gegeben. Nach Auflegen eines Magnetendeckels (Abbildung 1B) konnte die Levitation der Zellen makroskopisch beobachtet und überprüft werden. Vor Einsatz in Experimenten befanden sich die PSC 24 h in Levitation (Abbildung 1C, D).

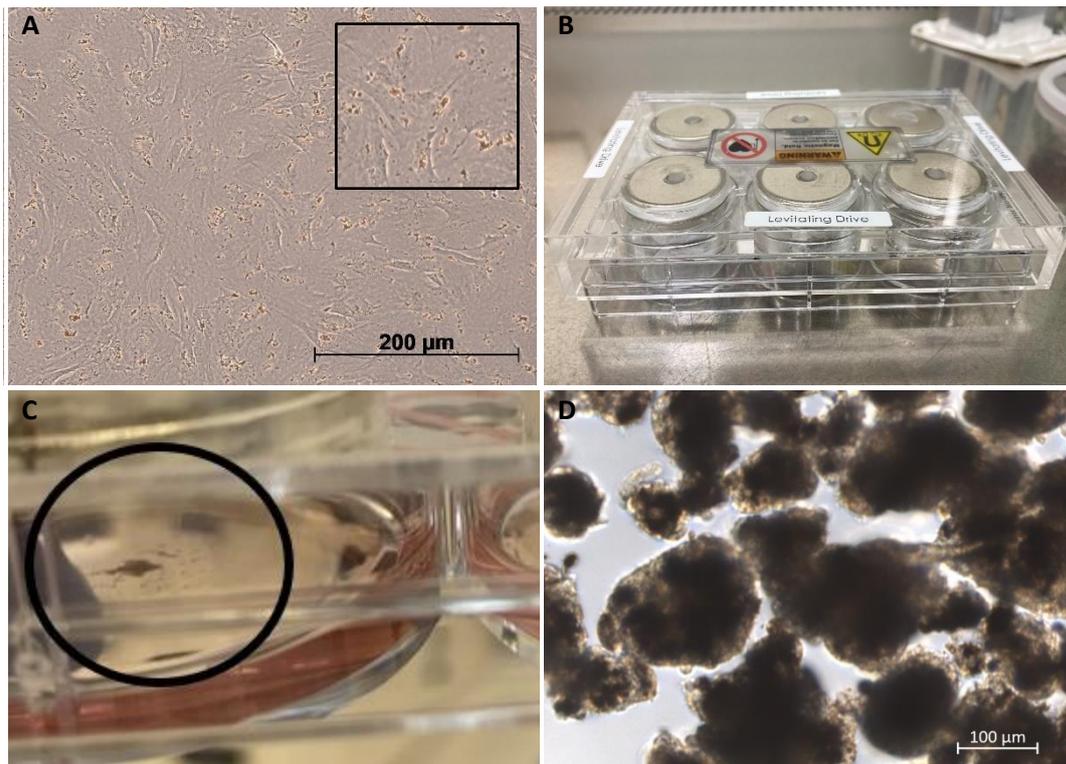


Abbildung 1: Illustrationen der magnetischen 3D-Kultur; A: PSC nach 8 h Inkubation mit NanoShuttle™, die NanoShuttle™-Partikel (braun) befinden sich innerhalb der Zellen, 20-fache Vergrößerung; B: 6-Well-Platte mit aufliegendem Magnetendeckel (Levitating Drive, Greiner); C: PSC in Levitation, makroskopisch sichtbare PSC (schwarz umkreist) 24 h in Levitation im Well einer zellabweisenden 6-Well-Platte mit aufliegendem Magnetdeckel; D: lichtmikroskopisch sichtbare PSC des Randbereichs 24 h in Levitation, NanoShuttle™-Partikel in Zellen sehr prominent, daher Zellmorphologie nur eingeschränkt beurteilbar, 10-fache Vergrößerung

3.2.4 Etablierung verschiedener Ko-Kultur-Modelle

Insgesamt wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Modelle der Ko-Kultur etabliert (Abbildung 2A-C). Für die Etablierung der Ko-Kulturen wurden hängende Zellkultureinsätze mit einer Membran aus Polyethylen und einer Porengröße von 1 μm verwendet, die jeweils in ein Well einer 6-Well-Zellkultur-Platte eingesetzt wurden. Bei drei verwendeten Zellarten ergeben sich insgesamt fünf verschiedene Modelle (Abbildung 2E).

In der Standard-Ko-Kultur wurden PSC auf der Oberseite der Membran des Einsatzes kultiviert, die Tumorzellen hingegen am Boden einer 6-Well-Platte, sodass die Zellen nur über Austausch von löslichen Stoffen über das Medium in Kontakt standen (Abbildung 2A). In einem neuartigen 3D-Ko-Kultur-Modell wurden PSC innerhalb eines Einsatzes magnetisch levitiert, die Tumorzellen befanden sich ebenfalls am Boden des Wells (Abbildung 2B). So konnte auch innerhalb des kurzen Zeitraums der Abnahme des magnetischen Deckels im Rahmen der RNA-Extraktion und der daraus folgenden Absenkung der PSC auf den Boden des Einsatzes ein direkter Kontakt der PSC mit den Tumorzellen verhindert werden. Im dritten Modell, der Inversen-Ko-Kultur, wurden PSC auf der Oberseite der Membran des Einsatzes kultiviert, die Tumorzellen hingegen auf der Unterseite der Membran (Abbildung 2C). Hierfür wurden die Tumorzellen auf den um 180° gedrehten Zellkultureinsätzen angesät, nach Anwachsen der Zellen der Einsatz in seine vorgesehene Position zurückgedreht und die PSC auf der Oberseite der Membran angesät. So konnte eine minimale räumliche Distanz zwischen den Zellgruppen, jedoch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt, erreicht werden (vergleiche dazu Kapitel 4.5).

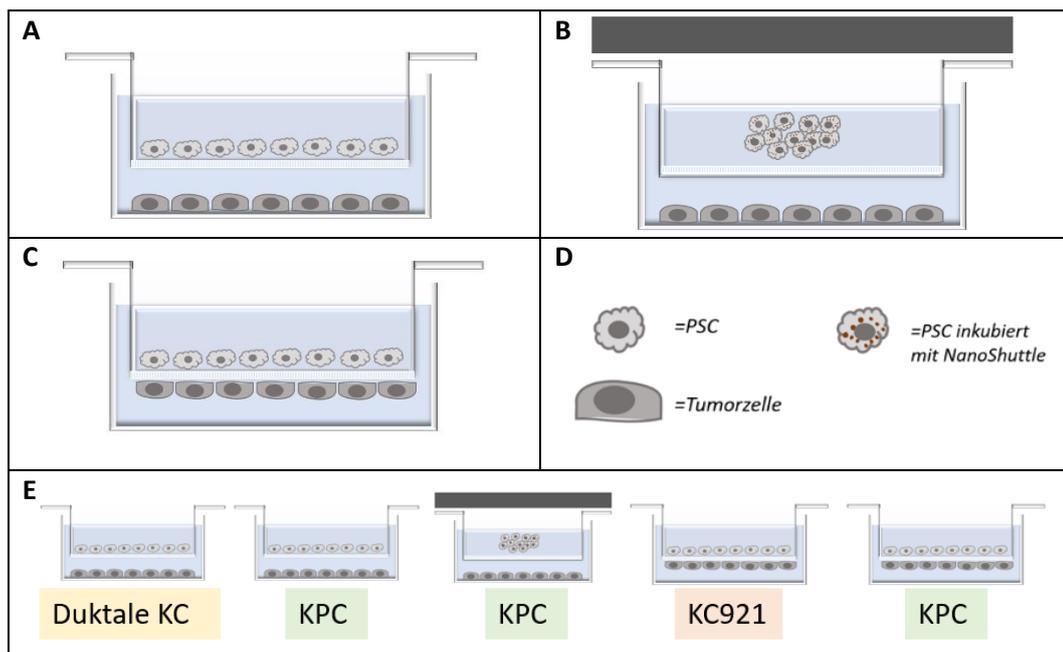


Abbildung 2: verschiedene Ko-Kultur-Modelle; A: PSC innerhalb des Zellkultureinsatzes und Tumorzellen am Boden des Wells; B: PSC in Levitation innerhalb des Zellkultureinsatzes und Tumorzellen am Boden des Wells; C: PSC innerhalb des Zellkultureinsatzes und Tumorzellen an der Unterseite des Zellkultureinsatzes; D: Legende der dargestellten Zellen; E: Überblick aller etablierten Modelle dieser Arbeit mit der jeweiligen verwendeten Zellart

Alle folgenden Ko-Kultur-Experimente wurden jeweils mindestens drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Die Zählung der Zellen fand mit einer Neubauer Zählkammer statt. Für die Experimente der Standard-Ko-Kultur-Variante (Abbildung 2A) wurden zwei unterschiedliche Tumorzellarten verwendet. Zum einen erfolgte die Ko-Kultur mit duktalem Pankreaszellen aus

transgenen, acht Wochen p48-Cre-KRAS^{G12D/+} (KC)-Mäusen, welche eine zweitägige Caerulein-Behandlung durchlaufen hatten. Zum anderen erfolgte die Ko-Kultur mit KPC-Zellen. Diese Pankreastumorzelllinie stammte aus transgenen p48-Cre-KRAS^{G12D/+}-TRP53^{R172h/+} (KPC)-Mäusen.

Im Rahmen der Ko-Kultur mit KPC-Zellen wurden zum Zeitpunkt Null getrennt $1 \cdot 10^5$ KPC-Zellen in je ein Well einer 6-Well-Platte und $1 \cdot 10^5$ PSC in einen Zellkultureinsatz mit einer Porengröße von $1 \mu\text{m}$ angesät. PSC wurden mit 2 ml DMEM-Advanced-Medium, KPC-Zellen mit 2 ml KPC-Medium bedeckt. Auch der Boden der Wells, in denen sich die Zellkultureinsätze befanden, wurde mit 2 ml DMEM-Advanced-Medium bedeckt. Nach Ablauf einer 24-stündigen Ruhephase, wurde das Anwachsen der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Danach wurde bei beiden Zelltypen ein einmaliger Mediumwechsel mit 2 ml DMEM-Advanced-Medium durchgeführt und die Zellkultureinsätze anschließend mithilfe einer Pinzette in das Well mit den KPC-Zellen überführt. Als Kontrolle dienten Zellkultureinsätze mit PSC, die in Wells überführt wurden, in denen sich nur 2 ml Medium, aber keine KPC-Zellen befanden. Während des laufenden Versuchs wurde das Medium belassen. Die 6-Well-Platten wurde bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und nach je 24 h und 72 h die RNA der PSC, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, extrahiert. Für die Ko-Kultur-Experimente mit KC-Zellen wurden zum Zeitpunkt Null $1 \cdot 10^5$ PSC in einen Zellkultureinsatz mit einer Porengröße von $1 \mu\text{m}$ angesät. PSC im Zellkultureinsatz wurden mit 2 ml DMEM-Advanced-Medium bedeckt, auch in dem unteren Well befanden sich 2 ml Medium. Circa $3 \cdot 10^6$ - $4 \cdot 10^6$ KC231 Zellen, kultiviert auf einer mit Rat Tail Kollagen I beschichteten 6-Well-Platte, wurden mit 2 ml OGM-Medium bedeckt. Nach 24 h wurden zunächst je 0,5 ml frisches OGM-Medium zu dem Well der KC-Zellen beziehungsweise DMEM-Advanced-Medium zu den sich im Zellkultureinsatz befindlichen PSC zugegeben. Anschließend erfolgte die Ko-Inkubation und das Einsetzen des Zellkultureinsatzes in das Well mit KC-Zellen mithilfe einer Pinzette. Als Kontrolle dienten Zellkultureinsätze mit PSC, die in Wells überführt wurden, in denen sich nur 2 ml OGM-Medium befanden. Die 6-Well-Platten wurde bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert und nach je 24 h und 72 h die RNA der PSC, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, extrahiert.

Für die Experimente der 3D-Ko-Kultur-Variante, bei der sich PSC in magnetischer Levitation befanden (Abbildung 2B), wurden $5 \cdot 10^5$ PSC vor Einsatz in der Ko-Kultur, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, in Levitation gebracht. Diese deutlich höhere, von den anderen Modellen divergierende PSC-Startzellzahl wurde in Vorversuchen ermittelt. Bei geringeren Startzellzahlen war die RNA-Ausbeute, vor allem zum 72 h Zeitpunkt, nicht zufriedenstellend. Zum Zeitpunkt Null wurden ebenfalls $1 \cdot 10^5$ KPC-Zellen am Boden einer 6-Well-Platte angesät und mit 2 ml DMEM-Advanced-Medium bedeckt. Nachdem sich die PSC für 24 h in einer abweisenden Zellplatte in 2 ml DMEM-Advanced-Medium in Levitation befunden hatten, erfolgte die Ko-

Inkubation mit den 24 h vorher angesäten KPC-Zellen. Primär wurden hierfür die Zellkultureinsätze in die 6-Well-Platte eingesetzt und mit Medium befüllt. Anschließend wurde die PSC-Zellansammlung mithilfe des MagPens, eines magnetischen Stifts, in den Zellkultureinsatz transferiert, in dem sich 1 ml DMEM-Advanced-Medium für den 24 h Zeitpunkt, beziehungsweise 1,5 ml Medium für den 72 h Zeitpunkt befand. Die Menge verwendeten Mediums und damit der Abstand der PSC zu dem Plattendeckel mit Magneten, wurde in Vorversuchen optimiert. Durch Auflegen des Plattendeckels mit Magneten auf die 6-Well-Platte wurde der Zellhaufen so innerhalb des Einsatzes erneut in Levitation gebracht. Als Kontrolle dienten PSC in Levitation innerhalb eines Zellkultureinsatzes ohne Tumorzellen am Boden des Wells. Nach 24 h und 72 h wurden die sich in Levitation befindlichen PSC mitsamt dem Medium abpipettiert, der Zellkultureinsatz dreimal mit je 2ml HBSS gewaschen und die Suspension mit 336g bei 23 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, extrahiert.

In Experimenten der Inversen-Ko-Kultur-Variante wurden Tumorzellen auf der Unterseite der Membran angesiedelt (Abbildung 2C). Hierfür wurden die Zellkultureinsätze um 180° gedreht in einer Petrischale platziert und etwa 0,4 ml einer Tumorzellsuspension mit $1 \cdot 10^5$ KPC-Zellen beziehungsweise $1 \cdot 10^5$ KC921-Zellen auf die Mitte der Unterseite des Einsatzes pipettiert. Die optimale Volumenmenge und Startzellzahl der Tumorzellen wurden in Vorversuchen ermittelt, dies erfolgte über Beobachtung des Verhaltens des Zellkultureinsatzes nach Aufsetzen des Deckels der Petrischale, sowie lichtmikroskopische Kontrollen des Tumorzellwachstums im Verlauf der Zeit. Nach dem Auflegen des Deckels der Petrischale hafteten die Zellkultureinsätze mit dem Flüssigkeitstropfen an diesem aufgrund von Kohäsions- und Adhäsionskräften. Durch die Lage der Flüssigkeit zwischen Membran und Petrischalendeckel wurde auch ein Verdunsten des Mediums im Zeitraum der Inkubation minimiert. Anschließend erfolgte der behutsame Transfer der Petrischale in den Brutschrank und eine Inkubation für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂, um ein Anwachsen der Tumorzellen zu ermöglichen (Abbildung 3). Nach Ablauf der 24 h wurde der Zellkultureinsatz mithilfe einer Pinzette um 180° gedreht und in einer 6-Well-Platte platziert. Es erfolgte zunächst die lichtmikroskopische Kontrolle des Wachstums der Tumorzellen auf der Unterseite der Membran, anschließend wurden $1 \cdot 10^5$ PSC je Einsatz eingesät. Sowohl im Zellkultureinsatz, als auch im Well befanden sich bei den Ko-Kultur-Varianten mit PSC und KPC-Zellen beziehungsweise mit PSC und KC921-Zellen jeweils 2ml DMEM-Advanced-Medium. Während des laufenden Versuchs wurde das Medium belassen und nicht gewechselt, um parakrine Prozesse nicht zu unterbinden. Nach Einsäten der PSC wurden weitere 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ als Ruhephase festgelegt, um ein Ansiedeln der PSC vor

Versuchsbeginn zu ermöglichen. Nach Ablauf dieser 24 h wurde die Zeitzählung des Experiments gestartet und nach je 24 h und 72 h die RNA der PSC, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, extrahiert.

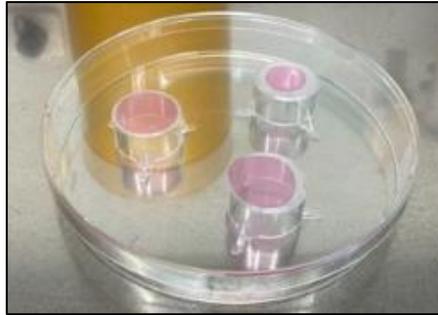


Abbildung 3: Angesäte KPC-Zellen in KPC-Medium auf der Unterseite der Zellkultureinsätze in Petrischale, Austestung unterschiedlicher Zellzahlen und Volumina

3.2.5 Vorversuch zur Zeitpunktauswahl der RNA-Extraktion

Zur Eingrenzung der Zeitpunkte der RNA-Extraktion wurden PSC mit KPC-Zellen in Ko-Kultur (Abbildung 2A) genommen und die RNA der PSC zu je drei unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) extrahiert. Der Versuch wurde drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. $1 \cdot 10^5$ PSC in Passage 1 oder 2 wurden 24 h vor Inkubation mit KPC-Zellen in 6-Well Zellkultureinsätze mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße eingesät und mit 1ml PSC-Medium bedeckt. Als Kontrolle dienten PSC in Zellkultureinsätzen mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße, die nicht mit KPC-Tumorzellen inkubiert wurden und deren RNA ebenfalls zu den genannten Zeitpunkten extrahiert wurde. Je Well einer 6-Well-Platte wurden ebenfalls 24 h vor einer gemeinsamen Inkubation $1 \cdot 10^5$ KPC-Zellen in Passage 6-7 eingesät und mit 2ml KPC-Medium bedeckt. Für zukünftige Ko-Kulturen wurden Zellkultureinsätze mit einer Porengröße von $1 \mu\text{m}$ statt $0,4 \mu\text{m}$ verwendet, siehe dazu auch Kapitel 4.1. Die optimale Startzellzahl der KPC-Zellen wurde in einer Verdünnungsreihe bestimmt. Hierfür erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Dichte der Zellen bei einer Startzellzahl von je $4 \cdot 10^5$; $2 \cdot 10^5$; $1 \cdot 10^5$; $0,5 \cdot 10^5$; $0,25 \cdot 10^5$ und $0,12 \cdot 10^5$ Zellen in einem Well einer 6-Well-Platte je 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach dem Ansähen zum Zeitpunkt Null. Vor gemeinsamer Inkubation der PSC und KPC-Zellen erfolgte ein einmaliger Mediumwechsel der KPC-Zellen mit PSC-Medium und eine Mediumzugabe von 1 ml PSC-Medium zu den PSC in den Zellkultureinsätzen. Die Auswirkungen verschiedener Medien, unter anderem des PSC-Mediums auf die Proliferation der KPC-Zellen wurde in einem weiteren Vorversuch untersucht. Dafür wurden KPC-Zellen bei gleicher Startzellzahl getrennt mit PSC- und KPC-Medium inkubiert und nach Trypsinieren der Zellen eine Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h vorgenommen. Am jeweiligen Zeitpunkt erfolgte, wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, die RNA-Extraktion der PSC mit $300 \mu\text{l}$ des QIAzol Lysis Reagent. Anschließend wurde aus der erhaltenen RNA, wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben, cDNA

angefertigt und, wie in Kapitel 3.2.9 erläutert, eine qPCR mit den Maus-Primern ACTA2, IL11, IL6, LIF, TGF β , IGFBP4 und TNF α durchgeführt. Als Housekeeping-Gene wurden B2M und RPL37A verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente aus RNA umgeschriebene cDNA, aus RAW 264.7 Zellen, die sich 24 h, 48 h und 72 h in Kultur befanden.

3.2.6 mRNA-Extraktion und Vermessung

Für die RNA-Extraktion wurde das QIAzol Lysis Reagent verwendet, um die Zellen zu lysieren. Hierfür erfolgte die Zugabe des Reagens entweder nach Absaugen des Mediums direkt auf die Zellen oder je nach Versuchsaufbau auch auf ein Zellpelltet in einem Zentrifugenröhrchen. Um das Pellet zu erhalten, wurden die adhärenen PSC im Zellkultureinsatz mit HBSS gewaschen, trypsinisiert und nach Mediumzugabe die Zellsuspension zentrifugiert. Sich in Levitation befindliche PSC wurden direkt mit einer Pipette mitsamt dem Medium, in dem sie sich befanden, in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte dann die Zugabe des QIAzol Lysis Reagent und das Vortexen der Flüssigkeit. Die Flüssigkeit wurde in ein 1,5 ml Tube transferiert und bei Bedarf bei -80 °C zwischengelagert. Die RNA wurde anschließend mit dem Direct-zol RNA Microprep Kit (Zymo Research) extrahiert. Hierbei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt und die RNA abschließend in RNase-freiem Wasser eluiert. Die Vermessung der RNA, die der Mengenbestimmung sowie der Reinheitsprüfung diente, erfolgte spektralphotometrisch mithilfe des Nano Drop One. Nach dem Blanken mit RNase freiem Wasser wurde ein Probenvolumen von 1 μ l aufgetragen und dieses vermessen. Da RNA charakteristischerweise ein Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzt, kann der A260/280 Quotient, der \approx 2 betragen sollte, zu der Beurteilung der Reinheit der RNA und Detektion von möglichen Kontaminanten herangezogen werden. So ist bei Resten von Substanzen beispielsweise aus dem Prozess der Extraktion eine geringerer Quotient zu erwarten [32]. Bei der weiter verwendeten RNA wurde darauf geachtet, dass diese einen ausreichend hohen A260/280 Quotienten aufwies.

3.2.7 RNA-Sequenzierung und Bioinformatische Auswertung

Die Methode der RNA-Sequenzierung ermöglicht einen umfassenden Überblick über das Transkriptom einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Auch über die Quantität einer einzelnen Genexpression kann mithilfe der Summe der sogenannten reads eine Aussage gemacht werden. Am Anfang der RNA-Sequenzierung steht die Extraktion von RNA aus den zu analysierenden Zellen. In einem nächsten Schritt wird über ein sogenanntes Poly-A-Enrichment, bei dem Moleküle mit Poly-A-Schwanz vermehrt werden, die Anreicherung von mRNA erreicht. Diese wird fragmentiert und mithilfe der Methodik der Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Daraufhin werden spezielle Adapter an die einzelnen Fragmente angefügt, die

die Hybridisation mit zu den Adaptoren komplementären Oligonukleotiden in der flow cell ermöglichen. In der flow cell, einer Durchflusszelle aus Glas, finden schließlich die Amplifikation, räumliche Anordnung in Clustern und Fixierung der Fragmente statt. Durch den Einbau komplementärer fluoreszierender Nukleotide entlang der Stränge und die unmittelbare optische Erfassung der Signale mithilfe eines Lasers wird die Nukleotidabfolge der Fragmente detektiert. Die erhaltenen Sequenzen werden als reads bezeichnet. Pro Probe werden je nach Fragmentlänge mehrere Millionen reads registriert. Die so entstehende große Menge an Rohdaten muss aufbereitet und bioinformatisch ausgewertet werden. Hierbei wird nach einer Qualitätskontrolle der reads ein sogenanntes Alignment vorgenommen, bei welchem Sequenzen mit jeweils identischen Basenabfolgen kombiniert werden. Sogenannte repeats, die repetitiven Sequenzen im Genom entsprechen, können zu einem fehlerhaften Alignment der Sequenzen führen, da sie potenziell an mehreren Stellen des Erbguts auftreten können. Die Verwendung der paired end-Sequenzierung, bei der von beiden Enden des Fragments die Nukleotidabfolge abgelesen wird, kann dieses Problem begrenzen [33]. Nach erfolgtem Mapping mit einem Referenzgenom könne Gen-Expressions-Level-Analysen sowie Differenzielle-Gen-Expressions-Analysen durchgeführt werden, am Schluss der Datenanalyse stehen funktionelle Analysen. Die RNA-Sequenzierung in dieser Arbeit fand in Kooperation mit der Firma Novogene mithilfe des NovaSeq Sequenziersystems (Illumina) statt. Je Probe wurden mindestens 100 ng RNA eingeschickt, die weitere Aufbereitung der Proben wurde von der Firma Novogene übernommen. Reinheit und Integrität der RNA wurden mithilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese und des Agilent 2100 Bioanalyzers überprüft. Anschließend wurde eine Bibliothek erstellt, die RNA wurde in 150 Basenpaar-lange Stücke fragmentiert und mit der paired end-Methode sequenziert. Dabei wurden mindestens 20 Mio. reads pro Probe ausgelesen. Im Rahmen der Bioinformatischen Analyse wurden die Rohdaten einer erneuten Qualitätskontrolle unterzogen. Zur Beurteilung der Qualität der Daten wurden die Fehlerrate einer einzelnen Base bei der Sequenzierung sowie die CG Content distribution, die der Guanin-Cytosin Verteilung entspricht, herangezogen. Die Rohdaten wurden gefiltert, hierbei unter anderem reads mit Adaptoren und Low Quality Reads entfernt, sodass abschließend bei allen Proben > 99 % der Rohdaten aus sogenannten Clean Reads bestanden. Für das Alignment wurde der Algorithmus HISAT2 (National Human Genome Research Institute) eingesetzt. In dieser Arbeit wurde das Referenzgenom *Mus musculus* (Genom ID: ensembl_mus_musculus_grcm38_p6_gca_000001635_8) verwendet. Die Gen-Expressions-Level wurden über die Anzahl der mapped-reads berechnet. Die Anzahl der reads ist proportional zu dem jeweiligen Gen-Expressions-Level. Eine Beeinflussung der Anzahl der reads ist allerdings auch durch die Länge des Gens, da längere Gene mehr mapping-reads aufweisen

und der Sequenzier-Tiefe, da bei einer größeren Gesamt-read-Menge subsequent mehr reads entstehen, möglich. Hierbei werden die Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads, beziehungsweise die Fragments per kilo base per million mapped reads (FPKM) bei paired end-Sequenzierung als übliches Maß gewählt. Der Vorteil der Verwendung von FPKM ist eine Normalisierung der reads für die Länge des Gens und der Sequenzier-Tiefe [34]. Novogene setzt den Schwellenwert, ab dem ein Gen als exprimiert gilt auf $FPKM > 1$. Durch Korrelation der Gen-Expressions-Level der einzelnen biologischen Replikate zueinander kann ihre Ähnlichkeit abgebildet werden. Mit Funktionen der in der Programmiersprache R enthaltenen Code-Bibliotheken berechnet Novogene den Pearson-Korrelationskoeffizienten. Je näher dieser an der Zahl 1 liegt, desto ähnlicher sind sich die Proben. Der Readcount der Gen-Expressions-Level-Analyse wurde für die Berechnungen der Differenziellen-Gen-Expressions-Analyse verwendet. Novogene nutzt zunächst das DESeq2 R package [35], um die differenzielle Expression zweier Gruppen zu ermitteln. Aus den erhaltenen p-Werten wird unter Berücksichtigung der Falscherkennungsrate der padjust-Wert, mit der Methode nach Benjamini und Hochberg, berechnet [36]. In dieser Arbeit werden funktionelle Analysen wie die Gene Ontology-Enrichment (GO)-Analyse und die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-Enrichment (KEGG)-Analyse angewendet. Eine GO-Analyse hat das Ziel komplexe biologische Sachverhalte anschaulich darzustellen, einheitlich zu kategorisieren und zu benennen. Hierbei wird mithilfe eines hierarchischen Systems die Information aus einem Gen-Set über vorab festgelegte, zueinander in Beziehung stehende Begrifflichkeiten ermittelt. Es sind drei voneinander unabhängige GO-Kategorien definiert: Biological process (BP), in der ein komplexer Ablauf wie beispielsweise „Signaltransduktion“ beschrieben wird, Molecular function (MF), die das biochemische Wesen des Gen-Produkts anzeigt und beispielsweise „Ligand“ lauten könnte und die Rubrik cellular component, die die Lokalisation des Gen-Produkts in der Zelle, beispielsweise „Ribosom“ beschreibt [37]. In dieser Arbeit werden GO-Analysen der BP- und MF-Kategorie betrachtet, diese wurden mit der Novogene-Software NovoSmart ermittelt. Als weitere funktionelle Untersuchung ermöglichen KEGG-Analysen, unter Nutzung der KEGG-Datenbank, eine Durchdringung der high-level-Funktionen eines Organismus und die Zu- und Einordnung der jeweiligen veränderten Gene in Signalwege [38]. In dieser Arbeit werden von Novogene als signifikant ermittelte KEGG-Pathway-Analysen betrachtet. Es findet eine Aufspaltung der Analysen in up- und down-KEGG-Analysen statt, bei denen jeweils nur die hoch oder herunter-regulierten Gene im Vergleich zu den Kontrollen betrachtet werden, sodass eine Aussage über die Richtung der Regulation möglich wird. Die Namensgebung der im Folgenden genannten KEGG-Signalwege entspricht der Nomenklatur der KEGG Pathway Database [39]. Heatmaps zur Visualisierung der Expression der in die Signalwege involvierten Gene wurden mithilfe der

Software NovoSmart erstellt. Zusätzlich wurden weitere Analysen, wie Principal Component Analysen und differenzielle Genexpressionsanalysen, in freundlicher Unterstützung durch Markus Glaß und das Institut für Molekulare Medizin der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.2.8 cDNA-Herstellung

Um die Expression verschiedener Gene auf RNA-Ebene mittels einer weiteren Methodik, der qPCR, für eine weitere Validierung und Vorversuche untersuchen zu können, fand eine Umschreibung der RNA in cDNA statt. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wird das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, verwendet. Durch Zugabe von Random-Primern wird die Initiation der cDNA-Synthese ermöglicht und es entsteht ein RNA-DNA-Hybridstrang. Durch die weitere Aktivität der Reversen Transkriptase als Ribonuclease RNase H wird der RNA-Teil des RNA-DNA-Hybridstranges entfernt und die Synthese einer doppelsträngigen DNA ermöglicht [40]. Für die cDNA-Herstellung wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet und hierbei das Protokoll des Herstellers befolgt. Alle Reagenzien wurden bei 4 °C aufgetaut, mit dem Vortexer gemischt und zentrifugiert. Pro Ansatz wurden 10 µl des Mastermixes (2 µl 10-fache RT Buffer, 0,8 µl 25-fache dNTP Mix 100mM, 2 µl 10-fache RT Random Primers, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 4,2 µl Nuclease-freies Wasser) vorbereitet. Zu 10 µl des Mastermixes wurden je 10 µl der mit RNase freiem Wasser verdünnten RNA-Probe mit einer RNA-Menge von 300 ng in ein 0,5 ml Tube pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz entstand. Die Tubes wurden kurz zentrifugiert und in einem Thermocycler plaziert. Es wurde ein Zyklus mit 25 °C für 10 min, 37 °C für 120 min und 85 °C für 5 min und einer Temperatur von 4 °C bis zum Entnahmezeitpunkt der Proben durchlaufen. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.9 Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Das Prinzip der Polymerase Chain Reaction (PCR) beruht auf der Amplifizierung von Genabschnitten mithilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase und spezifischer Primer. Es werden hierbei repetitive gleichartige Zyklen durchlaufen, wobei ein Zyklus jeweils aus den drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation besteht. Bei der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA aufgetrennt, die Phase des Annealings beinhaltet eine Anlagerung der spezifischen Primer an die zu amplifizierende Gensequenz und in der abschließenden Elongation erfolgt die Amplifikation der entsprechenden Genabschnitte mithilfe der DNA-Polymerase und Nukleotiden als Substrat [41]. Bei der Real Time Quantitative PCR (qPCR) wird unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzfarbstoffes die quantitative Messung der Amplifikation der DNA ermöglicht. Sobald der Farbstoff in der DNA interkaliert, findet ein Anstieg der Fluoreszenz des

gebundenen Farbstoffs, verglichen mit der Fluoreszenz des freien Farbstoffes, statt. Der Anstieg der Fluoreszenz skaliert proportional zu der Anzahl der amplifizierten PCR-Produkte. Die Stärke der Fluoreszenz lässt also Rückschlüsse auf die amplifizierte DNA-Menge zu. Die Messungen der Fluoreszenz finden in Echtzeit am Ende eines jeden Zyklus, jedoch während der gesamten Dauer der PCR statt. Die Verwendung von fluoreszierendem DNA-bindendem Farbstoff ist sehr sensitiv, aber weniger spezifisch, da auch eine Reaktion mit Primer-Dimeren und PCR-Beiprodukten möglich ist. Um zu überprüfen, ob spezifische PCR-Produkte entstanden sind, wird am Ende der PCR eine Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate durchgeführt und hierbei die Fluoreszenzabnahme bei Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes detektiert. Anstelle von DNA ist auch das Einsetzen von cDNA in der qPCR möglich, sodass mit mRNA als Ausgangsmaterial Rückschlüsse auf die Genexpression der Organismen durchführbar sind [42]. Für die Durchführung der qPCR wurde eine Probe wurde ein Mastermix mit 4 µl des Enzyms 5 x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus, 1,5 µl des Antisense Primers (10µM), 1,5 µl des Sense Primers (10µM) und 11 µl RNase freiem Wasser erstellt. Alle Primer (100µM) wurden in einer 1:10 Verdünnung mit RNase freiem Wasser verwendet. Das Gesamtvolumen einer Probe betrug 20 µl, zu 18 µl des Mastermixes wurden je 2 µl der aus RNA umgeschriebenen cDNA Probe in ein 0,1 ml Probenröhrchen pipettiert. Primer und cDNA Proben wurden bei -20 °C gelagert, nach dem Auftauen mit dem Vortexer gemischt und anschließend zentrifugiert. Während des Pipettierens erfolgte die Kühlung der Röhrchen bei 4 °C mithilfe einer Kühlplatte. Es erfolgte eine Doppelbestimmung einer jeden Probe, sowie eine Doppelbestimmung RNase-freien Wassers. Die Probenröhrchen wurden in dem Rotor-Gene Q PCR Cycler platziert und ein erster Programmschritt bei 95 °C für 15 min mit dem Ziel der Aktivierung der Polymerase durchgeführt. Anschließend wurden insgesamt 40 Zyklen mit folgenden Einstellungen durchlaufen: Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Annealing bei 60 °C für 20 s und Elongation bei 72 °C für 20 s. Die Auswertung der Daten der qPCR erfolgte mithilfe der Rotor-Gene Q Software und der Comparative Quantification Methode. Hierbei wird die Effizienz eines jeden einzelnen Gens für jede PCR Reaktion berechnet [43]. Bei der relativen Quantifizierung der qPCR wird die Expression des Gens von Interesse durch Housekeeping-Gene ermittelt, von denen eine gleichmäßige Expression angenommen wird [44]. In den untersuchten Proben wurde die Expression zweier Housekeeping-Gene, B2M und RPL37A, bestimmt. Mithilfe der Methode der Comparative Quantification erfolgte zunächst die Auswertung der Housekeeping-Gene, anschließend wurden die Proben in das Verhältnis zu den Mittelwerten der Housekeeping-Gene gesetzt. Die Kalibrierung erfolgte anhand der Kontrolle des jeweiligen Zeitpunktes, diese wurde mithilfe des Kalibrators auf 100 % gesetzt.

3.2.10 Primerdesign

Das Designen der Primer erfolgte mithilfe des Primer-BLAST Tools des National Center for Biotechnology Information [45]. Hierbei wurde auf eine möglichst hohe Spezifität der Primer und eine möglichst geringe Bildung von Self-Dimer-Bindungen geachtet.

3.2.11 Aufbereitung und Fixierung der Zellen für immunzytochemische Färbungen

Für immunzytochemische Färbungen der PSC oder KPC wurden silanisierte, sterilisierte Objektträger (OT) mit je 200 µl der PSC- oder KPC-Zellsuspension beimpft, die Dichte der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und die OT für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Fixierung erfolgte in eiskaltem Aceton für 10 min bei -20 °C. Nach Lufttrocknung der OT bei RT erfolgte die Lagerung bei -20 °C. Die Fixierung der PSC in Levitation zur Anfertigung immunzytochemischer Färbungen folgt im Wesentlichen einer im Kontext von 3D-Kardiozytenmodellen bereits angewandten Methode [46]. Hierfür wurden die levitierten PSC mithilfe des MagPen in ein Well einer 24-Well-Platte transferiert (Abbildung 4A) und ein 24-Well-Holding-Drive untergelegt, um die Zellen während der folgenden Schritte am Boden zu halten. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, für 10 min in 10 % Formalin in PBS Lösung fixiert, erneut mit 1x PBS gewaschen, mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert und erneut mit 1x PBS gewaschen. Die fixierten Zellen wurden mithilfe des MagPens zwischen zwei Schichten Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound gebettet und bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurden mit einem Kryotom 10 µm dicke Schnitte des Blocks angefertigt. Das Aufsuchen der PSC erfolgte über makroskopische Kontrolle, die Zellen imponierten hierbei als zentral gelegene kleine braune Pünktchen (Abbildung 4B). Die Schnitte wurden auf SuperFrost™ OT gezogen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Fixierung der duktaalen KC-Zellen wurden silanisierte, sterilisierte OT mit Kollagen I (50 µg/ml in 0,02 N Essigsäure) beschichtet. Dafür erfolgte die Inkubation der OT mit der Kollagenlösung bei RT für eine Stunde, die Aspiration der überschüssigen Lösung und ein zweimaliges Waschen mit 1x PBS. Anschließend wurden die OT mit 200 µl Zellsuspension beimpft, lichtmikroskopisch kontrolliert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte eine Fixation der Zellen für 20 min bei RT mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung in PBS. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die OT bei RT getrocknet und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

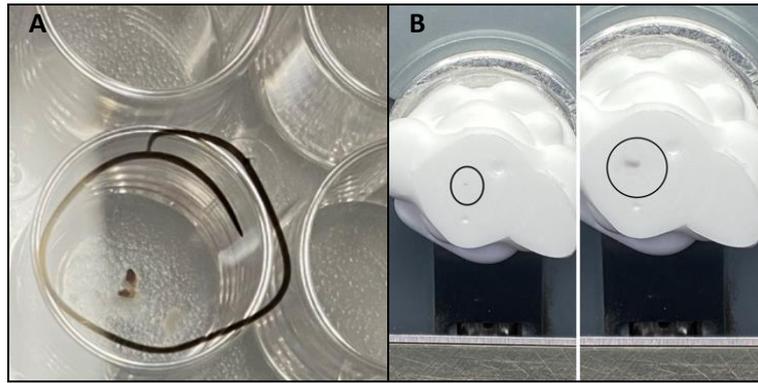


Abbildung 4: PSC im Prozess der Fixierung; A: PSC nach Transfer mit MagPen im Well einer 24-Well-Platte (ohne Holding-Drive); B: makroskopisch sichtbare PSC in Block aus OCT-Medium eingespannt im Kryotom (linke Bildseite), Vergrößerung derselben makroskopisch sichtbaren PSC in Block aus OCT-Medium (rechte Bildseite)

3.2.12 Immunzytochemie

Die Beimpfung und primäre Fixierung der OT mit PSC, KC- und KPC-Zellen, sowie die Aufbereitung und Fixierung der PSC 3D-Kulturen erfolgte wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Bei der Durchführung der folgenden Schritte wurde ein ständiges Feuchthalten der OT sichergestellt. Zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung wurden die OT zunächst in ein 3 % Wasserstoffperoxid/Methanol-Bad (1:5) überführt und darin für 20 min bei 4 °C belassen. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen mit 1x PBS für 5 min bei RT. Alle Waschvorgänge mit 1x PBS wurden mithilfe eines Magnetrührers und eines Rührfisches durchgeführt, um eine optimale Reinigung zu ermöglichen. Nach Umkreisen der Zellen auf dem OT mit einem Pap Pen Fettstift wurden je 100 µl des Antikörpers beziehungsweise 100 µl 1x PBS für die Negativkontrolle aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Verdünnung der Antikörper (1:100 Anti-FAP Antikörper; 1:100 Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, Agilent; 1:50 Anti-Vimentin Antikörper, clone 2I13 ZooMAb® Rabbit Monoclonal, Sigma-Aldrich; 1:100 bei KPC-Zellen, 1:500 bei PSC, 1:1000 bei KC-Zellen Anti-Cytokeratin 19 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody SA30-06; 1:100 Anti-E-Cadherin H-108 Rabbit Polyclonal Antibody) wurde das Antibody Diluent verwendet. Nach der Inkubation erfolgte ein einmaliges Waschen mit 1x PBS für 5 min bei RT. Für die weiteren Schritte wurde das Dako LSAB®2 System-HRP Kit verwendet. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min mit je 200 µl des Bücken-Antikörpers, anschließend ein einmaliges Waschen mit 1x PBS für 5 min bei RT. Daraufhin erfolgte eine Inkubation für 30 min mit je 200 µl der Streptavidin-Peroxidase, anschließend ein einmaliges Waschen mit 1x PBS für 5 min bei RT. Die Herstellung der Substratlösung erfolgte mit dem Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System Kit. Die OT wurden für maximal 10 min mit der Substratlösung inkubiert. Anschließend erfolgte ein einmaliges Waschen mit Aqua dest für 10 min bei RT. Für die Gegenfärbung mit Hämalaunlösung

(1: 5 Verdünnung mit Aqua dest) wurden die OT 3 min mit der Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang für 5 min mit Leitungswasser. Nach kurzem Abspülen der OT mit Aqua dest wurden die OT mit Aquatex® Eindeckmittel und Deckgläsern eingedeckelt. Nach mindestens 24 h Trocknung bei RT erfolgte die Mikroskopie mithilfe des Mikroskops AxioPlan 2 und Fotografie der OT mithilfe der Software AxioVision.

3.2.13 Oil-Red O Färbung

Die Beimpfung der OT mit PSC erfolgte wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Die primäre Fixierung wurde mit 4 % Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) durchgeführt, da Aceton fetthaltige Substanzen löst. Für die Oil-Red O Färbung der 3D-PSC wurden die OT, wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben, fixiert und anschließend 20 min in einer 3,7 % Formaldehydlösung (Verdünnung mit 1x PBS) belassen. Nach einem einmaligen Waschvorgang mit 1x PBS wurden die OT für 12 min in einer vorab filtrierten Oil-Red O Lösung (Stocklösung 300mg Oil-Red O in 100ml Isopropanol; frisch zubereitete Verdünnung 5:2 mit Aqua dest) belassen. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua dest wurden die OT für 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und abschließend erneut in Aqua dest gespült. Es erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalun-Lösung für 45 s. Daraufhin wurden die OT zweimalig mit Aqua dest und für 3 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Nach kurzem Spülen in Aqua dest wurden die OT mit Aquatex® Eindeckmittel und Deckgläsern eingedeckelt. Nach mindestens 24 h Trocknung bei RT erfolgte die Mikroskopie mithilfe des Mikroskops AxioPlan 2 und Fotografie der OT mithilfe der Software AxioVision. Die Oil-Red O Färbung der PSC im Zellkultureinsatz orientierte sich im Wesentlichen nach einem bereits etablierten Protokoll [47]. Hierfür wurden $8 \cdot 10^4$ PSC in einem Zellkultureinsatz mit 1 μm Porengröße angesät und für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Zeitpunkt der Färbung wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, die Flüssigkeit komplett mithilfe von Filterpapier entfernt und für 15 min in 1 ml 10 % Formaldehydlösung (in 1x PBS) fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen zweimalig mit 1x PBS gewaschen und 2 ml frisch zubereitete Oil-Red working solution zugegeben (6 ml Oil-Red Lösung: 300 mg in 100 ml Isopropanol, 4 ml Aqua dest). Die Zellen wurden für 11 min mit der Färbelösung inkubiert, dann zweimalig mit 1x PBS gewaschen, mit frisch filtrierter Hämalun-Lösung für 30 s gegengefärbt und abschließend mehrmals mit 1x PBS gewaschen. Aufnahmen der gefärbten Zellen im Zellkultureinsatz wurden direkt nach der Färbung mithilfe des Mikroskops Axiovert 200 und der Software AxioVision angefertigt.

3.2.14 Fluoreszenz-Immunzytochemie

Die Beimpfung und primäre Fixierung der OT mit PSC, sowie die primäre Aufbereitung und Fixierung der PSC 3D-Kulturen erfolgte wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Bei der Durchführung der folgenden Schritte wurde ein ständiges Feuchthalten der OT sichergestellt. Zu Beginn der Anti- α -SMA Färbung wurden OT der PSC 3D-Kulturen 10 min in Aceton fixiert, anschließend mit einem Pap Pen Fettstift umkreist, für 15 min mit 100 μ l 0,5 % Triton X in PBS permeabilisiert, mit 3 % BSA in PBS geblockt und vor Auftragen des ersten Antikörpers dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei allen Färbungen identisch durchgeführt. Es wurden je 100 μ l des verdünnten Primärantikörpers (Anti-GFAP ab7260, abcam, 1:1000 in AB Diluent; Anti-alpha SMA 17H19L35, Thermo Fisher, 1:25 in AB Diluent) beziehungsweise je 100 μ l 1x PBS als Negativ-Kontrolle aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges, je zehnminütiges Waschen der OT mit 1x PBS. Anschließend wurden auf alle OT je 100 μ l des verdünnten Sekundärantikörpers (AlexaFluor488 ab150077, abcam, 1:400 in PBS) aufgetragen und die OT für eine Stunde bei RT in Abdunklung inkubiert. Die weiteren Arbeitsvorgänge wurden unter Abdunklung durchgeführt. Es erfolgte erneut ein dreimaliges je zehnminütiges Waschen der OT mit 1x PBS. Für die Kernfärbung mit Hoechst Färbelösung (1:100 Verdünnung in 1x PBS) wurden die OT nach Auftragen der Lösung 2 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem je zehnminütigen Waschen mit 1x PBS und eine einmalige Spülung in Aqua dest erfolgte nach Trocknung der OT bei RT die Eindeckelung mit Fluorescence Mounting Medium (Agilent) und Deckgläsern. Nach mindestens 24 h Trocknung bei 4 °C erfolgte die Mikroskopie mithilfe des Mikroskops Axioplan 2 und Fotografie der OT mithilfe der Software AxioVision.

3.2.15 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Ob PSC in einer invertierten Ko-Kultur mit KPC (Abbildung 2C) über Zellfortsätze in Kontakt stehen, wurde mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen genauer untersucht. Die Aufnahmen fanden durch freundliche Unterstützung durch Herrn Dr. Dr. Gerd Hause und das Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg statt. Insgesamt wurden Ko-Kulturen mit Zellkultureinsätzen drei unterschiedlicher Porengrößen untersucht: 0,4 μ m, 1 μ m und 3 μ m. $1 \cdot 10^5$ KPC-Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, auf der Unterseite des jeweiligen Zellkultureinsatzes angesät. 24 h später wurde der Zellkultureinsatz um 180° gedreht und $1 \cdot 10^5$ PSC in diesen eingesät. Nach 72 h gemeinsamer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ ohne Mediumwechsel wurden die Proben fixiert und aufbereitet. Zunächst erfolgte über 2 h die Fixierung mit 3 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer bei RT und einem pH-Wert von 7,2. Nachfolgend wurden die Proben dreimal für 10 min mit Natriumcacodylatpuffer bei RT

gewaschen und über Nacht bei 4 °C belassen. Hierauf wurden die Proben zweimal für 10 min mit Natriumcacodylatpuffer bei RT gewaschen. Lipide und somit die Zellmembranen wurden über eine Inkubation für 30 min mit 1 % Osmiumtetroxid in Natriumcacodylatpuffer angefärbt. Die Proben wurden dreimal für 10 min mit H₂O gewaschen und mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Es wirkten je 30 min 10 %, 30 % und 50 % Ethanol ein. Anschließend wurden die Proben mit 70 % Ethanol und 1 % Uranylacetat über 1 h inkubiert und mit 70 % Ethanol über Nacht bei 4 °C belassen. Am nächsten Tag wirkten für je 30 min 70 %, 90 %, 100 % und nochmals 100 % Ethanol ein. Die Infiltration mit Epoxidharz orientierte sich an einer von Spurr etablierten Methodik [48]. Die Proben wurden über folgende Zeiträume mit folgenden Mischverhältnissen von Ethanol:Epoxidharz inkubiert: 3 h im Verhältnis 3:1, 4 h im Verhältnis 1:1, über Nacht im Verhältnis 1:3 und mindestens zweimalig 8 h reines Epoxidharz. Hierauf erfolgte die Einbettung mit reinem Epoxidharz und Polymerisation bei 70 °C für 12 h. Nach der Auspolymerisation wurden 70 nm dicke Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Cedukol befilmte Kupfer-Grids aufgenommen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die zur Analyse verwendete Beschleunigungsspannung des Transmissionselektronenmikroskop betrug 80 kV. Für die Aufnahmen wurde eine Variospeed SSCCD Kamera SM-1k-120 verwendet, die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software ImageSP.

3.2.16 Statistische Methoden

Alle Experimente wurden je drei Mal wiederholt, biologische Replikate jeweils zu Gruppen zusammengefasst und gemittelt analysiert. Grundsätzlich wurde ein p-Wert kleiner als 0,05, wie konventionell gebräuchlich, als signifikant gewertet [49]. Da bei der Testung einer Vielzahl von Hypothesen bei dem Vergleich einer Vielzahl von Genen die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse steigt, wird bei der differentiellen Genexpressionsanalyse der padjust-Wert für die Signifikanz eines Ergebnisses berücksichtigt. Dieser wurde von Novogene nach der von Benjamini und Hochberg entwickelten Methode berechnet [36]. Ein padjust-Wert und ein Enrichment-p-Wert für Analysen der differentiellen Genexpression und GO-/KEGG-Analysen kleiner als 0,05 wurden als signifikant definiert. Die Daten der PCR-Analyse wurden mithilfe der Rotor-Gene Q Software und Excel ausgewertet. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichung wurden mit Microsoft Excel berechnet. Die Überprüfung der Normalverteilung der Daten der qPCR erfolgte mittels des Shapiro-Wilk-Tests. Die Überprüfung der Signifikanz von paarweisen Genvergleichen erfolgte in Abhängigkeit von der Datenverteilung mittels parametrischen t-Tests oder nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests (beide two-tailed). Für die genannten Tests wurde die Software GraphPad Prism 9 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Auswahl der zu untersuchenden Zeitpunkte für die Ko-Kultur-Modelle

Ein Zeitpunktversuch wurde im Vorfeld der Realisierung der verschiedenen Ko-Kultur-Modelle durchgeführt, um drei vorher festgelegte Zeitpunkte (24 h, 48 h und 72 h) auf zwei Zeitpunkte einzugrenzen. Damit sollte ein ressourcenschonendes Arbeiten und die Fokussierung auf die wesentlichen Veränderungen zwischen zwei Zeitpunkten ermöglicht werden. Die Auswahl der Zeitpunkte erfolgte anhand der Bewertung der Expression spezifischer Inflammations- und Aktivierungs-Gene mittels PCR, die Aufschluss über den Zustand der PSC geben sollten. Für die Ausführung des Zeitpunktversuchs wurde die Standard-Ko-Kultur gewählt (Abbildung 2A). Für die Auswahl der Startzellzahl der stark proliferativen KPC-Zellen wurde berücksichtigt, dass sowohl eine ausreichende Dichte der Zellen im Well schon zu Beginn erreicht werden sollte, allerdings auch eine übermäßige Konfluenz der KPC-Zellen zu jedem Zeitpunkt vermieden werden sollte. Es stellte sich heraus, dass eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ KPC-Zellen pro Well einer 6-Well-Platte optimal für einen Wachstumszeitraum von 4 Tagen ist, der sich ergibt, wenn zusätzlich zu den 72 h das Zeitfenster von 24 h nach dem Ansähen berücksichtigt wird. Hinsichtlich der in einem Vorversuch getesteten Auswirkungen des PSC-Mediums auf KPC-Zellen zeigte sich eine um bis zu 5-fache stärkere Proliferation der KPC-Zellen in Reaktion auf das PSC-Medium im Vergleich zur Kultivierung mit KPC-Medium. Dies lässt sich vermutlich auf einen prozentual höheren FBS-Anteil des PSC-Mediums (16 % FCS im PSC-Medium vs. 10 % FCS im KPC-Medium) zurückführen. Die Proliferation von KPC-Zellen bei Verwendung von DMEM-Advanced-Medium war vergleichbar mit der bei Verwendung von KPC-Medium. Daher wurden folgende Ko-Kultur-Experimente in beiden Kompartimenten, als auch die Kultivierung der PSC mit erstgenanntem durchgeführt. Des Weiteren wurden in folgenden Experimenten Zellkultureinsätze mit einer Porengröße von 1 μm statt 0,4 μm verwendet. Grund hierfür war ein angenommener besserer Transport löslicher Stoffe und Flüssigkeiten bei einer Porengröße von 1 μm bei gleichbleibender Barrierefunktion. IL6 und TNF α wurden als Vertreter der Gruppe der inflammatorischen Zytokine ausgewählt. Es konnte eine signifikant unterschiedliche Expression von IL6 und TNF α zu 48 h und 72 h bei PSC, die mit KPC-Zellen inkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Zwischen den Zeitpunkten war die Expression jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Der Wachstums-modulierende Faktor IGFBP4 wurde zum Zeitpunkt 72 h signifikant höher von PSC der Ko-Kulturen exprimiert (Abbildung 5). Die untersuchten Gene ACTA2, IL11, LIF und TGF β zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich Kontrolle vs. mit KPC-Zellen inkubierte PSC.

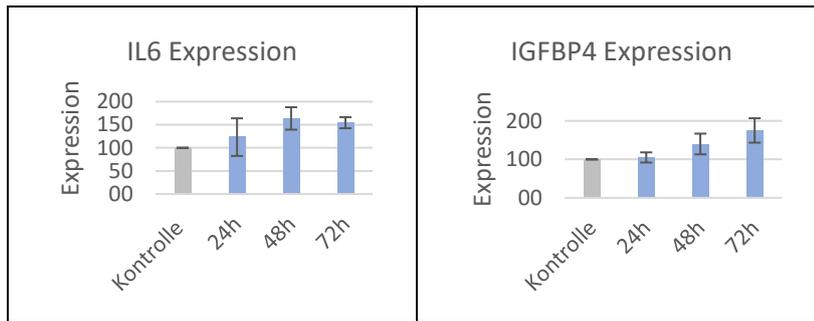


Abbildung 5: IL6 und IGFBP4 Genexpression der PSC (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung) aus Ko-Kultur mit KPC im Vergleich zu Kontroll-PSC (Kontrolle je 24 h/48 h /72 h); Ordinate: Expression (Zahlenwert der PCR-Analyse, Comperative Quantification); Abszisse: Zeitpunkte

Notwendigerweise mussten für den Vorversuch einige wenige Gene für die qPCR ausgewählt werden, um die Vorarbeit in einem sinnvollen Maß zu halten. Die Selektion wurde basierend auf Literaturrecherche unter dem Aspekt der inflammatorischen Wirkung von Genen vorgenommen. Diese Selektion war aber nur eingeschränkt erfolgreich, da einige der geprüften Gene nicht signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Es wurden schließlich die Zeitpunkte 24 h und 72 h für künftige Experimente ausgewählt, da von diesen beiden Zeitpunkten der größte Unterschied der Genexpression zu erwarten war. Auch wenn die Vorversuche nur zum Teil erfolgreich waren, konnten signifikante Unterschiede der Genexpression in den RNA-Sequenzierungsdaten festgestellt und damit der gewünschte zeitliche Verlauf abgebildet werden. Der Zeitpunktversuch wurde mit dem Modell der Standard-Ko-Kultur durchgeführt und die ermittelten Zeitpunkte auf die anderen Modelle angewendet. Für Inverse-Ko-Kultur-Modelle ist von einer guten Vergleichbarkeit bei ähnlichem Verhalten und Kulturbedingungen der PSC in 2D-Kultur auszugehen.

4.2 Reinheit und zellspezifische Charakteristika der PSC-Kulturen

4.2.1 Morphologie der PSC im Verlauf der Zeit nach Isolation

Um die Reinheit der isolierten PSC bestätigen zu können, wurden die Zellen nach der Isolation in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch beurteilt und ihr Zustand fotografisch dokumentiert (Abbildung 6A-D). So weisen die PSC kurz nach der Isolation eine rundliche Form und noch reichlich Lipid-Droplets im Zytoplasma auf die mit zunehmender Zeit in Kultur verschwinden. Die Ausbildung langer, sternförmiger Zellfortsätze und eine wesentlich höhere Proliferationsrate charakterisieren PSC nach dem ersten Passagieren [14]. Aufgrund dieser morphologischen Beobachtungen kann von einer hohen Reinheit der isolierten Kulturen ausgegangen werden.

4.2.2 Färbungen von PSC auf Zellkultureinsatz-Membran

Bei der Kultivierung der PSC auf der Membran von Zellkultureinsätzen waren vereinzelte, kugelartige Formationen beobachtbar (Abbildung 7A). Nach Fixierung und Oil Red-O Färbung der PSC direkt auf der Membran stellen sich die Kügelchen als leuchtend rote Strukturen in der Färbung dar, was ihren Lipid-Gehalt bestätigt (Abbildung 7B, C). Dazwischenliegende Zellen, die die Mehrheit der Kultur bildeten, weisen jedoch keine deutliche Anfärbung von Lipid Droplets im Zytoplasma auf. Dies stützt die These, dass sich die Zellen auf der Oberfläche in 2D-Kultur in einem aktiven Zustand befinden. Da dieses Phänomen sowohl bei behandelten PSC, als auch bei Kontroll-PSC auftrat, ist hier nicht von einer Verursachung durch die Tumorzellen, sondern eher von einem Zell-spezifischen Verhalten auszugehen.

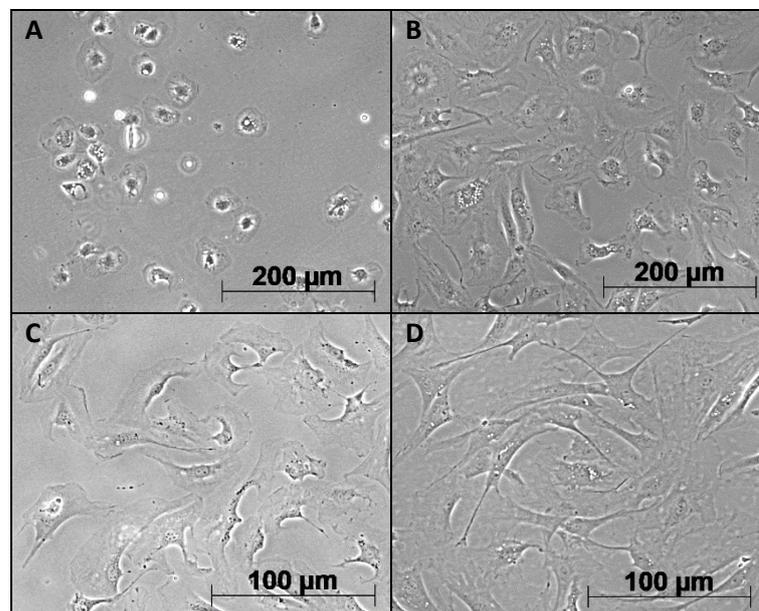


Abbildung 6: PSC in 2D-Kultur im Verlauf der Zeit nach der Isolation; A: PSC 1 d nach Isolation, 10-fache Vergrößerung; B: PSC 2 d nach Isolation, 10-fache Vergrößerung; C: PSC 3 d nach Isolation, 20-fache Vergrößerung; D: PSC 6 d nach Isolation, Passage 1, 20-fache Vergrößerung

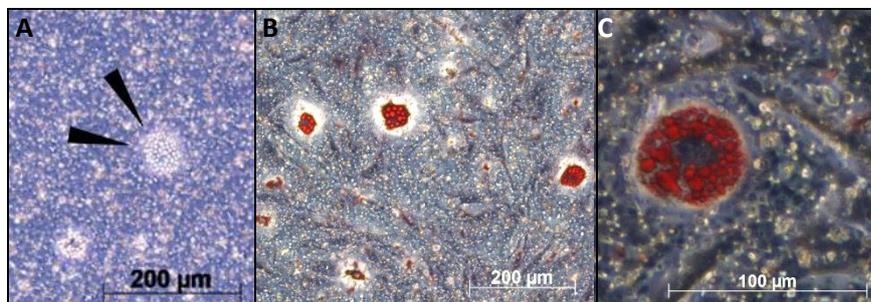


Abbildung 7: PSC auf Zellkultureinsatzoberfläche (Porengröße 1 µm), A: PSC ungefärbt, Kugelbildung sichtbar (schwarze Pfeile), Zellen kaum sichtbar, 10-fache Vergrößerung; B: Kugelgebilde nach Oil Red-O Färbung rot angefärbt, PSC-Zellkörper im Zwischenraum sichtbar, 10-fache Vergrößerung; C: Kugelgebilde nach Oil Red-O Färbung rot angefärbt, 40-fache Vergrößerung

4.2.3 Immunzytochemische Färbungen von 2D-PSC

Um die Reinheit nach der Isolation und das Vorliegen zellspezifischer Marker zu überprüfen, wurden diverse immunzytochemische Färbungen der PSC angefertigt.

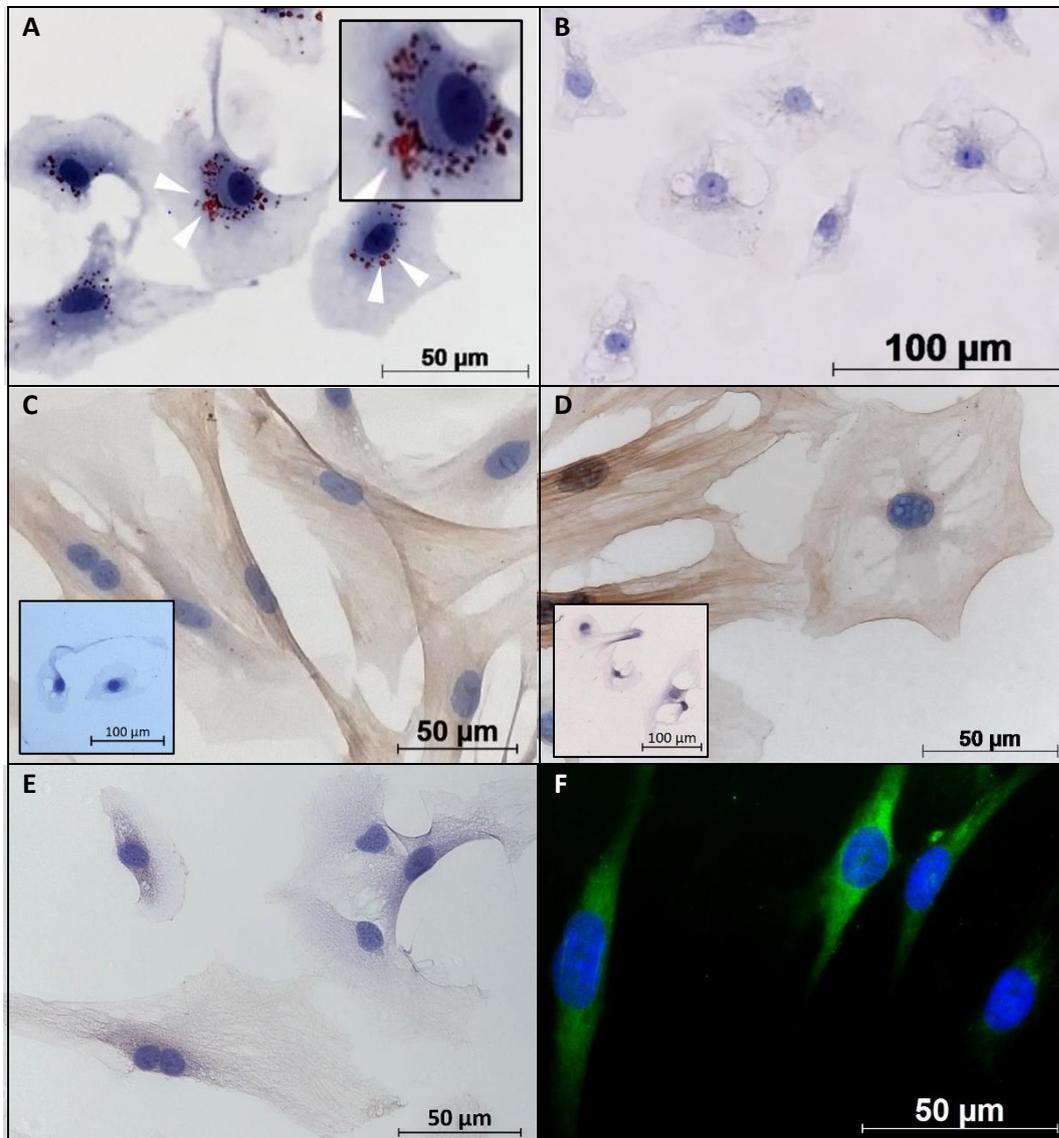


Abbildung 8: Immunzytochemische Färbung der PSC, A: positive Oil Red-O Färbung mit Lipid Droplets in rot (weiße Pfeile), Bildausschnitt: Vergrößerung; B: negative Anti-CK19 Färbung; C: positive Anti-Vimentin Färbung, Bildausschnitt: Negativkontrolle (1xPBS); D: positive Anti- α SMA Färbung, Bildausschnitt: Negativkontrolle (1xPBS); E: teilweise positive Anti-FAP Färbung; F: positive Anti-GFAP Fluoreszenzfärbung (grün), Kerne (blau): DAPI; alle Aufnahmen 40-fache Vergrößerung

Eine Oil-Red O Färbung, bei der Lipide rot angefärbt werden, zeigt gut die charakteristischen Lipid Droplets der PSC im Zytoplasma (Abbildung 8A). Färbungen auf Cytokeratin 19 (CK19), das als typischer epithelialer Marker von duktalem Zellen des Pankreas exprimiert wird [50], wurden durchgeführt, um eine Bestätigung der Reinheit der Kultur zu erhalten. Die Färbung frisch isolierter, direkt nach der Isolation auf OT angesäeter PSC auf CK19 ist negativ (Abbildung 8B),

sodass von einer hohen Reinheit der Kulturen ausgegangen werden kann. Die Identität der PSC sollte mit dem immunhistochemischen Nachweis bekannter PSC-Marker wie Vimentin, α -SMA, GFAP [51] und FAP [17] weiter bestätigt werden. Die Färbungen der PSC auf Vimentin (Abbildung 8C), α -SMA (Abbildung 8D) und den PSC spezifischen Marker GFAP (Abbildung 8F) zeigen wie erwartet ein positives Ergebnis. Einige PSC zeigen ebenfalls ein positives Ansprechen auf FAP (Abbildung 8E).

4.3 Immunzytochemische Färbungen der 3D-PSC

Erstmalig wurden PSC in 3D-Levitation aufbereitet und immunzytochemisch gefärbt. Hierfür wurden sich seit 24 h beziehungsweise 6 d in Levitation befindliche PSC fixiert und gefärbt. Die Auswahl dieser Zeitpunkte erlaubte das Verhalten der PSC in Levitation sowohl zu Beginn, als auch über einen längeren Zeitraum hinweg auf immunhistochemischer Ebene untersuchen zu können. Es kann gezeigt werden, dass die makroskopisch (Abbildung 1C) und lichtmikroskopisch (Abbildung 1D) sichtbare Cluster-Bildung der levitierten PSC auch auf mikroskopischer Ebene in fixierter Form (Abbildung 9A-D) noch nachgewiesen werden kann. Hierbei werden von den Zellen je nach eingesetzter Zellzahl Stränge, netzartige Geflechte, aber auch kugelförmige Gebilde geformt (Abbildung 9A-D). Bei Verwendung einer größeren Start-Zellzahl, wie sie schließlich auch für die Ko-Kulturen zum Einsatz kam, ist vor allem die Bildung großer, kugelförmiger Gebilde zu beobachten (Abbildung 10F). Makroskopisch konnte bei levitierten PSC in Kultur die mittige Ausbildung einer zentralen Kugel mit einigen sie umringenden kleineren „Satelliten“-Kugeln beobachtet werden. Der Durchmesser der Strukturen der levitierten PSC betrug je nach Zellzahl etwa 80 - 200 μ m. Dieses Verhalten der PSC in 3D-Kultur ist auch für andere Zellen, die sich in Sphäroid-Formationen befinden, beschrieben worden. Es wird vermutlich einerseits durch die Expression von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen und andererseits durch das Magnetfeld unterstützt und ermöglicht [29]. Die für magnetische 3D-Kultur beschriebene Sezernierung von EZM [31], kann aufgrund des Eindrucks eines vorliegenden Zellverbandes in lichtmikroskopischen Aufnahmen auch für PSC in Levitation optisch bestätigt werden. Das Vorliegen von Lipid-Droplets, als Kennzeichen ruhender PSC, wurde mithilfe der Oil Red-O Färbung untersucht [14]. Sowohl bei 24 h levitierten PSC als auch bei 6 d levitierten PSC können diese nachgewiesen werden (Abbildung 9B, C, D). Weitere immunzytochemische Färbungen der 24 h beziehungsweise 6 d levitierten 3D-PSC mit spezifischen Zellmarkern wie FAP und α -SMA sollten einen tieferen Einblick in das Verhalten der PSC in magnetischer Levitation geben. Die 3D-PSC erweisen sich in der Färbung mit FAP, einem Marker der Fibroblastenaktivierung [17], anders als Färbungen der PSC der 2D-Kultur, in denen ein positives Ansprechen der Zellen gezeigt werden kann (Abbildung 10C), sowohl nach 24 h, als auch nach

6 d in Levitation als negativ (Abbildung 10A, B). Die sichtbaren, bräunlichen Partikel, die zunächst ein fälschlicherweise positives Färbeergebnis vermitteln könnten, werden hierbei als NanoShuttle™ identifiziert. Es ist bereits bekannt, dass PSC im Rahmen einer 3D-Kultivierung mithilfe von Matrigel einen inaktiven Phänotyp annehmen, in dem sie eine geringe α -SMA Expression aufweisen [16]. Daher wurden zum Nachweis der Inaktivität der 3D-PSC in magnetischer Levitation Anti- α -SMA Färbungen durchgeführt. Hierbei kann im Vergleich von 2D-PSC zu 3D-PSC eine Reduktion der Positivität gezeigt werden (Abbildung 10D-F). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass sich PSC in magnetischer Levitation in einem ruhenden Zustand befinden. Die für immunhistochemische Färbungen eingesetzte Zellzahl der 3D-PSC war geringer als die in den späteren Ko-Kulturen eingesetzte Zellzahl, sodass hier die Sphäroide kleiner als in der letztendlichen Ko-Kultur sind. Nachträglich wurde die Zellzahl in den Ko-Kulturen erhöht, um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erzielen.

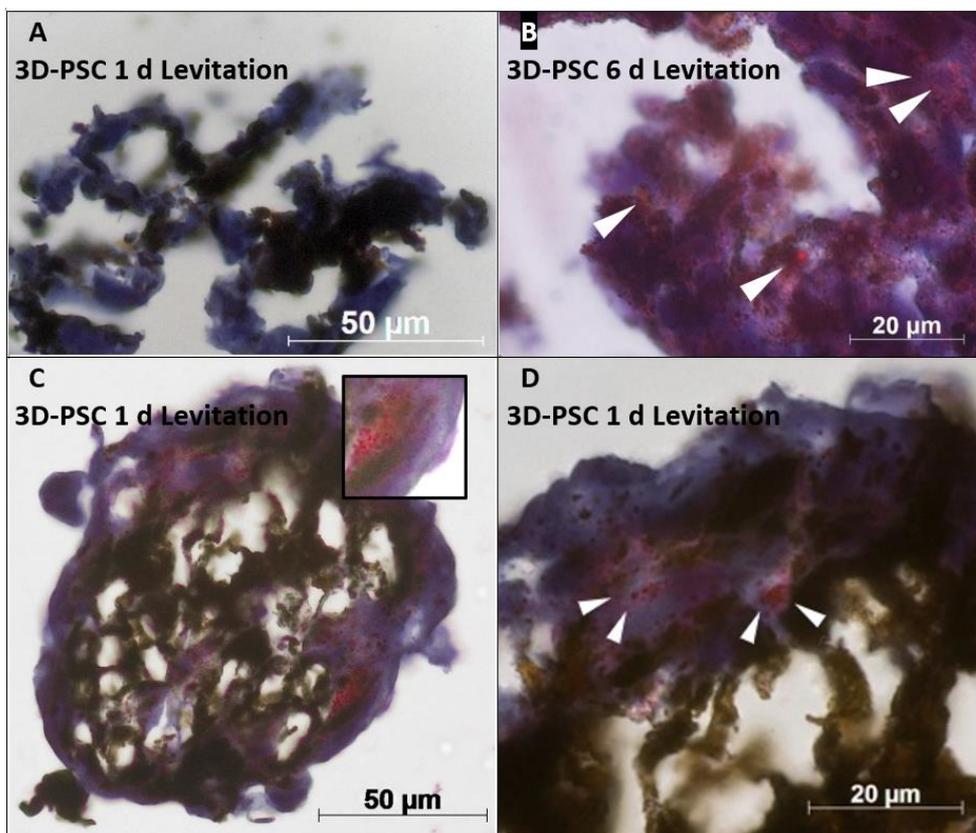


Abbildung 9: positive Oil-Red O Färbung der 24 h beziehungsweise 6 d levitierten 3D-PSC; A: 24 h Levitation, Übersichtsaufnahme, Formation von Clustern und Strängen sichtbar, 40-fache Vergrößerung; B: PSC 6 d Levitation, Kugel/Ring-Bildung, Lipid Droplets in rot sichtbar, 100-fache Vergrößerung; C: 24 h Levitation, PSC Kugelgebilde, 40-fache Vergrößerung; D: 24 h Levitation, Ausschnitt aus Aufnahme C, Lipid Droplets in rot sichtbar (weiße Pfeile), 100-fache Vergrößerung, C-D: Aufnahme in Z-Stapel Verarbeitung; Die Bildqualität wird teilweise durch das Vorhandensein der bräunlichen NanoShuttle™-Partikel beeinträchtigt.

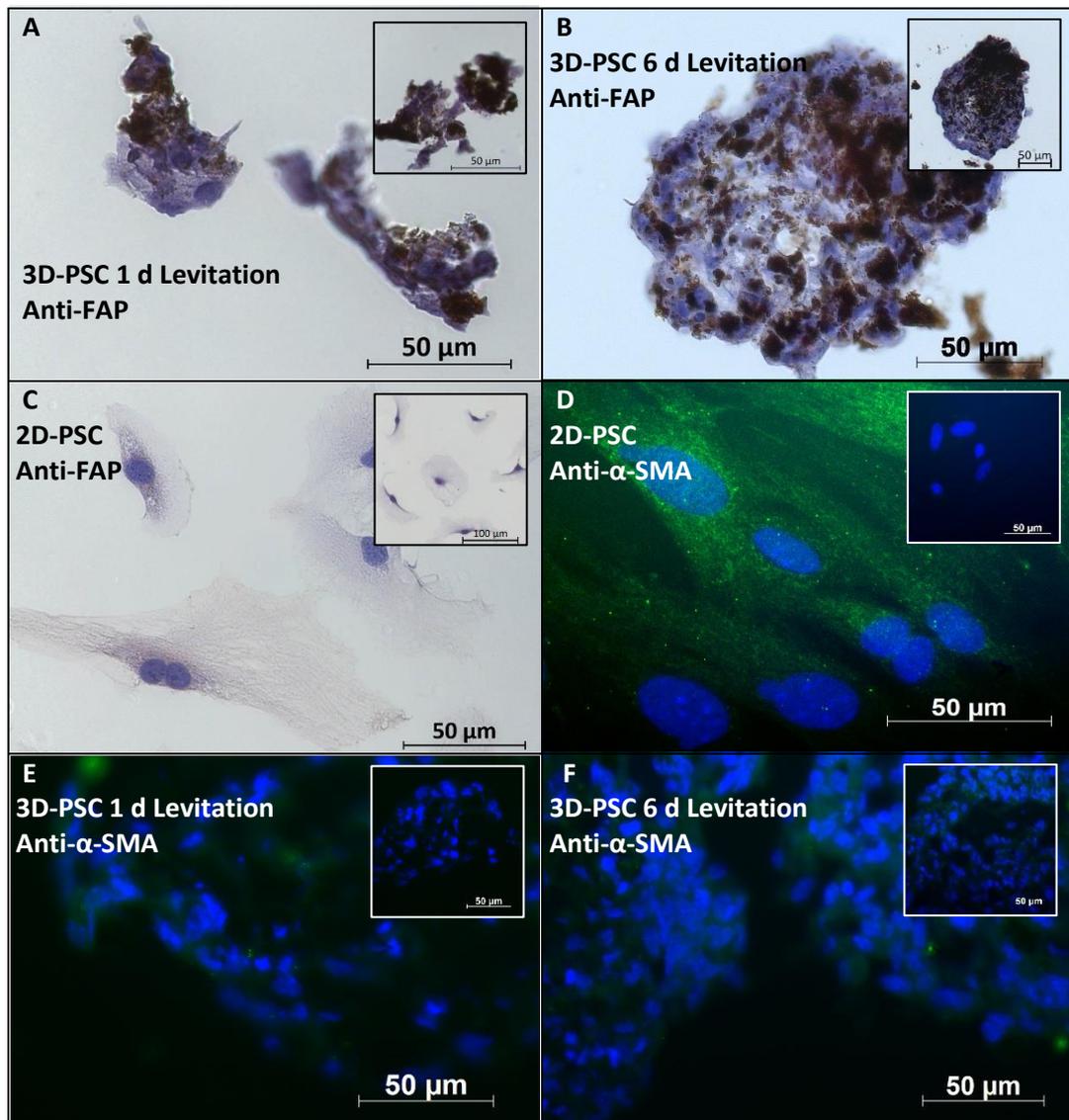


Abbildung 10: Immunzytoschemische Färbungen von 3D-PSC unterschiedlicher Levitationsdauer und 2D-PSC; A: 24 h levitierte PSC, negative Anti-FAP Färbung; B: 6 d levitierte PSC, negative Anti-FAP Färbung (bräunliche Partikel: NanoShuttle™); C: 2D-PSC, teils positive Anti-FAP Färbung; D: 2D-PSC, positive Anti- α -SMA Fluoreszenzfärbung; E: 24 h levitierte PSC, negative Anti- α -SMA Fluoreszenzfärbung; F: 6 d levitierte PSC, negative Anti- α -SMA Fluoreszenzfärbung; alle Aufnahmen 40-fache Vergrößerung; Fluoreszenzfärbungen: Antikörper (grün), Kerne (blau): DAPI; Bildausschnitte: Negativkontrollen (1x PBS)

4.4 Immunzytochemische Färbungen KC-, KC921- und KPC-Zellen

Des Weiteren wurden immunzytochemische Färbungen aller verwendeten Tumorzellen auf die Marker CK19 und E-Cadherin durchgeführt, um ihren epithelialen Ursprung zu bestätigen. So werden die genannten Proteine beispielsweise nicht von Azinus- und Inselzellen des Pankreas exprimiert [52; 53]. Wie erwartet, zeigen sowohl duktale KC-Zellen (Abbildung 11E, F), als auch KPC-Zellen (Abbildung 11A, B) und KC921-Zellen (Abbildung 11C, D) ein positives Ansprechen auf beide Antikörper. Des Weiteren ist das typische pflastersteinartige Wachstum [50] der

duktalen KC-Zellen zu erkennen (Abbildung 11E, F). KPC und KC921-Zellen zeigen ein für Tumorzelllinien charakteristisches gedrängtes, dichtes Wachstumsmuster (Abbildung 11A-D).

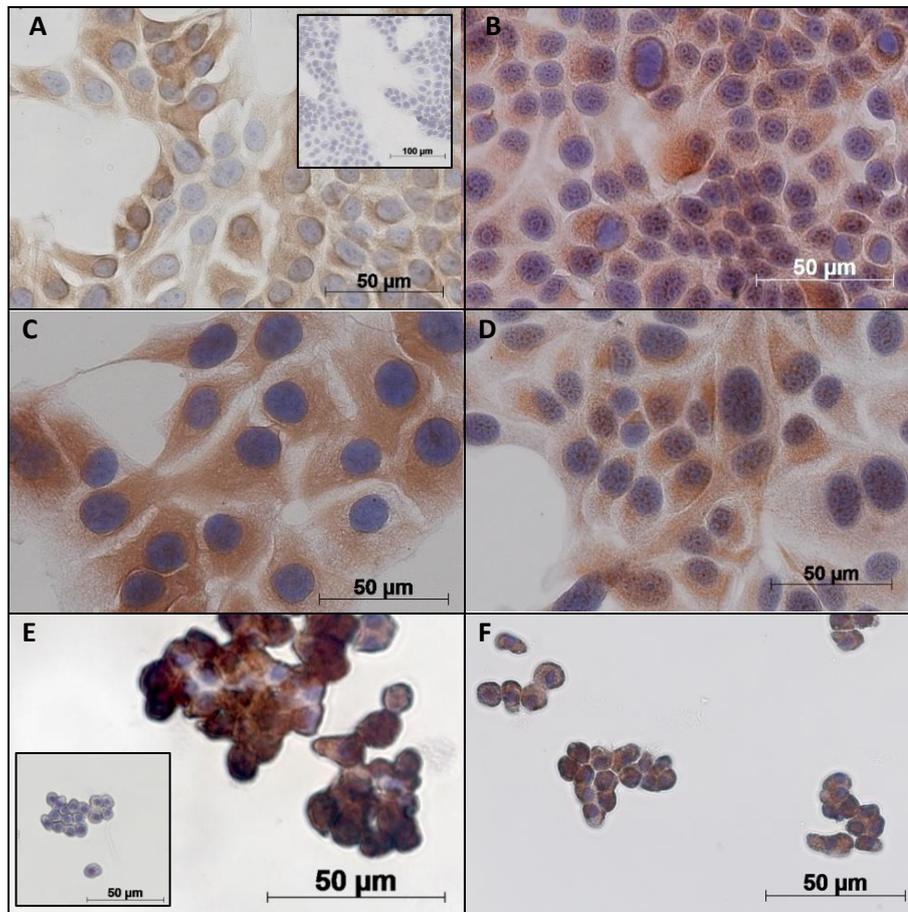


Abbildung 11: Immunzytochemische Färbungen KPC-, KC- und KC921-Zellen; A: positive Anti-CK19 Färbung der KPC-Zellen; B: positive Anti-E-Cadherin-Färbung der KPC-Zellen; C: positive Anti-CK19 Färbung der KC921-Zellen; D: positive Anti-E-Cadherin-Färbung der KC921-Zellen; E: positive Anti-CK19 Färbung KC-Zellen; F: positive Anti-E-Cadherin Färbung KC-Zellen; alle Aufnahmen 40-fache Vergrößerung; Bildausschnitte: exemplarische Negativkontrollen (1xPBS)

4.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Inversen-Ko-Kultur

Elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Inversen-Ko-Kultur-Modells mit auf der Oberfläche wachsenden PSC und auf der Unterseite der Membran wachsenden KPC-Zellen wurden durchgeführt. Die Morphologie der Zellen, sowie das Proliferationsmuster und die Lokalisation auf der Membran können so beurteilt werden. Aufnahmen wurden mit Einsätzen der Größen 0,4 µm, 1 µm und 3 µm durchgeführt. PSC zeigen wie erwartet ein flaches, ausgedehntes Wachstumsverhalten und lang gezogene Zellkörper, die KPC-Zellen imponieren hingegen mit einem dicht gedrängtem Wachstum und eher kubischem Aussehen (Abbildung 12). In den Übersichtsaufnahmen des Membran-Längsschnitts lässt sich zudem das direkte gegenüberliegende Wachstum der beiden Zelltypen und das Vorkommen von Poren bestätigen (Abbildung 12).

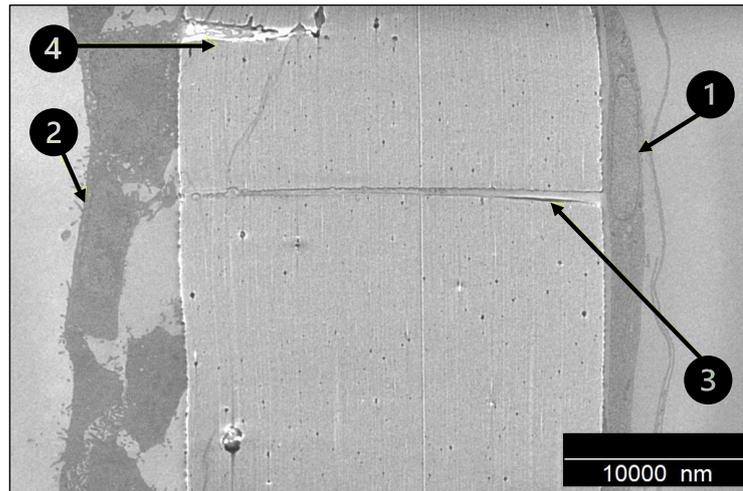


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Übersicht PSC auf Thin Cert®-Oberfläche und KPC auf Thin Cert®-Unterseite mit Porengröße 1 μm ; 1: PSC; 2: KPC-Zelle; 3: Pore im Längsschnitt; 4: Teilweise angeschnittene Pore mit eingewachsener KPC-Zelle, Aufnahme: G. Hause

Besonders von Interesse ist ein potenziell stattfindendes Einwachsen der Zellen in die Poren. Bei Einsätzen mit 0,4 μm Porengröße ist kein Vordringen der Zellen, weder KPC-Zellen noch PSC, in die Poren zu beobachten. Die Aufnahmen zeigen, dass auch bei Zellkultureinsätzen mit 1 μm Porengröße nach insgesamt 72 h gemeinsamer Inkubation kein direkter Zell-Zell-Kontakt der KPC-Zellen mit den PSC beobachtet werden kann. Sowohl bei den Einsätzen mit 1 μm , als auch mit 3 μm Porengröße wird jedoch ein Einwachsen der PSC und KPC-Zellen in die Poren beobachtet (Abbildung 13A). Hierbei zeigen die KPC-Zellen bei Einsätzen mit 1 μm Porengröße jedoch eine deutlich stärkere Tendenz in die Poren einzuwachsen als PSC. PSC finden sich hier meist über die Poren hinweg aufgespannt, es ist lediglich ein leichtes Einsinken der Zellkörper über den Poren festzustellen (Abbildung 13B). Das Verhältnis von einwachsenden PSC zu KPC ist bei Einsätzen mit 3 μm Porengröße unerwarteterweise ausgewogen. Bei Einsätzen mit 3 μm Porengröße kann ein direkter Zell-Zell-Kontakt der PSC mit KPC-Zellen nicht nur in den Poren, sondern sowohl auf der Ober- und Unterseite des Einsatzes festgestellt werden. Hierbei befinden sich sowohl ursprünglich auf der Oberseite angesäte PSC nun auf der Unterseite der Membran, als auch umgekehrt ursprünglich auf der Unterseite der Membran angesäte KPC-Zellen auf der Oberseite des Einsatzes (Abbildung 13C), was eine Migration der Zellen auf die andere Seite eindeutig bestätigt.

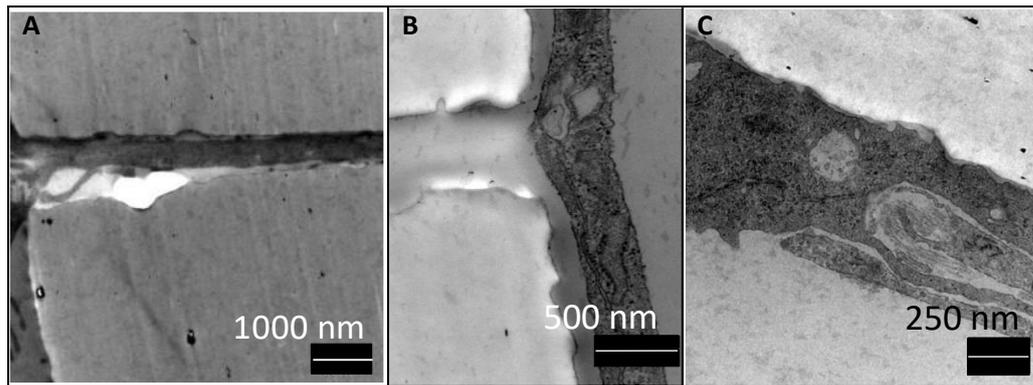


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen, A: in Pore einwachsende KPC-Zelle auf Thin Cert® Unterseite (Porengröße 1 µm); B: auf Pore aufliegende PSC auf Thin Cert®-Oberfläche (Porengröße 1 µm); C: PSC (rechts) und KPC (links) wachsen gemeinsam auf Thin Cert®-Oberfläche mit Porengröße 3 µm, Aufnahmen: G. Hause

Abschließend lässt sich feststellen, dass bei den verwendeten Zellkultureinsätzen mit 1 µm Porengröße und bei der gewählten Zeitspanne der Ko-Kultur-Experimente mit einem maximalen gemeinsamen Inkubationszeitraum von 96 h ein direkter Zell-Zell-Kontakt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Die Zellen stehen folglich bei den durchgeführten Inversen-Ko-Kultur-Modellen (Abbildung 2C), weiterhin nur über lösliche Faktoren im Austausch, ein deutlicher Unterschied zu der ersten Ko-Kultur-Variante (Abbildung 2A) ist jedoch die unmittelbare Nähe. So ist die Distanz der Zellen in der Inversen-Ko-Kultur im Vergleich zur Standard-Ko-Kultur circa um den Faktor 1000 vermindert (2,5 µm vs. 2,5 mm).

4.6 RNA-Sequenzierung

4.6.1 Beurteilung der RNA-Ausbeute

Um eine Aussage über eventuelle Unregelmäßigkeiten oder Auffälligkeiten im Experiment treffen zu können, wurde vor den weiteren durchgeführten Qualitätskontrollen die RNA-Ausbeute der einzelnen PSC-Proben betrachtet (Abbildung 14). Die RNA-Ausbeute einer Probe verhält sich je nach Ko-Kultur-Modell und Zeitpunkt unterschiedlich. Hierbei ist zu beachten, dass die Startzellzahl mit $5 \cdot 10^5$ Zellen bei den 3D-Kultur-Modellen von der der anderen Modelle mit $1 \cdot 10^5$ Zellen abwich (siehe Kapitel 3.2.4). Bei den Standard- und Inversen-Ko-Kultur-Modellen zeichnet sich eine höhere gemittelte Ausbeute der behandelten Proben im Vergleich mit den Kontroll-Proben ab. Auffallend ist eine steigende Tendenz der Ausbeute der behandelten Proben von 24 h zu 72 h bei allen Ko-Kulturen außer der magnetischen Ko-Kultur. Bei der magnetischen Ko-Kultur reduziert sich die Ausbeute vom Zeitpunkt 24 h auf 72 h um circa die Hälfte. Dies gilt sowohl für die behandelten Proben als auch für die Kontroll-Proben (Abbildung 14). Mögliche Gründe hierfür werden in Kapitel 5.2.2 diskutiert.

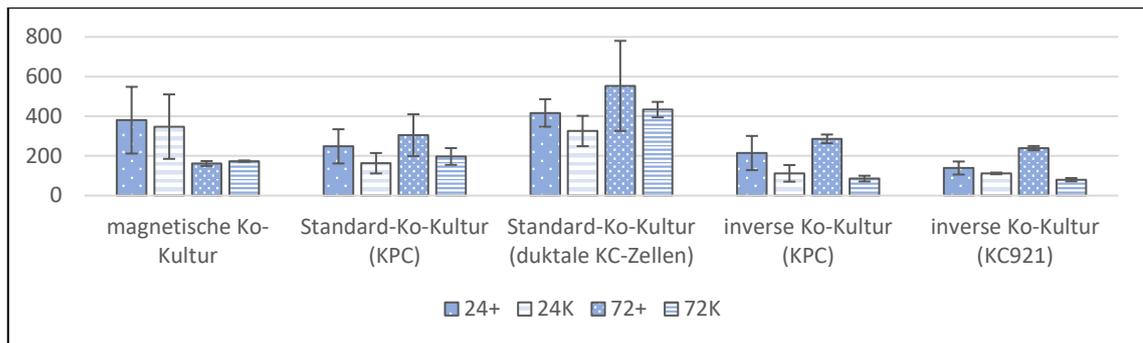


Abbildung 14: RNA-Ausbeute der PSC ($n = 3$, Mittelwerte mit Standardabweichung) aller Ko-Kultur-Modelle zu 24 h/ 72 h; Ordinate: RNA-Ausbeute in $\text{ng}/\mu\text{l}$, Abszisse: verschiedene Ko-Kultur-Modelle, Säulen eines Modells v. l. n. r.: 24 h behandelt (24+, gepunktet), 24 h Kontrolle (24K, gestreift), 72 h (72+, eng gepunktet) behandelt und 72 h Kontrolle (72K, eng gestreift)

4.6.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle der Daten und des Alignments

Zur Beurteilung der Qualität der Sequenzierungs-Daten wird die Fehlerrate der Sequenzierung, die CG Content distribution sowie die Qualität der reads herangezogen. Die Fehlerrate einer einzelnen Base, die $< 1\%$ sein sollte, liegt bei allen Proben unter $0,03\%$. Das Verhältnis aller sequenzierten Basen von G zu C beziehungsweise A zu T ist ausgeglichen. Bei allen Proben liegen nach der Filterung der Daten $> 99\%$ Clean reads vor. Die Qualität des Mappings wird anhand der Werte der Total mapped reads or fragments und Multiple mapped reads or fragments bewertet. Der Anteil der Total mapped reads or fragments, der $> 70\%$ aller Clean reads ausmachen sollte, liegt bei allen sequenzierten Proben $> 90\%$. Die Zahl der Multiple mapped reads or fragments, die $> 10\%$ sein sollte, beträgt bei allen sequenzierten Proben maximal $5,83\%$. Die Verteilung der reads im Referenzgenom ist, wie bei einem bekannten Standard-Referenzgenom gewünscht, zum überwiegenden Teil exonic (mindestens $> 82,85\%$) und nur zu einem kleinen Teil intronic oder intergenic. Somit haben die vorliegenden Daten eine hohe Qualität.

4.6.3 Korrelation der Proben untereinander

Um einen Überblick über die Homogenität aller Proben und Aussagekraft der einzelnen Proben zu erhalten, wurde die Gesamtanzahl der exprimierten Gene (Schwellenwert FPKM > 1) jeder Probe herangezogen. Im Mittel werden von einer Probe 12766 ($\sigma \approx 250$) Gene exprimiert. Um die Ähnlichkeit der biologischen Replikate und die Ähnlichkeit der Proben zueinander zu überprüfen, wurden alle Proben miteinander mithilfe des Pearson-Koeffizienten korreliert. Idealerweise sollten die Werte des Pearson-Korrelations-Koeffizienten eines biologischen Replikats zwischen $0,92$ - $0,98$ liegen [54]. Der gemittelte Pearson-Korrelations-Koeffizienten der jeweiligen biologischen Replikate aller Modelle beträgt $0,93$ ($\sigma \approx 0,05$). Bei der Betrachtung der Korrelation aller Proben zueinander fällt eine Abweichung der Proben der 3D-Ko-Kulturen von

denen der Standard- und 2D-Ko-Kulturen auf. Mehrere Principal Component Analysen (PCA), die das Ziel haben einen großen Datensatz möglichst übersichtlich bei möglichst geringem Informationsverlust zu visualisieren [55], wurden durchgeführt. Die PCA der Proben aller Modelle bestätigt die deutliche Gruppierung von 2D- und 3D-Ko-Kulturen (Abbildung 16).

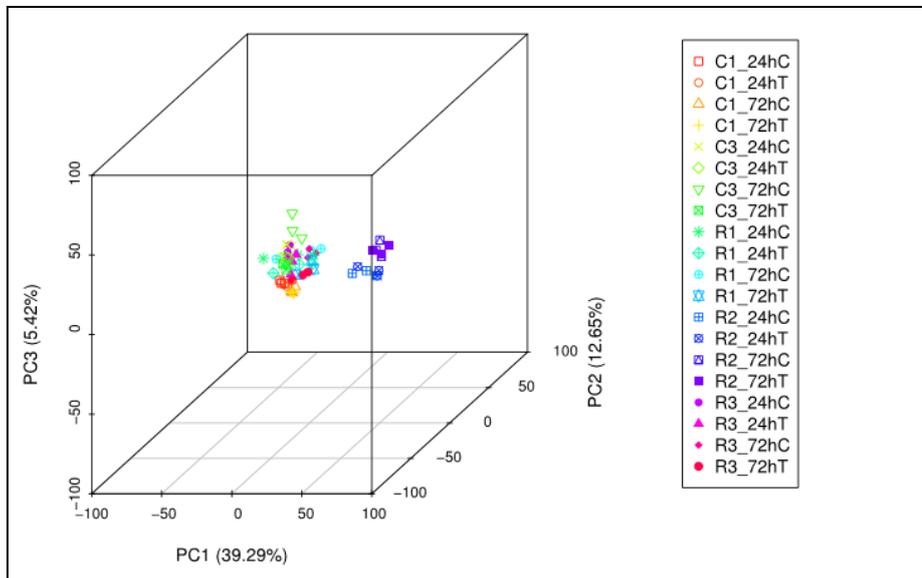


Abbildung 15: Principal Component Analysen (PCA); A: PCA aller Ko-Kultur-Modell-Gruppen mit Behandlungs- (T), als auch Kontroll-Gruppen(C) zu den jeweiligen Zeitpunkten (24 h und 72 h); alle biologischen Replikate wurden jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst; C1: Standard-KC-Ko-Kultur; C3: Inverse- KC921-Ko-Kultur; R1: Standard-KPC-Ko-Kultur; R2: 3D- KPC-Ko-Kultur; R3: Inverse-KPC-Ko-Kultur; Analyse: Novogene

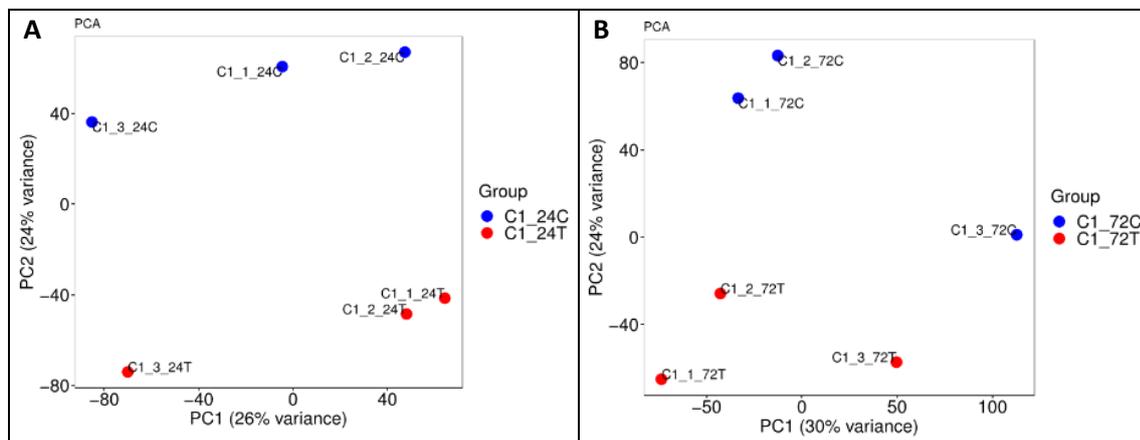


Abbildung 16: Principal Component Analysen (PCA), A: PCA Standard-Ko-Kultur mit KC-Zellen zu 24 h, Kontroll-Gruppen (C) blau, Behandlungs-Gruppen (T) rot; B: PCA Standard-Ko-Kultur mit KC-Zellen zu 72 h, Kontroll-Gruppen (C) blau, Behandlungs-Gruppen (T) rot, Analysen: M. Gläß

PCAs mit allen Replikaten der einzelnen Modelle zu einem Zeitpunkt erlauben Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit der einzelnen Replikate zueinander. So zeigten die Proben der 3D-Kulturen insgesamt eine stärkere Heterogenität als die der 2D-Kulturen, bei denen überwiegend eine Gruppierung der Proben hinsichtlich Behandlung vs. Kontrolle festzustellen ist (Abbildung 16).

4.6.4 Quantitative Expression von epithelialen und Fibroblasten-Markern

Um die Reinheit der verwendeten PSC nicht nur immunhistochemisch (siehe Kapitel 4.2.3), sondern auch auf RNA-Ebene zu validieren, wurde die Expression von charakteristischen Genen über die Betrachtung der quantitativen Expression mittels der FPKM der einzelnen Proben überprüft. Der Schwellenwert ab dem ein Gen als exprimiert gilt ist auf FPKM > 1 festgelegt. So werden die Marker Vimentin, α -SMA und Desmin als PSC-typische Marker von allen Proben exprimiert [51]. Ubiquitär nicht exprimiert werden hingegen die epithelialen Marker EpCAM und E-Cadherin. Auch eine Reinheit der PSC auf RNA-Ebene kann so bestätigt werden.

4.6.5 Überblick der differentiellen Genexpressionsanalyse aller Modelle

Die Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene einer mit Tumorzellen behandelten Probe hängt wesentlich vom verwendeten Ko-Kultur-Modell und dem betrachteten Zeitpunkt ab. So liegt die Summe der signifikant differenziell exprimierten Gene in einem Bereich von einem Gen (3D-Ko-Kultur-Modell 72 h) bis hin zu 3595 Genen (Inverse-Ko-Kultur-KC921 72 h). Die höchste Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene weisen hierbei die Inversen-Ko-Kultur-Modelle auf, gefolgt von den Standard-Ko-Kultur-Modellen und abschließend dem 3D-Ko-Kultur-Modell (Abbildung 17). Es ist bei allen Modellen eine Zunahme der unterschiedlich exprimierten Gene im Verlauf der Zeit von 24 h zu 72 h zu beobachten.

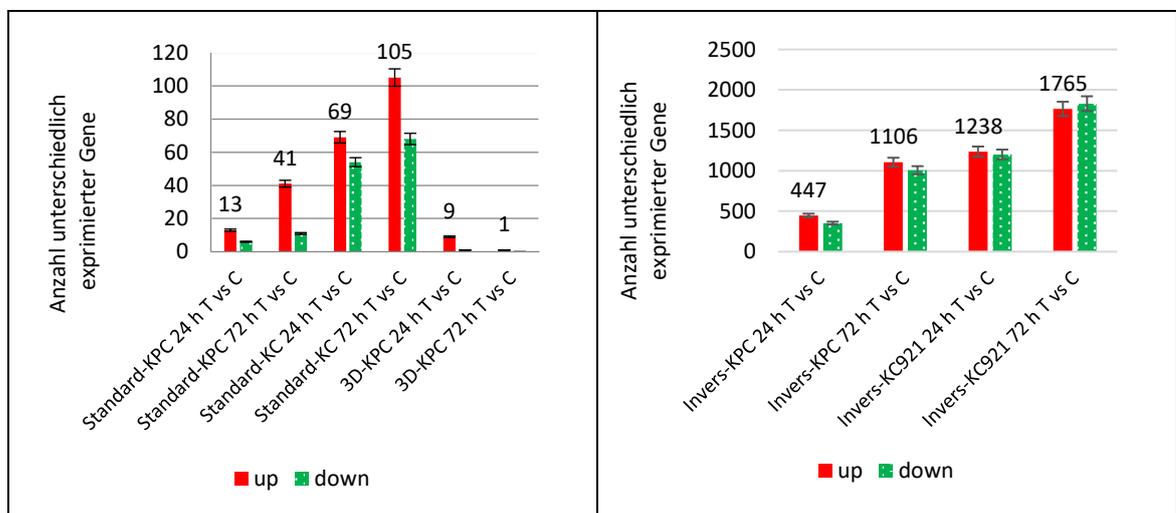


Abbildung 17: Anzahl differenziell exprimierter Gene in den Ko-Kultur Modellen im Vergleich behandelte- vs. Kontroll-PSC; Ordinate: Anzahl unterschiedlich höher (rot)/ niedriger (grün gepunktet) exprimierter Gene; Abszisse: Vergleichsgruppen behandelter PSC (T) vs. Kontroll-PSC (C) der Ko-Kultur-Modelle je zu 24 h und 72 h; $p_{adj} < 0.05$; $|\log_2 \text{fold change}| \geq 0$

Des Weiteren wurde die Anzahl der Gene betrachtet, die sowohl bei 24 h, als auch bei 72 h in einem Modell im jeweiligen Vergleich zur Kontrolle signifikant unterschiedlich exprimiert wurden. Einen Überblick über diese Schnittmengen können Venn-Diagramme geben

(Abbildung 18). Die Schnittmenge der geteilten Gene an beiden Zeitpunkten, bezogen auf die Gesamtheit der unterschiedlich exprimierten Genen an beiden Zeitpunkten, liegt mit 25 % bei dem Inversen-Ko-Kultur Modell mit KC921-Zellen am höchsten, gefolgt von 16 % bei dem Inversen-Ko-Kultur Modell mit KPC-Zellen, 15 % bei dem Standard-Ko-Kultur-Modell mit duktaalen KC-Zellen und 11 % bei dem Standard-Ko-Kultur-Modell mit KPC-Zellen.

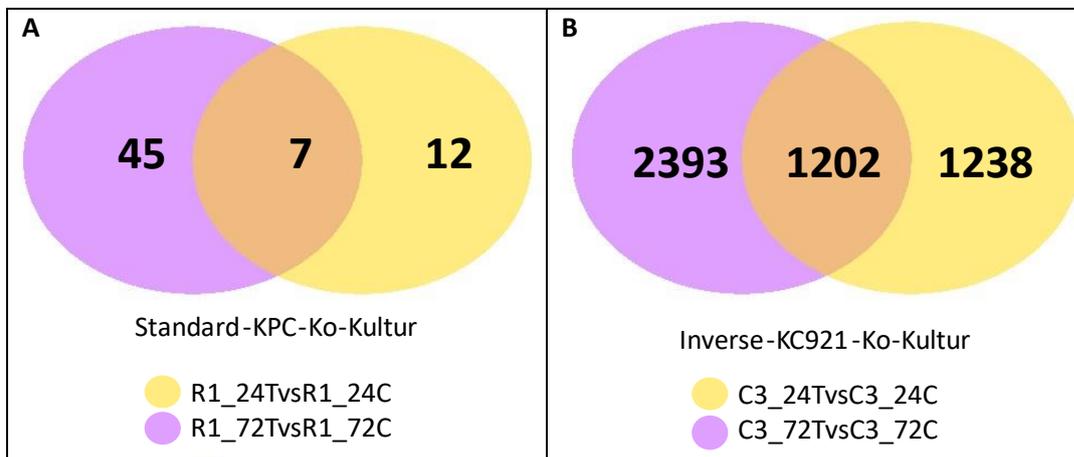


Abbildung 18: Venn-Diagramme mit Vergleich der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene von Behandlung vs. Kontrolle an beiden Zeitpunkten (24 h = gelb, 72 h = lila) beispielhafter Ko-Kultur-Modelle; A: Standard-Ko-Kultur mit KPC-Zellen (R1); B: Inverse-Ko-Kultur mit KC921-Zellen (C3), Analysen: Novogene

4.6.6 Analysen der Standard-Ko-Kulturen

Wie bereits in Kapitel 4.6.5 beschrieben, ist die Anzahl unterschiedlich signifikant exprimierter Gene in den Standard-Ko-Kulturen deutlich geringer als in den Inversen-Ko-Kulturen. Zunächst wurden die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene der differenziellen Genanalyse der Standard-Ko-Kulturen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, also der KPC-Standard-Ko-Kultur und der KC-Standard-Ko-Kultur betrachtet. Dabei wurden sowohl die Stärke der unterschiedlichen Expression der Gene, als auch eine gegebenenfalls vorhandene zeitliche Dynamik der Genexpression als Selektionskriterium für die genauere Betrachtung von Genen angewendet.

In der Standard-KPC-Ko-Kultur treten insgesamt 6 kodierende Gene auf, die zu beiden Zeitpunkten und signifikant stärker im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert werden (VCAN, TNFSF15, STAC2, ACSL4, CHST11). Bei allen diesen Genen liegt entweder ein Anstieg der Expression im Verlauf der Zeit oder eine nahezu gleichbleibende Expression vor (Tabelle 16, Anlagen). Nur ein Gen wird zu beiden Zeitpunkten und signifikant schwächer im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert (CYS1). Hier liegt eine Abnahme der Expression im Verlauf der Zeit vor. Besonders unterschiedlich signifikant exprimierte Gene, die nur zu einem Zeitpunkt

signifikant unterschiedlich exprimiert werden, sind unter anderem MYH2 (Herunterregulation) zum 24 h Zeitpunkt und CHRDL2 zum 72 h Zeitpunkt (Hochregulation).

In der Standard-KC-Ko-Kultur treten insgesamt 29 kodierende Gene auf, die zu beiden Zeitpunkten und signifikant stärker im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert werden. Insgesamt 10 Gene werden zu beiden Zeitpunkten und signifikant schwächer im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert. Eine Auswahl von Genen anhand der unterschiedlichen Stärke der Expression und der zeitlichen Dynamik wurde getroffen (Tabelle 17, Anlagen). Insgesamt fällt in der KC-Ko-Kultur eine schwächere unterschiedliche Expression der Gene als in der KPC-Ko-Kultur auf. Im Vergleich zu den Kontrollen geringer exprimiert werden hingegen Gene wie CX3CL1, die in die Arretierung von malignen Zellen involviert sind [56] oder auch Wachstumsfaktoren wie HGF. Interessanterweise werden teils auch Chemokine und Zytokine wie CXCL12 oder PTN in behandelten PSC geringer exprimiert.

Tabelle 13: Überblick der Anzahl und jeweilige Beispiele der signifikanten Up-/Down-GO-Analysen der BP-Kategorie der KC- und KPC-Standard-Ko-Kultur zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h (n. s. = keine signifikant angereichert)

	24 h Up	24 h Down	72 h Up	72 h Down
KC-Ko-Kultur	5	13	46	n. s.
<i>Beispiele</i>	Positive regulation of protein processing, Regulation of protein maturation	Integrin activation, Positive chemotaxis, Inflammatory response	Tissue remodeling, Cellular response to extracellular stimulus, Positive regulation of secretion	n. s.
KPC-Ko-Kultur	4	n. s.	n. s.	100
<i>Beispiele</i>	Negative regulation of lipid transport, Regulation of calcium ion transport	n. s.	n. s.	Negative regulation of interleukin-6 production, Epithelial cell apoptotic process

Um sich anschließend den involvierten Prozessen auf einer weiteren Ebene annähern zu können, wurden zudem GO-Analysen der KC- und KPC-Standard-Ko-Kultur betrachtet. Die untenstehende Tabelle gibt einen Überblick über die jeweiligen signifikant angereicherten GO-Analysen hoch- oder herunterregulierter Gengruppen der Standard-Ko-Kulturen (Tabelle 13). Bei den KC-GO-Analysen ist ein numerischer Anstieg der signifikanten hochregulierten Prozesse im Verlauf der Zeit zu beobachten, zudem sind spezifische Tumorbindegewebs-assoziierte Prozesse wie „Collagen metabolic process“, „Tissue remodeling“, „Cellular response to extracellular stimulus“ und „Positive regulation of secretion by cell“ zum 72 h Zeitpunkt

hochreguliert. Zu 24 h werden Prozesse wie „Positive chemotaxis“ und „Inflammatory response“ stärker in den Kontroll-PSC angereichert. In den GO-Analysen der KPC-Ko-Kultur sind nur 4 Prozesse zum 24 h Zeitpunkt signifikant hochreguliert, darunter den Lipidstoffwechsel betreffende Vorgänge. Zum 72 h Zeitpunkt hingegen werden 100 Prozesse im Vergleich zu den Kontrollen signifikant geringer exprimiert.

Der Vergleich der Genexpression von Standard-KC- und KPC-Ko-Kultur mittels Venn-Diagramm zeigt keine gemeinsamen Gene zum 24 h Zeitpunkt und 4 gemeinsam exprimierte Gene zum 72 h Zeitpunkt (Tabelle 18, Anlagen). Ein Gen, FREM1, wird zum 24 h Zeitpunkt der KPC- und zum 72 h Zeitpunkt der KC-Ko-Kultur signifikant unterschiedlich exprimiert. Hierbei ist es in der KPC-Ko-Kultur hochreguliert, in der KC-Ko-Kultur hingegen herunterreguliert.

4.6.7 Entwicklung der PSC in 3D-Kultur im zeitlichen Verlauf

Wie Kapitel 3.2.3 beschrieben, wurden PSC mithilfe von magnetischer Levitation in 3D kultiviert. PSC wurden mindestens 24 h vor Experiment-Beginn in Levitation gebracht, um den Prozess einer Inaktivierung vor Experiment-Beginn zu ermöglichen. Daher muss beachtet werden, dass die Zellen sich zu den Zeitpunkten der RNA-Extraktion während dem Experiment insgesamt tatsächlich eine Gesamtzeit von 48 h und 96 h in Levitation befunden haben. Der Einfachheit halber wird im Folgenden trotzdem von den Zeitpunkten 24 h und 72 h gesprochen. Auch wenn angenommen wird, dass PSC sich im Stadium der Levitation aufgrund des mangelnden Kontakts zu einem Zellkulturgefäß in einem inaktiven Zustand befinden, so können sich im Verlauf der 3D-Kultur dennoch diverse zellbiologische Prozesse abspielen. Zunächst wurde daher die Kontrolle der 3D-Kultur zum 24 h Zeitpunkt mit der des 72 h Zeitpunkts verglichen, um Aussagen über das Verhalten der PSC zu verschiedenen Momenten der Levitation treffen zu können. Im Folgenden Kapitel sind zu beiden Zeitpunkten immer ausschließlich die Kontrollen der jeweiligen Zeitpunkte gemeint. Insgesamt werden zwischen den beiden Zeitpunkten 1224 Gene unterschiedlich signifikant differenziell exprimiert. Es wird angenommen, dass Zellen in trägerfreier 3D-Kultur einen zu Beginn lockeren Zellverband durch Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, Produktion von EZM und schließlich durch die Ausbildung von EZM-Zellkontakten im Laufe der Zeit in ein kompaktes Gebilde umwandeln [29]. Für Multizelluläre Sphäroide (MCS) mit Zellen eines hepatozellulären Karzinoms wurde beispielweise zunächst die Expression von Integrinen und anschließend die Bildung von Cadherin-Cadherin Bildungen beschrieben [57]. In den 3D-kultivierten PSC werden sowohl Cadherine, als auch Integrine teilweise zum 24 h Zeitpunkt (CDHR1, PCDHB9, PCDHGA6, ITGAX, ITGA11) oder zum 72 h Zeitpunkt (CDH23, PCDH9, CDH17, CDH13, ITGA2, ITGA2B, ITGA3, ITGB3, ITGB7) stärker exprimiert, sodass nicht von einem Überwiegen einer Gruppe zu einem Zeitpunkt gesprochen werden kann. Allerdings wird in up-

KEGG-Analysen der Signalweg EZM-Rezeptor-Interaktion zum 24 h Zeitpunkt signifikant stärker gegenüber des 72 h Zeitpunkts exprimiert. In der Visualisierung mittels einer Heatmap wird deutlich, dass die im Signalweg relevanten Gene in den 72 h Proben deutlich niedriger exprimiert werden (Abbildung 19A). Diverse Kollagene (COL14A1, COL16A1, COL1A2 u.a.) werden signifikant stärker zum 24 h Zeitpunkt als zum 72 h Zeitpunkt exprimiert. Zum 72 h Zeitpunkt wird unter anderem der Rap1-Signalweg in der up-KEGG-Analyse angereichert (Abbildung 19B).

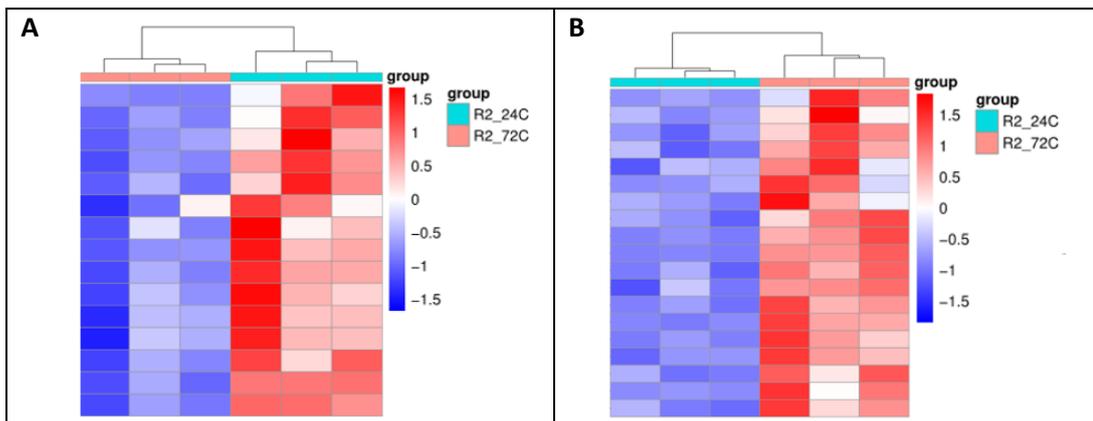


Abbildung 19: Heatmaps der in den KEGG-Analysen angereicherten Signalwege des Vergleichs der jeweils 3 Kontrollen der 3D-Kultur 24 h (R2_24C, grün) vs. 72 h (R2_72C, rosa); A: Genexpression der im Signalweg EZM-Rezeptor-Interaktion angereicherten Gene im Vergleich 24 h vs. 72 h; B: Genexpression der im Rap1-Signalweg angereicherten Gene im Vergleich 24 h vs. 72 h; Farbcodierung (rot-blau) entspricht jeweiligem \log_2 fold change

In GO-BP-Analysen werden einerseits Prozesse wie „Positive regulation of cell migration“ und „Positive regulation of angiogenesis“ stärker zum 72 h Zeitpunkt angereichert, allerdings auch Prozesse wie „Negative regulation of growth“ und „Negative regulation of response to external stimulus“. GO-BP-Analysen ergeben zudem eine signifikante Hochregulation der Prozesse „Response to hypoxia“ und „Response to decreased oxygen levels“ bei 72 h im Vergleich zu 24 h. Neben den Unterschieden der PSC in 3D-Kultur im zeitlichen Verlauf sind jedoch auch besonders die Unterschiede hinsichtlich der 2D-Kultur von Interesse, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

4.6.8 Unterschiede der 2D- und magnetischen 3D-Kultivierung

Um die unterschiedlichen Verhaltensweisen der 2D- und 3D-kultivierten PSC vergleichen zu können, wurden die Kontrollen der 2D- und 3D- Modelle zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h gegenübergestellt. Im Folgenden Kapitel wird nur von 2D- und 3D-Kultur gesprochen, gemeint sind hier immer die Kontrollen der jeweiligen Modelle ohne die Anwesenheit von Tumorzellen. Für die Analysen wurden die Kontrollen beider Versuche mit unterschiedlichen Tumorzellen eines 2D-Modells (Standard oder Invers) zusammengefasst, sodass sich in den Standard und

Inversen-Gruppen 6 Proben und in der 3D-Gruppe 3 Proben ergaben (da die 3D-Kultur-Experimente nur mit einer Zellart durchgeführt wurden). Die Kontrollen der Standard- und Inversen-Ko-Kultur unterscheiden sich faktisch nicht hinsichtlich ihrer Kulturbedingungen, da bei der inversen Ko-Kultur nur die Tumorzellen „invers“ wachsen, PSC befinden sich in beiden Kulturen auf der Oberfläche des Einsatzes. Dies bestätigt auch die Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene im Vergleich der Standard- und Inversen-Ko-Kultur, bei der kaum Gene unterschiedlich exprimiert sind. In den Vergleichen von Standard- und 3D-Kultur beziehungsweise Inverser- und 3D-Kultur werden hingegen eine Vielzahl an Genen signifikant unterschiedlich exprimiert. Hierbei liegt die Anzahl der Gene bei beiden Vergleichen in der gleichen Größenordnung (Mittelwert 7922 Gene, $\sigma \approx 921$), sodass eine ähnlich starke Genexpression von Invers- und Standard-Kontrollen angenommen werden kann (Abbildung 20A). Im Folgenden wird daher nur der Vergleich der Standard- vs. 3D-Kultur genauer betrachtet.

Bei der hierarchischen Clusterung der Proben, basierend auf der paarweisen euklidischen Distanz, zeigt sich bereits eine eindeutige Teilung in 2D- und 3D-Proben (Abbildung 20B). In Volcano-Plots wird die Anzahl der signifikant unterschiedlich exprimierten Gene im Vergleich 2D- vs. 3D-Kultur sichtbar (Abbildung 20C). Die in dieser Arbeit in magnetischer 3D-Kultur gehaltenen PSC zeigen eine deutliche Reduktion der Marker α -SMA und dem Connective tissue growth factor (CTGF) gegenüber der 2D-Kultur. Im Vergleich der differentiellen Genexpression je von Kontroll- und Behandlungsgruppen untereinander wird α -SMA im Durchschnitt 136-fach stärker von 2D-Kulturen als von 3D-Kulturen exprimiert. Des Weiteren bestätigte sich im zeitlichen Verlauf die Tendenz der zunehmenden Reduktion der Marker, was die Vermutung der zunehmenden Inaktivierung der PSC mit andauernder 3D-Kultur zulässt. Dieser Vermutung entspricht auch die Tatsache, dass FAP als Marker der Fibroblastenaktivierung zum 72 h Zeitpunkt in der 3D-Kultur deutlich erniedrigt ist, jedoch zum 24 h Zeitpunkt noch kein signifikanter Unterschied zur 2D-Kultur vorliegt (Abbildung 20D). Lipid-Droplets und eine veränderte Zellmorphologie können in immunhistochemischen Aufnahmen der 3D-Kultur nachgewiesen werden (Abbildung 9). Aber auch auf RNA-Ebene zeigt sich die vermehrte Expression von Lipid-Droplet assoziierten Genen in der 3D-Kultur. So wird beispielsweise PLIN2 sowohl zu beiden Zeitpunkten stärker in den 3D- als in den 2D-Kulturen exprimiert. Im zeitlichen Verlauf steigt diese Expression an (Abbildung 20D).

Zur Identifikation unterschiedlich exprimierter Signalwege der 3D-Kultur im Vergleich zur 2D-Kultur wurden up-/down-KEGG-Analysen betrachtet. Bei PSC der 2D-Kultur wird der Signalweg DNA replication zu beiden Zeitpunkten signifikant stärker verglichen mit der 3D-Kultur

exprimiert. Damit übereinstimmend wird das vermehrte Vorkommen von Heterochromatin anstelle von Euchromatin bei Zellen in 3D-Kultur beschrieben [29]. Auch der Signalweg der Regulation des Aktin-Zytoskeletts wird von PSC der 2D-Kultur zum 24 h Zeitpunkt signifikant stärker angereichert. Des Weiteren werden im Vergleich 2D vs. 3D bei beiden Zeitpunkten die Signalwege Cell cycle und ECM-receptor interaction hochreguliert, diese Anreicherung ist jedoch nur zu 24 h signifikant. Im Gegensatz dazu werden der HIF-1- und der Ferroptose-Signalweg bei den 3D- Kulturen zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zur 2D-Kultur signifikant stärker angereichert.

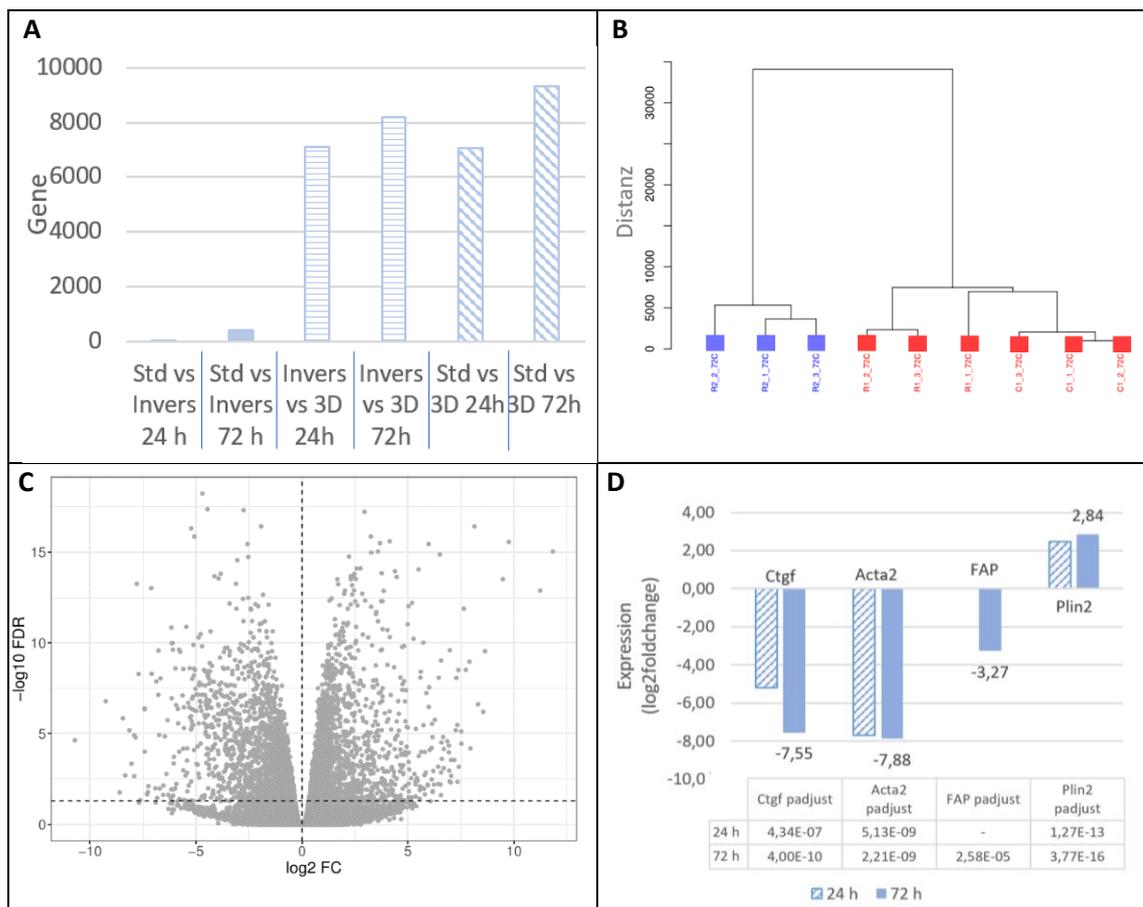


Abbildung 20: Visualisierungen der Vergleiche 2D- vs. 3D-Kultur; A: Anzahl differentiell exprimierter, proteinkodierender Gene (Ordinate) der Vergleiche der Kontrollgruppen Standard- (Std) vs. Inverse-Kultur (einfarbig), Inverse- vs. 3D-Kultur (gestreift) und Standard- vs. 3D-Kultur (schräg gestreift) zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h (Abszisse); B: Hierarchische Clusterung/Dendrogramm (basierend auf der paarweisen euklidischen Distanz) der proteinkodierenden Gene des Vergleichs der Kontrollen der Standard- (rot) vs. 3D-Kultur (blau) zu 72 h, Analyse: M. Glaß; C: Volcano-Plot des Vergleichs der Kontrollgruppen Standard- vs. 3D-Kultur zu 24 h, Ordinate: Signifikanz als $-\log_{10}(\text{FDR})$; Abszisse: \log_2 fold change der Genexpression, Analyse: M. Glaß; D: Expression der Marker CTGF, Acta2, FAP und PLIN2 zu den Zeitpunkten 24 h (schräg gestreift) und 72 h (einfarbig) im Vergleich der Kontrollen 2D- vs. 3D-Kultur, Ordinate: \log_2 fold change der Genexpression, Datentabelle: padjust-Werte der Gene

Nachdem nun Unterschiede innerhalb der 3D-Kultur selbst im zeitlichen Verlauf und Differenzen der 3D- zur 2D-Kultur beschrieben wurden, soll im Folgenden auf das Verhalten der PSC in 3D-Ko-Kultur mit Tumorzellen im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen eingegangen werden.

4.6.9 Einflüsse der KPC-Tumorzellen auf 3D-PSC

In dieser Arbeit wurde mit dem Ziel der Inaktivierung der PSC eine Zell-Zell-kontaktlose magnetische 3D-Ko-Kultur etabliert, bei welcher sich die PSC in Levitation und die Tumorzellen in 2D-Kultur befinden. Auch wenn die Methodik der magnetischen 3D-Ko-Kultur schon in einigen Varianten Anwendung fand [31], darunter beispielsweise auch in der 3D-Misch-Ko-Kultur von Fibroblasten und Brusttumorzellen [58], so ist die in dieser Arbeit verwendete Form der Zell-Zell-kontaktlosen magnetischen Ko-Kultur neuartig. Im 3D-Ko-Kultur-Modell werden im direkten Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen nur wenige Gene signifikant differenziell exprimiert. Dazu zählen zum Zeitpunkt 24 h die Gene ARXES2, SNAP25, CPM, SLCO4A1, IGFBP5, MMP10, MMP13, GM38391, CCK und PI15 und zum Zeitpunkt 72 h das Zytokin CXCL1 (Tabelle 19, Anlagen). Da die 3D-Kultur Versuche wenig signifikant unterschiedlich exprimierte Gene im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle zeigen, wurden die differenziell exprimierten Gene der Gruppen untereinander, also beide behandelten Proben zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h, sowie beide Kontrollen zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h, verglichen. In dem Vergleich Behandlung 24 h vs. Behandlung 72 h werden insgesamt 563 Gene in dem entsprechenden Vergleich der Kontrollen 1224 Gene signifikant differenziell exprimiert. Anschließend wurden KEGG-Analysen durchgeführt und Übereinstimmungen und Differenzen der jeweiligen Zeitpunkt-Vergleiche ermittelt. So ergeben die KEGG-Analysen der genannten Vergleichsgruppen eine Anreicherung von 6 signifikanten Signalwegen im Vergleich 24 h Behandlung vs. 72 h Behandlung und 18 signifikanten Signalwegen im Vergleich Kontrolle 24 h vs. Kontrolle 72 h. Dabei kommt eine signifikante Anreicherung einiger Signalwege wie ECM-receptor interaction, Focal adhesion und Protein digestion and absorption in beiden Vergleichsgruppen vor, was vermutlich auf die 3D-Kulturbedingungen zurückzuführen ist. Der Signalweg Cytokine-cytokine receptor interaction wird jedoch nur im zeitlichen Vergleich der Behandlungs-Gruppen angereichert, nicht im Vergleich der Zeitpunkte der Kontrollen. Die in den Signalweg Cytokine-cytokine receptor interaction involvierten Gene werden von behandelten PSC teils zu 24 h, teils zu 72 h stärker exprimiert. Hierbei zeigt sich eine deutliche zeitliche Clusterung (Abbildung 21A). Das Zytokin IL16 und die Zytokinrezeptoren CSF2RA und CNTFR werden bei den behandelten Gruppen zum 24 h Zeitpunkt stärker exprimiert als zum 72 h Zeitpunkt und bei den Kontroll-Gruppen im entsprechenden zeitlichen Vergleich nicht differenziell exprimiert. Das immunmodulatorische Zytokin IL1F10 und der Wachstumsfaktorrezeptor NGFR werden von den

behandelten PSC um ein Vielfaches stärker zum 24 h Zeitpunkt als zum 72 h Zeitpunkt exprimiert. Es liegt zwar auch eine stärkere Expression dieser Gene bei den Kontrollgruppen vor, diese ist allerdings deutlich geringer ausgeprägt. Bei den behandelten Gruppen fällt eine stärkere Expression der Zytokine IL6, LIF und IL11 zum 72 h Zeitpunkt als zum 24 h Zeitpunkt auf, diese werden bei den Kontroll-Gruppen im entsprechenden zeitlichen Vergleich nicht signifikant differenziell exprimiert (Abbildung 21B). Anhand bekannter Gen-Panels iCAF-, myCAF- [17] und apCAF-assoziiierter Gene [23] wurde zusätzlich die Expression dieser potenziellen Marker in den behandelten Proben im Vergleich 24 h vs. 72 h gegenübergestellt. Hinsichtlich myCAF- und apCAF-Markern ist keine eindeutige Tendenz der Proben sichtbar. Bei den iCAF-Markern zeigt sich jedoch eine Gruppierung der Proben in die Zeitpunkte 24 h und 72 h (Abbildung 21C). Einige Gene werden hierbei stärker zum 72 h Zeitpunkt exprimiert (CCL2, IL6, IL11, LIF, CXCL1, CXCL2), andere jedoch stärker zum 24 h Zeitpunkt (NDUFA4L2 und PNPLA3). In der Testung der Kontroll-Proben auf eine Expression ebendieser iCAF-Gene im zeitlichen Verlauf zeigt sich keine eindeutige Clusterung hinsichtlich der Zeitpunkte 24 h und 72 h.

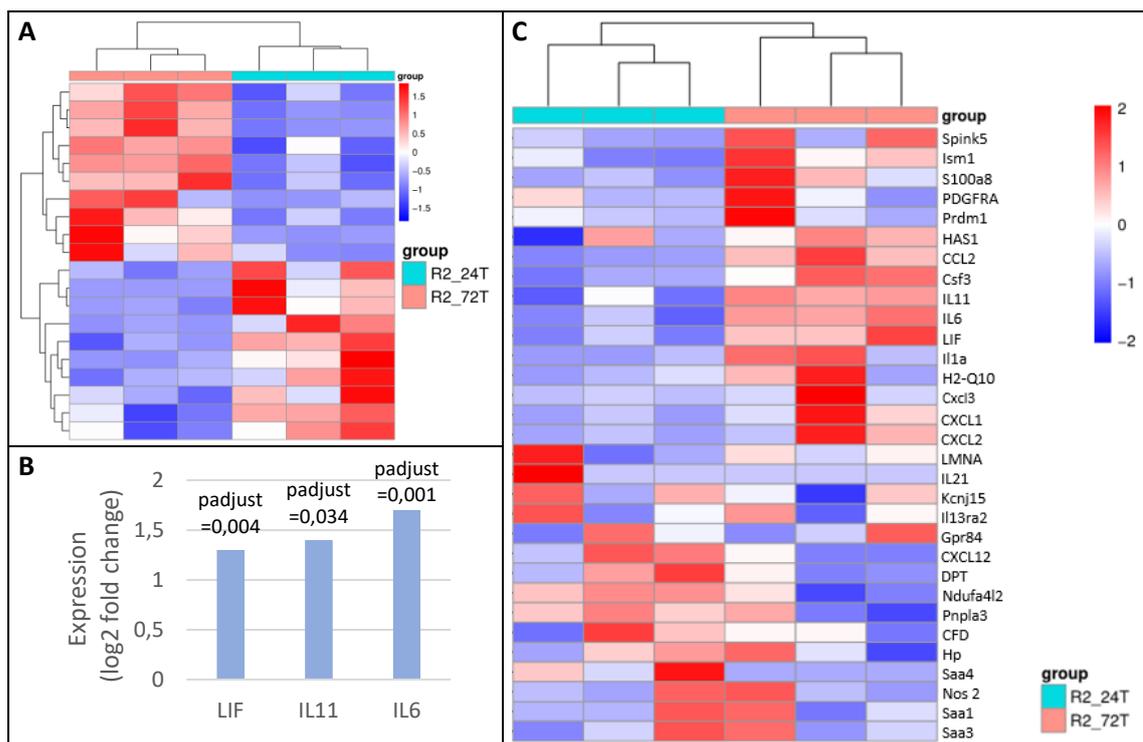


Abbildung 21: Unterschiedliche Expression von Genen der 3D-Ko-Kultur der Behandlungsgruppen im zeitlichen Verlauf (24 h vs. 72 h), A: Heatmap der Expression der im Signalweg Cytokine-cytokin receptor interaction angereicherte Gene in behandelten 3D-PSC zu 24 h und 72 h; B: Expression von LIF, IL11 und IL6 in behandelten 3D-PSC zu 72 h im Vergleich zu 24 h; Ordinate: log₂ fold change der Genexpression; C: Heatmap mit Expression iCAF-assoziiierter Gene (übernommen aus [17]) im zeitlichen Verlauf, Behandelte 3D-Ko-Kultur-Proben zu 24 h (R2_24T) und 72 h (R2_72T), Farbcodierung (rot-blau) entspricht jeweiligem log₂ fold change

4.6.10 Analysen der Inversen-Ko-Kultur-Modelle

Wie in Kapitel 4.6.5 beschrieben, werden in den Inversen-Ko-Kultur-Modellen eine Vielzahl von Genen unterschiedlich signifikant exprimiert. Zur tiefergehenden Analyse der Daten wurden daher zunächst KEGG-Analysen verwendet. Mithilfe von up-/down-KEGG-Analysen wurden bei den einzelnen Zeitpunkten der Inversen-Ko-Kulturen signifikant hoch- und herunter regulierte Signalwege im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrolle in einem Modell betrachtet. Anschließend wurde eine Auswahl von Signalwegen anhand der thematischen Relevanz getroffen und das Auftreten innerhalb eines Modells, also eine potenzielle Anreicherung der Signalwege zu beiden Zeitpunkten überprüft. Zusätzlich wurden bei ausgewählten Signalwegen die involvierten Gene und deren Expression ermittelt. Abschließend wurden, anhand der so identifizierten relevanten Prozesse, Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem KC921- und KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modell ermittelt.

Zum 72 h Zeitpunkt der Inversen-KPC-Ko-Kultur werden insgesamt 9 KEGG-Signalwege signifikant stärker bei den behandelten PSC angereichert. Es fällt eine signifikant stärkere Anreicherung proliferations- und Zellumsatz-fördernder Signalwege auf. Darunter finden sich die Signalwege Cell cycle, Biosynthesis of amino acids, Ribosome und der Zellzyklus-regulierende PI3K-Akt-Signalweg. Außerdem werden die dem Bindegewebe zugehörigen Signalwege Proteoglycans in cancer und ECM-Receptor und die Tumor-assoziierten Signalwege MicroRNAs in cancer, Central carbon metabolism in cancer und HIF1-signaling im Vergleich zu den Kontrollen hochreguliert. Zum 24 h Zeitpunkt der Inversen-KPC-Ko-Kultur werden insgesamt 40 KEGG-Signalwege signifikant stärker bei den behandelten PSC angereichert, darunter der Signalweg Cytokine-cytokine receptor interaction. Die hier in den Signalweg involvierten Gene wurden identifiziert und neben der Stärke der unterschiedlichen Expression auch eine mögliche signifikante Expression zum 72 h Zeitpunkt überprüft. Es zeigt sich eine im zeitlichen Verlauf ansteigende Expression des proinflammatorischen Chemokins CCL6 und des Interleukins IL6. Andere Cytokine wie CCL11, CXCL und CCL2 werden zum 24 h Zeitpunkt stärker exprimiert und zeigen eine Abnahme der Expression im zeitlichen Verlauf. Zum 72 h Zeitpunkt wird der Signalweg Cytokine-cytokine receptor interaction in der KPC-Ko-Kultur ebenfalls hochreguliert, allerdings nicht signifikant. Bei Betrachtung der differentiellen Genexpression der hier angereicherten Gene stellte sich heraus, dass einige Gene alleinig zu 72 h im Vergleich zu den Kontrollen signifikant stärker exprimiert werden. Zum 24 h Zeitpunkt ist bei diesen Genen kein signifikanter Unterschied in der Expression im Vergleich zu den Kontrollen feststellbar. Hierbei handelt es sich unter anderem um die Gene Il11, LIF und Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFS8, TNFS9, TNFS12a, TNFS15, TNFS19).

Mithilfe von Heatmaps wurden die Expression der im Signalweg zu 24 h angereicherten Gene sowohl für die Zeitpunkte innerhalb des KPC-Modells, als auch im Vergleich mit dem KC921-Modell visualisiert. Es zeigt sich innerhalb des KPC-Modells für beide Zeitpunkte eine deutliche Clusterung in behandelte PSC und Kontroll-PSC (Abbildung 22A). Auch im Vergleich der beiden Modelle untereinander ist ebenfalls eine deutliche Aufteilung in behandelte Proben und Kontroll-Proben sichtbar (Abbildung 22B), wobei zusätzlich tendenziell eine Aufteilung der behandelten PSC beider Modelle in je eine Gruppe „Behandlung zu 24 h“ und eine Gruppe „Behandlung zu 72 h“ festgestellt werden kann. Um einen tieferen Einblick in die einzelnen Veränderungen innerhalb des Signalwegs Cytokine-cytokine receptor interaction zu erhalten, wurden die zu 24 h angereicherten Gene in den verschiedenen Modellen bezüglich ihrer Expression im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen gegenübergestellt (Tabelle 14). CXCL14 und CCL11 werden zwar von behandelten PSC zu allen Zeitpunkten signifikant stärker als von den Kontrollen exprimiert, insgesamt ist jedoch hier ein Rückgang der stärkeren Expression im Verlauf der Zeit zu beobachten. Einige Gene werden alleinig zum Zeitpunkt 24 h signifikant stärker als die Kontrollen exprimiert, darunter CXCL5 und IL33. In der KC912-Ko-Kultur wird IL33 zum 72 h Zeitpunkt signifikant stärker von den Kontrollen als von behandelten PSC exprimiert, es ist also eine Abnahme der Expression feststellbar. Bei den Genen IL6, dem IL13-Rezeptor IL13RA1 und CCL6 zeichnet sich in den Ko-Kultur Modellen im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Anstieg der Expression ab. In beiden Ko-Kulturen alleinig zum 72 h Zeitpunkt signifikant stärker exprimiert wird das Zytokin LIF. Einige Gene werden zum 24 h Zeitpunkt in der KPC-Ko-Kultur nicht signifikant differenziell exprimiert, jedoch signifikant stärker zum 72 h Zeitpunkt sowie zu beiden Zeitpunkten der KC921-Ko-Kultur. In der KC921-Ko-Kultur ist hier zusätzlich ein Anstieg im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Zu den beschriebenen Genen zählen unter anderem das Zytokin IL11 und die Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Superfamilie TNFSF8 und TNFSF15. Bei isolierter Betrachtung der Gene IL6, IL11 und LIF mithilfe von Heatmaps, fällt bei der Inversen-KC921-Ko-Kultur eine vollständige Clusterung hinsichtlich Behandlung vs. Kontrolle auf (Abbildung 22C). Bei der Inversen-KPC-Ko-Kultur grenzen sich die behandelten Proben des 72 h Zeitpunkts zum Rest der Proben ab. Zum 24 h Zeitpunkt ist hier noch kein Unterschied zwischen Behandlung und Kontrolle ersichtlich.

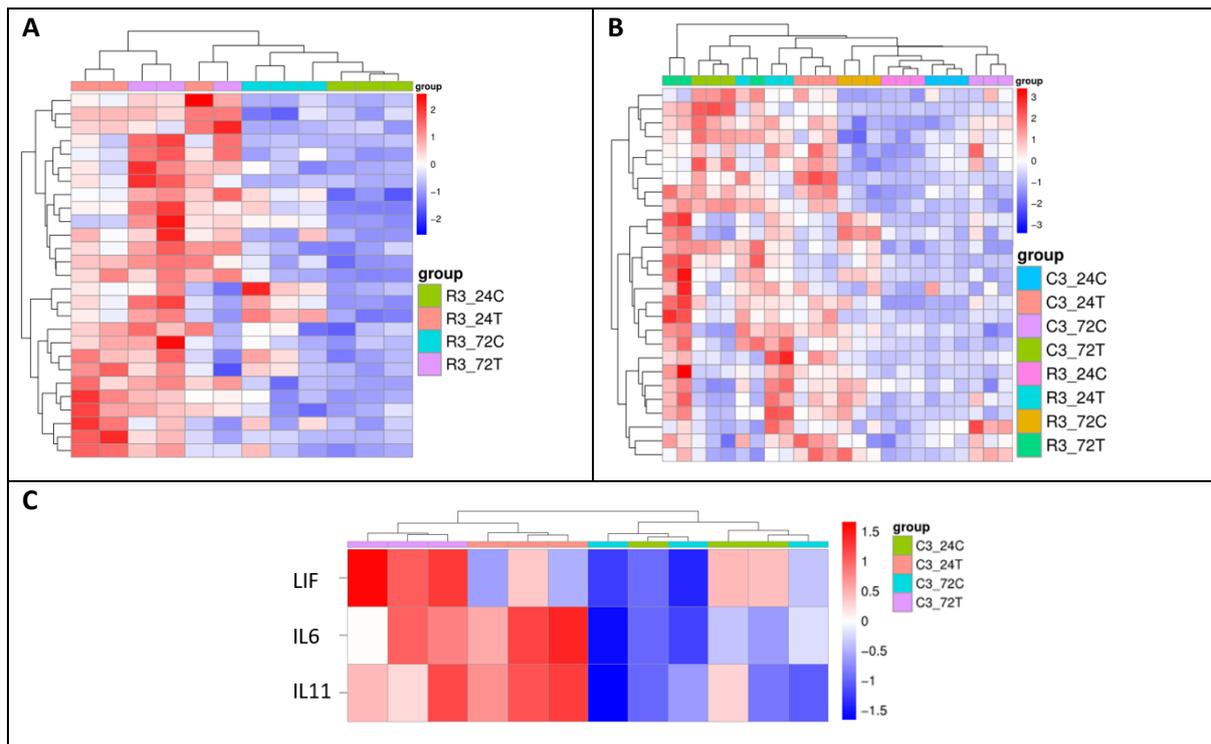


Abbildung 22: Analysen des KEGG-Signalwegs Cytokine-cytokine receptor interaction in Inversen-Ko-Kulturen mit KPC- und KC921-Zellen (T = Treatment; C = Control); A: Heatmap der zu 24 h im Signalweg angereicherten Gene bei den Proben des KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modells (R3); B: Heatmap der zu 24 h im Signalweg angereicherten Gene bei den Proben des KPC- und KC921(C3)-Inversen-Ko-Kultur-Modells; C: Heatmap der Expression der Gene IL6, LIF und IL11 im KPC-(R3)Ko-Kultur-Modell; D: Heatmap der Expression der Gene IL6, LIF und IL11 im KC921-(C3)Ko-Kultur-Modell

Tabelle 14: Werte der differentiellen Genexpression ausgewählter Gene des KEGG-Signalwegs Cytokine-cytokine receptor interaction in den Inversen-Ko-Kultur Modellen mit KPC-/ KC921-Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h mit der Tendenz einer zeitlich verminderten Expression/ eines zeitlichen Anstiegs; Expression in log2 fold change zur jeweiligen Kontrolle; n. s.: keine signifikant unterschiedliche Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle

Gen	KPC		KC921	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Ccl6	2,39	4,42	n. s.	3,03
Il6	1,31	1,69	1,05	1,18
Il13ra1	0,96	1,29	1,00	1,39
Il11	n. s.	2,51	1,29	2,10
LIF	n. s.	1,65	n. s.	1,21
Tnfsf8	n. s.	4,78	2,21	4,20
Tnfsf15	n. s.	4,64	2,46	6,16

Gen	KPC		KC921	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Cxcl14	2,21	1,88	2,54	1,6
Ccl11	2,92	1,11	1,99	n. s.
Cxcl5	2,60	n. s.	1,74	n. s.
IL33	1,69	n. s.	1,32	-1,34

In den up-KEGG-Analysen der Inversen Ko-Kultur mit KC921-Zellen werden insgesamt 8 Signalwege zum 24 h Zeitpunkt und 11 Signalwege zum 72 h Zeitpunkt stärker in behandelten

PSC angereichert. Darunter sind zu beiden Zeitpunkten insbesondere proliferations- und Zellumsatz-fördernde Signalwege vertreten, wie die Signalwege Cell cycle, Biosynthesis of amino acids, RNA transport und Ribosome. Zum 24 h Zeitpunkt werden außerdem der Signalweg Central carbon metabolism in cancer und der HIF-1 Signalweg stärker angereichert. Wie schon zum 72 h Zeitpunkt bei der Inversen-Ko-Kultur mit KPC-Zellen wird auch hier zum 72 h Zeitpunkt der Signalweg MicroRNAs in cancer und der PI3K-Akt-Signalweg hochreguliert. Stellvertretend für die Gesamtheit der vermehrt aufgetretenen proliferationsassoziierten Signalwege wurden die Signalwege Cell cycle und Biosynthesis of amino acids in beiden Modellen genauer analysiert.

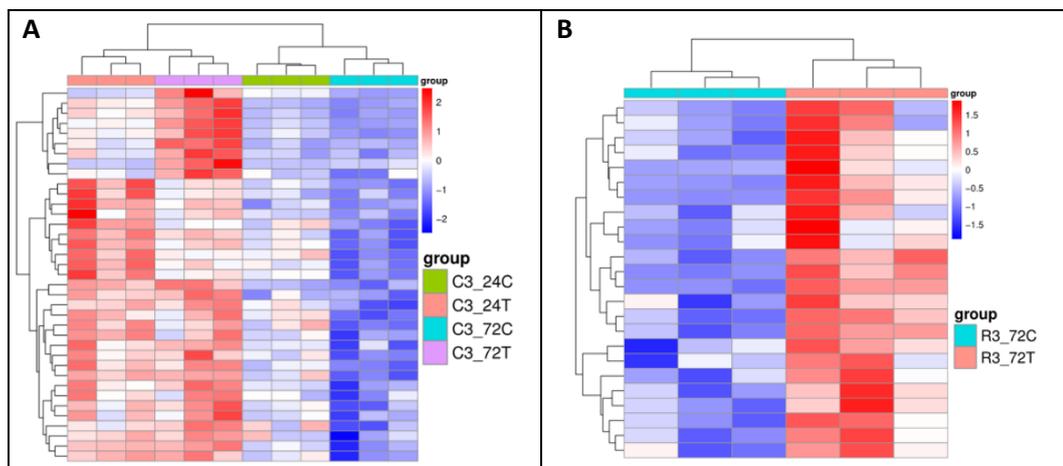


Abbildung 23: Analysen des KEGG-Signalwegs Cell cycle in Inversen-Ko-Kulturen mit KPC- und KC921-Zellen; A: Heatmap der im Signalweg angereicherten Gene bei den Proben beider Zeitpunkte (24 h und 72 h) des KC921-Inversen-Ko-Kultur-Modells (C3; T = Treatment; C = Control); B: Heatmap der im Signalweg angereicherten Gene bei den Proben des 72 h Zeitpunkts KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modells (R3; T = Treatment; C = Control)

In der Inversen-KC921-Ko-Kultur findet eine signifikant stärkere Anreicherung des Signalwegs Cell cycle gegenüber den Kontrollen zu beiden Zeitpunkten statt, in der Heatmap zeigt sich eine deutliche Clusterung hinsichtlich Behandlung vs. Kontrolle mit einer deutlich stärkeren Expression der Gene in den behandelten PSC (Abbildung 23A). Zudem fällt auf, dass innerhalb der Gruppe der behandelten PSC einige Gene zu 72 h (MYC, TRP53) andere zu 24 h (CDK1, BUB1) noch stärker exprimiert werden. In der Inversen-KPC-Ko-Kultur wird der Signalweg Cell cycle nur zum 72 h Zeitpunkt stärker im Vergleich zu den Kontrollen angereichert. Bei der Betrachtung der Expression der entsprechenden Gene im gesamten Modell, also auch zu den 24 h Zeitpunkten der behandelten PSC und Kontroll-PSC, verdeutlicht sich dieser Unterschied. Es fällt eine zeitliche Gruppierung auf: am geringsten exprimiert werden die Gene des Signalwegs in Kontroll-PSC zum 72 h Zeitpunkt, am stärksten in PSC zum 24 h Zeitpunkt (sowohl behandelte PSC, als auch Kontroll-PSC). In der Proliferation zeigen sich, zumindest hinsichtlich des Signalwegs Cell

cycle, die behandelte PSC und Kontroll-PSC zum 24 h Zeitpunkt noch nicht signifikant unterschiedlich, zum 72 h Zeitpunkt ist hier jedoch ein Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar (Abbildung 23B).

Bei der Betrachtung einzelner Gene fällt eine zeitlich steigende Expression von Genen, die in der Zellzyklus-Regulation eine zentrale Rolle spielen wie SMAD3, BUB1, CDK1 oder MYC in den behandelten PSC der KC921-Ko-Kultur auf. In der KPC-Ko-Kultur hingegen werden die genannten Gene größtenteils nur zum 72 h Zeitpunkt gegenüber der Kontrolle signifikant stärker exprimiert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Werte der differentiellen Genexpression ausgewählter Gene des KEGG-Signalwegs Cell cycle in den Inversen-Ko-Kultur Modellen mit KPC-/ KC921-Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 72 h; Expression in log₂ fold change zur jeweiligen Kontrolle; n. s.: keine signifikant unterschiedliche Expression in der differentiellen Genexpressionsanalyse im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle

Gen	KPC		KC921	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Bub1	n. s.	1,06	0,84	1,63
Cdk1	n. s.	0,71	0,77	0,84
Myc	n. s.	1,44	1,08	2,38
Smad3	1,04	1,07	0,63	0,94
Ccna2	n. s.	0,93	0,72	1,46

Bei Analyse der jeweiligen Expression angereicherter Gene des Signalwegs Biosynthesis of amino acids anhand von Heatmaps fällt bei der KC921-Ko-Kultur, wie auch schon bei dem Signalweg Cell cycle, eine deutliche Clusterung in behandelte PSC und Kontroll-PSC auf (Abbildung 24A). Dabei werden die entsprechenden Gene generell von den behandelten PSC stärker als von Kontrollen exprimiert. Auch innerhalb der Gruppe der behandelten PSC gibt es Unterschiede: einige Gene werden stärker zum 72 h Zeitpunkt (GPT2, BCAT1, CTH) andere zum 24 h Zeitpunkt (ENO1, PKG1, PFKL) exprimiert. In der Ko-Kultur mit KPC-Zellen ist der Signalweg Biosynthesis of amino acids nur zum 72 h Zeitpunkt als signifikant hochreguliert identifiziert worden. In der Heatmap der Gene zum Zeitpunkt 72 h ist eine deutliche Abgrenzung der behandelten PSC von den Kontrollen sichtbar (Abbildung 24B). Bei Überprüfung der Expression der Gene im gesamten Modell lässt sich die stärkste Expression bei behandelten PSC des 72 h Zeitpunkts, gefolgt von beiden Gruppen des 24 h Zeitpunkts und abschließend der Kontroll-Gruppe des 72 h Zeitpunkts feststellen.

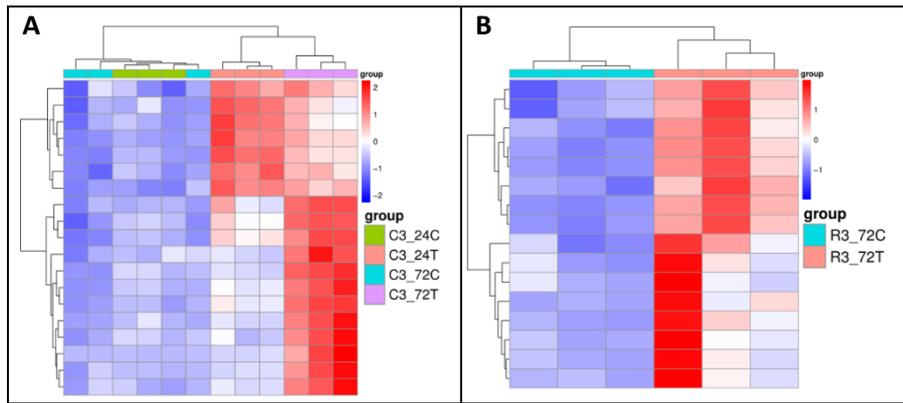


Abbildung 24: Analysen des KEGG-Signalwegs Biosynthesis of amino acids in Inversen Ko-Kulturen mit KPC- und KC921-Zellen; A: Heatmap der im Signalweg angereicherten Gene bei den Proben beider Zeitpunkte (24 h und 72 h) des KC921-Inversen-Ko-Kultur-Modells (C3; T = Treatment; C = Control); B: Heatmap der im Signalweg angereicherten Gene bei den Proben des 72 h Zeitpunkts KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modells (R3; T = Treatment; C = Control)

4.6.11 Globale Analyse der KPC-Ko-Kulturen

Ein globaler Vergleich der unterschiedlichen Ko-Kultur-Modelle mit KPC-Zellen soll potenzielle Gemeinsamkeiten der behandelten PSC in den unterschiedlichen Modellen identifizieren. Hierfür wurden alle behandelten Proben der KPC-Modelle (Standard, 3D und Invers) sowie alle Kontrollen dieser Modelle zu je einer Gruppe zusammengefasst und die beiden entstandenen Gruppen anschließend miteinander verglichen. Es stellt sich heraus, dass keine bei allen behandelten Proben gemeinsam differenziell exprimierte Gene im Vergleich zu den Kontrollen exprimiert werden.

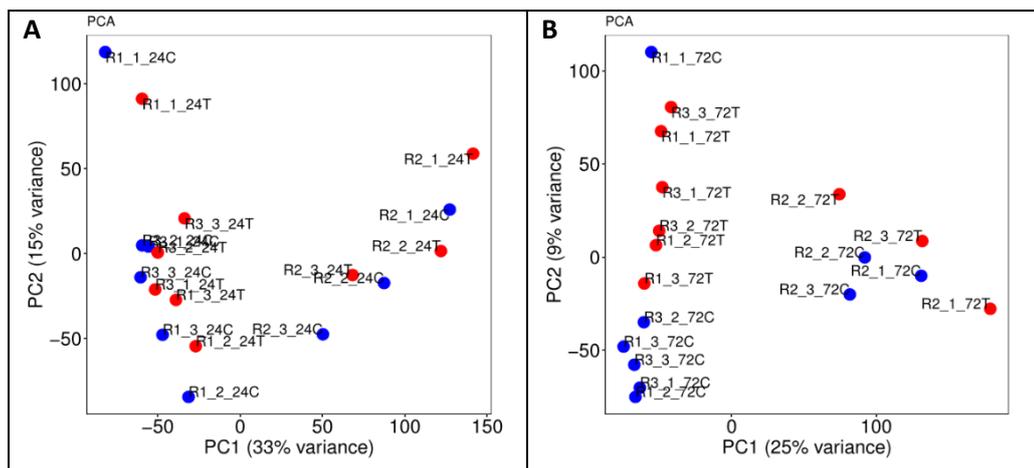


Abbildung 25: PCAs des globalen KPC-Ko-Kultur Vergleichs, alle behandelten Proben (rot, T) / Kontroll-Proben (blau, C) der KPC-Ko-Kulturen wurden zu je einer Gruppe zusammengefasst, Namensgebung: R1: Standard-Ko-Kultur, R2: 3D-Ko-Kultur, R3: Inverse-Ko-Kultur; mittlere Zahl (1-3): Probe 1-3; A: 24 h Zeitpunkt; B: 72 h Zeitpunkt

In den PCAs dieser Analyse lässt sich zum Zeitpunkt 24 h keine eindeutige Gruppierung hinsichtlich Behandlung vs. Kontrolle feststellen (Abbildung 25A). Zum 72 h Zeitpunkt clustern jedoch die Proben der 2D-Kulturen bis auf eine Ausnahme (R1_1_72C) hinsichtlich Behandlung vs. Kontrolle (Abbildung 25B).

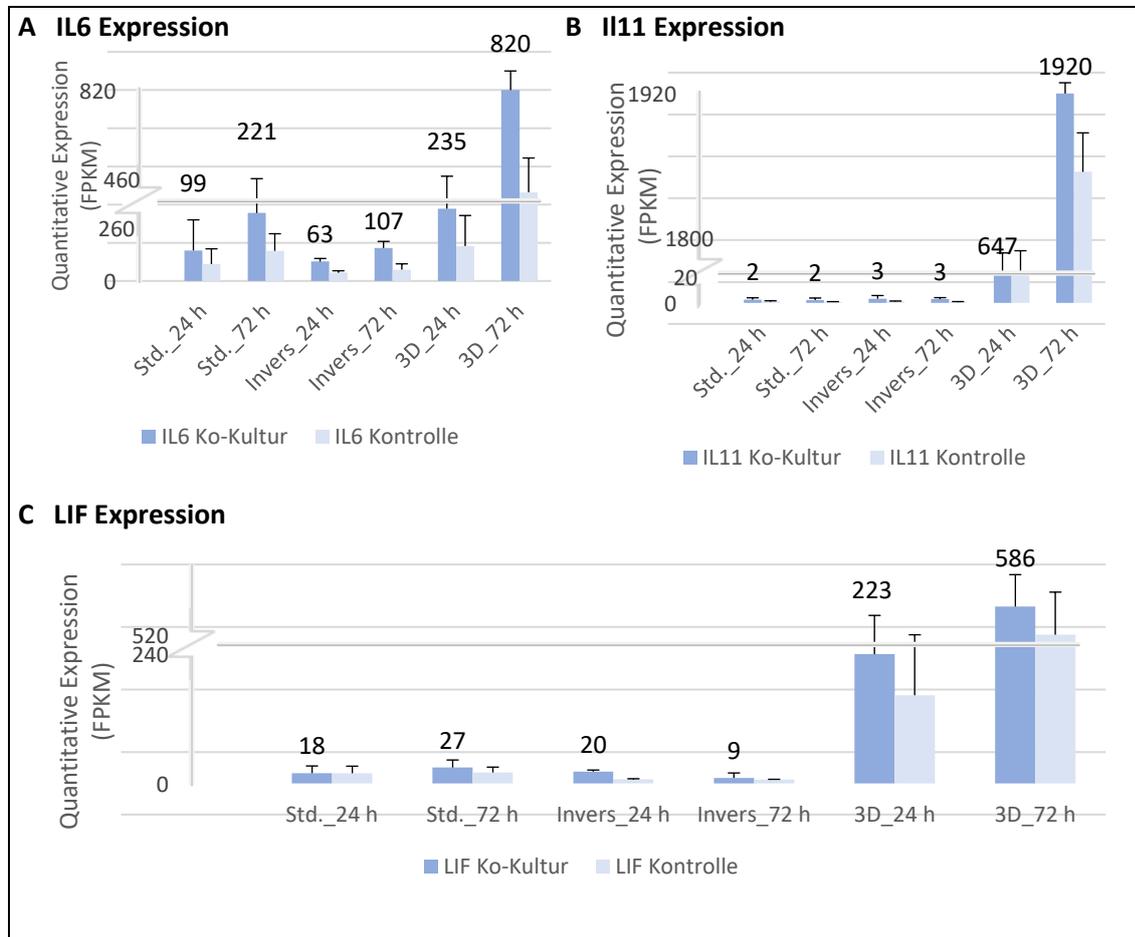


Abbildung 26: Quantitative Expression der Marker IL6, IL11 und LIF in PSC (n = 3, Mittelwerte mit Standardabweichung) in KPC-Ko-Kultur-Modellen (dunkelblau) und PSC Kontrollen (hellblau); A: quantitative IL6 Expression; B: quantitative IL11 Expression; C: quantitative LIF Expression; Std.: Standard-Ko-Kultur, Invers: Inverse-Ko-Kultur, 3D: 3D-Ko-Kultur, 24 h = 24 h Zeitpunkt, 72 h = 72 h Zeitpunkt

Zudem wurde die quantitative Expression ausgewählter inflammatorischer Marker, IL6, LIF und IL11, anhand der FPKM-Werte in den KPC-Ko-Kultur-Modellen untersucht. Interessanterweise werden die Zytokine IL6, LIF und IL11 im Allgemeinen, also auch von den Kontrollen, deutlich stärker von PSC der 3D-Kultur Modelle exprimiert (Abbildung 26). Relativ werden die Gene jedoch in allen Modellen stärker von behandelten Proben als von ihren jeweiligen Kontrollproben exprimiert. So wird in der differentiellen Genexpressionsanalyse IL6 zu 24 h 4-fach stärker und zu 72 h 7-fach stärker, LIF zu 24 h 24-fach stärker und zu 72 h 26-fach stärker von 3D-PSC als von PSC in Inverser-KPC-Ko-Kultur signifikant exprimiert. Zudem werden die

gennannten Gene ebenfalls stärker von 3D-PSC als von PSC der Standard-Ko-Kultur exprimiert, jedoch nicht signifikant. Das Zytokin IL11 wird in einem noch deutlicheren Ausmaß besonders von PSC der 3D-Kultur exprimiert, hier ist neben einer stärkeren Expression in den behandelten Gruppen auch ein deutlicher zeitlicher Anstieg der Expression festzustellen (Abbildung 26B).

4.6.12 Vergleich der Standard- und Inversen-KPC-Ko-Kulturen

Da ein globaler Vergleich aller KPC-Ko-Kultur-Modelle durch die erheblichen Unterschiede der 2D- und 3D-Ko-Kultur-Modelle erschwert wurde, wurden weiterhin die Standard- und Inversen-KPC-Ko-Kulturen untereinander mithilfe der differentiellen Genexpressionsanalyse verglichen. Hierfür wurden mit Venn-Diagrammen die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene der Zeitpunkte der Modelle im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen und die Schnittmengen dieser Gengruppen ermittelt. Allein im Standard-Modell werden zum 24 h Zeitpunkt ein Gen, zum 72 h Zeitpunkt 2 Gene unterschiedlich signifikant exprimiert. Ausschließlich im Inversen-Modell werden 386 Gene zum 24 h Zeitpunkt und 1688 Gene zum 72 h Zeitpunkt exprimiert. Die Gene wurden nach unterschiedlicher Expressionsstärke geordnet und die jeweils am stärksten hoch- oder herunter-regulierten Protein-kodierenden Gene ermittelt (Tabelle 21, Anlagen).

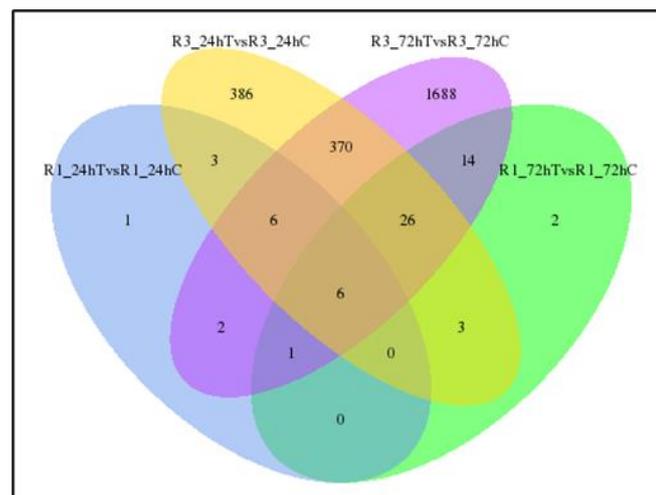


Abbildung 27: Venn-Diagramm des Vergleichs Standard-KPC-Ko-Kultur (R1) vs. Inverse-KPC-Ko-Kultur (R3); Zahlen: Anzahl der unterschiedlich signifikant exprimierten Gene; T = Behandelte PSC, C = Kontrolle, 24 h = 24 h Zeitpunkt, 72 h = 72 h Zeitpunkt

Insgesamt 6 Gene werden zu beiden Zeitpunkten und von beiden Ko-Kultur-Modellen von den behandelten PSC signifikant stärker oder geringer exprimiert als die jeweiligen Kontrollen (VCAN, STAC2, CYS1, CHST11, 6030408B16Rik, ACSL4). Es zeigen sich zum 24 h Zeitpunkt 3 Gene, zum 72 h Zeitpunkt 14 Gene, die in beiden Ko-Kultur-Modellen signifikant unterschiedlich und alleinig zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen exprimiert werden (Abbildung 27).

Es wurde eine Auswahl an mindestens zu einem Zeitpunkt gemeinsam unterschiedlich signifikant exprimierten Genen der beiden Ko-Kulturen getroffen (Tabelle 20, Anlagen). Darunter finden sich sowohl Gene, deren Überexpression bei gastrointestinalen Tumoren beschrieben wurden (SPON2, ACSL4, CHRDL2), als auch bereits mit dem Pankreaskarzinom assoziierte Gene (VCAN, PTX3).

4.6.13 Subgruppen-Analysen der PSC der Ko-Kultur-Modelle

Um zu überprüfen, ob PSC der einzelnen Ko-Kultur-Modelle bestimmten bereits bekannten Subgruppen zuordenbar sind, wurde die quantitative Expression bestimmter der jeweiligen Gruppe assoziierter Gene überprüft. Aus murinen Versuchen gewonnene Daten lassen sich oft nur in Teilen in humanen Proben rekapitulieren. Daher wurde die quantitative Expression bestimmter der Gruppe der iCAF zugeschriebenen Gene, die sowohl in murinen, als auch in humanen iCAF vorkamen [23], in den PSC der Ko-Kultur-Modelle untersucht. Hierbei fällt zu beiden Zeitpunkten eine deutliche Clusterung von behandelten PSC und Kontroll-PSC in dem Inversen-KC921-Ko-Kultur-Modell auf (Abbildung 28A). In dem Inversen-KPC-Ko-Kultur Modell hingegen unterscheiden sich die behandelten PSC von Kontroll-PSC erst zum 72 h Zeitpunkt deutlich. Auch wenn eine Gruppierung in den genannten Proben sichtbar ist, so sind trotzdem innerhalb der Gruppen die Gene nicht homogen hoch- oder herunterreguliert. Vielmehr werden teilweise Gene von behandelten PSC stärker exprimiert (PTX3, IL6, HAS1, TNFAIP6), teilweise von Kontroll-PSC (GSN, APOE, DPT). Hierbei werden die Gene PTX3, IL6, HAS1, TNFAIP6 sowohl bei der Inversen-Ko-Kultur mit KPC-, als auch mit KC921-Zellen stärker exprimiert. Dies fällt auch in der gemeinsamen Heatmap der Modelle auf, in der die behandelten Proben beider Modelle und die Kontroll-Gruppen beider Modelle clustern (Abbildung 28B). Interessanterweise werden die übrigen Gene deutlich stärker von den Kontroll-Gruppen beider Modelle, vor allem zum 72 h Zeitpunkt exprimiert. In den anderen Ko-Kultur-Modellen findet bei dem direkten Vergleich Kontrolle vs. Behandlung bezüglich der iCAF-Gene entweder eine zeitliche Clusterung (Standard-KC-Ko-Kultur, 3D-Ko-Kultur) oder keine Clusterung statt (Standard-KPC-Ko-Kultur). Auch die Expression von myCAF-assoziierten Genen (ACTA2, TAGLN, CTHRC1), die sowohl in murinen, als auch in humanen CAF exprimiert werden [23], wurde in den PSC aller Ko-Kultur-Modelle überprüft. Hier tritt keine eindeutige Clusterung der Expression in den verschiedenen Gruppen hinsichtlich Behandlung vs. Kontrolle auf. Des Weiteren wurden apCAF-assoziierte Gene [23] in ihrer Expressionsstärke untersucht. In den Standard- und 3D-Ko-Kultur-Modellen fällt hier keine oder nur eine zeitliche Gruppierung auf. Wohingegen in der Inversen-KPC-Ko-Kultur die Proben des 72 h Zeitpunkts sich gegen die restlichen Proben abheben, wobei hier wieder teilweise Gene von behandelten PSC, teilweise von Kontroll-PSC stärker exprimiert werden (Abbildung 29A). In

der Inversen-KC921-Ko-Kultur hingegen zeigen die Proben eine einheitliches Verteilungsmuster nach Behandlung vs. Kontrolle (Abbildung 29B). Auch bei dem gemeinsamen Vergleich der Inversen-Ko-Kulturen innerhalb einer Heatmap fällt eine durchgehende Clustering hinsichtlich der behandelten PSC und Kontroll-PSC auf.

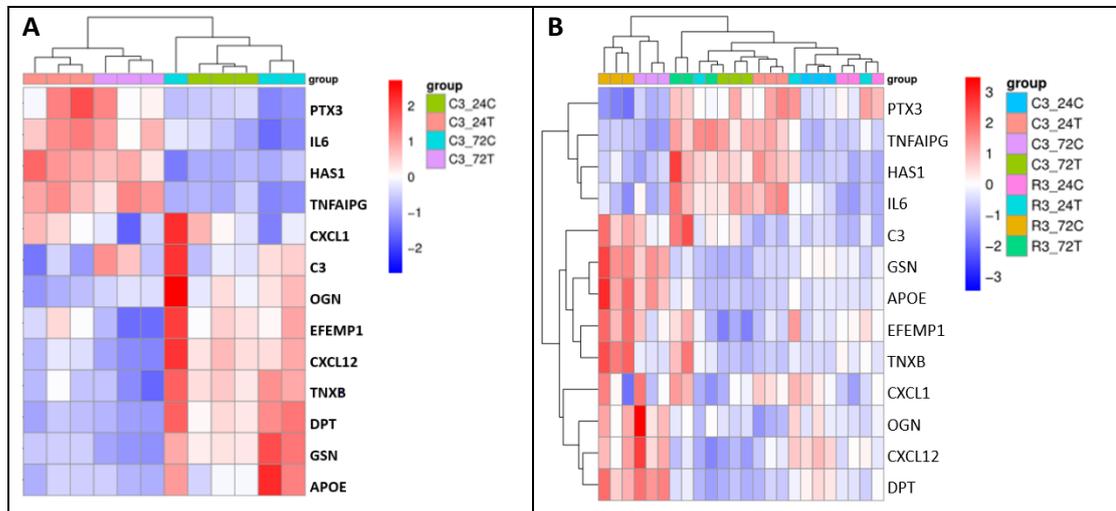


Abbildung 28: Subgruppen-Analysen der PSC anhand eines definierten iCAF-Gen-Sets [23]; A: Heatmap der iCAF-assozierten Gene beider Zeitpunkte (24 h und 72 h) des KC921-Inversen-Ko-Kultur-Modells (C3; T = Treatment; C = Control); B: Heatmap der iCAF-assozierten Gene des KC921- und KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modells (R3; T = Treatment; C = Control)

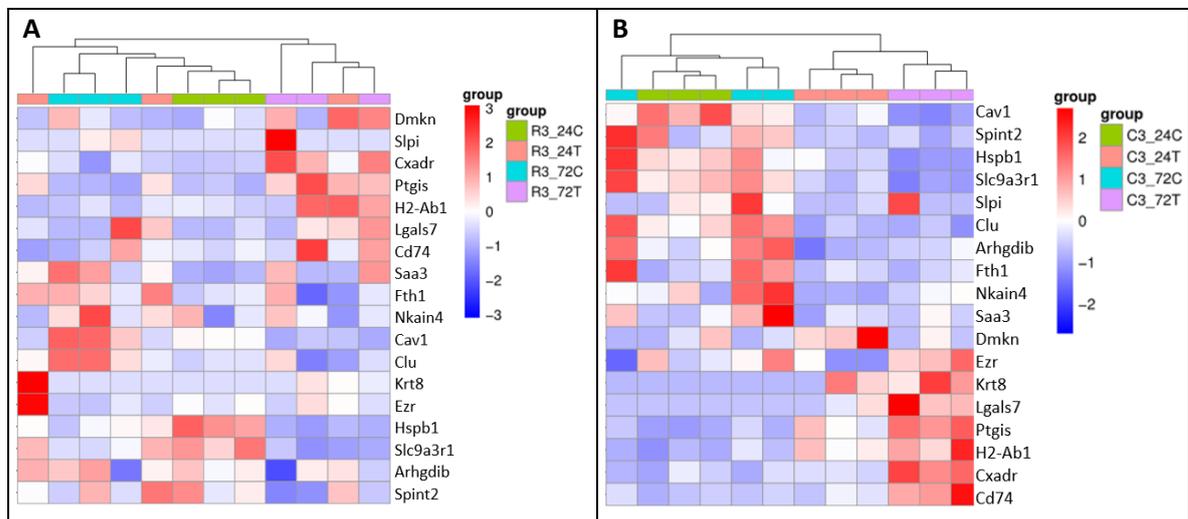


Abbildung 29: Subgruppen-Analysen der PSC anhand eines definierten apCAF-Gen-Sets [23]; A: Heatmap der apCAF-assozierten Gene beider Zeitpunkte (24 h und 72 h) des KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modells (R3; T = Treatment; C = Control); B: Heatmap der apCAF-assozierten Gene beider Zeitpunkte (24 h und 72 h) des KC921-Inversen-Ko-Kultur-Modells (C3)

5. Diskussion

5.1 Auswirkungen der Tumorzellen auf PSC

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist, die frühen Interaktionen der Tumorzellen beziehungsweise Tumor-Vorläuferzellen mit PSC besser zu verstehen. Diverse Einflüsse der Tumorzellen auf das Genexpressionsprofil der PSC können gezeigt werden. Diese beziehen sich unter anderem auf das Wachstum der PSC, die EZM-Synthese und die parakrine Kommunikation mit den Tumorzellen.

5.1.1 Proliferations- und migrationsfördernde Einflüsse

Studien mit PSC-PDA-Organoid-Ko-Kulturen zeigen einen proliferationsfördernden Effekt der Tumorzellen auf PSC [17; 59]. Bei erhöhter gemittelter RNA-Ausbeute in Standard- und Inversen-Ko-Kulturen bei behandelten PSC wird auch in dieser Arbeit indirekt ein derartiger Effekt der Tumorzellen sichtbar. Dieser Effekt ist zudem bei der Inversen-Ko-Kultur stärker ausgeprägt. In Inversen-Ko-Kulturen scheinen KC921-Zellen zu Beginn proliferationsfördernder auf PSC zu wirken als KPC-Zellen. Im KC921-Modell werden Signalwege wie Cell cycle und Biosynthesis of amino acids schon zu 24 h signifikant stärker als in den Kontrollen angereichert, im KPC-Modell jedoch erst zu 72 h. Da zum 72 h Zeitpunkt eine signifikante Anreicherung der genannten Signalwege in Ko-Kulturen beider Zelltypen vorhanden ist, scheint sich der proliferationsfördernde Effekt jedoch im Verlauf der Zeit anzugleichen. Insgesamt sind hinsichtlich eines proliferationsfördernden Effekts der Tumorzellen erhebliche Unterschiede zwischen den 2D- und 3D-Modellen ersichtlich. Da in 3D-Kultur die Einflüsse des Kultur-Modells die der Tumorzellen überwiegen, kann hier kein proliferationsfördernder Effekt nachgewiesen werden, in Kapitel 5.2.2 und Kapitel 5.2.3 wird genauer auf diesen Sachverhalt eingegangen. Über die Migration der Zellen können nur indirekte Aussagen abgeleitet werden, da hier keine speziellen Assays durchgeführt wurden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Inversen-Ko-Kulturen zeigen jedoch bei der Verwendung von Poren mit 3 µm Durchmesser eine hohe Plastizität und Fähigkeit beider Zelltypen zur Migration. Zusammenfassend lässt sich ein proliferationsfördernder Effekt der Tumorzellen auf PSC in Standard- und Inverser-Ko-Kultur nachweisen, in PSC in 3D-Kultur ist dieser nicht nachweisbar. Mögliche Ursachen für das abweichende Verhalten der 3D-PSC werden in Kapitel 5.2.2 und Kapitel 5.2.3 diskutiert.

5.1.2 Beeinflussung des EZM-Stoffwechsels

Wie bereits erwähnt, spielt im PDA das Bindegewebe aufgrund der charakteristischen desmoplastischen Stromareaktion und den daraus resultierenden Folgen wie beispielsweise vermindertes Therapieansprechen eine besondere Rolle. Auch aus indirekten Ko-Kulturen, in

denen PSC Tumorzellmedium ausgesetzt werden, ist bekannt, dass PSC im aktivierten Zustand eine Vielzahl von Proteinen der EZM produzieren und somit das Tumorzellwachstum unterstützen [60]. Ein Einfluss der Tumorzellen auf die Synthese der EZM durch PSC kann in dieser Arbeit sowohl in Standard-, als auch in Inversen-Ko-Kulturen gezeigt werden. In beiden Modellen werden Signalwege wie Proteoglycans in cancer oder ECM-Receptor unter Tumorzelleinfluss stärker angereichert, diese Anreicherung ist jedoch nur in den Inversen-Ko-Kulturen signifikant. Dennoch werden in beiden Modellen EZM-relevante Gene signifikant hochreguliert. In KPC-Standard-Ko-Kulturen werden Gene wie Fibronectin1, TIMP1, Epregrulin oder MMP13, die teils auch aus anderen in-vitro-Studien mit PSC bekannt sind [60–63], zum 72 h Zeitpunkt signifikant hochreguliert, jedoch noch nicht zum 24 h Zeitpunkt. Dies lässt eine Zunahme der EZM-Stoffwechsel-Prozesse im Verlauf der Zeit vermuten. Fibronectin1 spielt zusammen mit Kollagenen eine wichtige Rolle im Tumorbindegewebe, unter anderem als Hauptbestandteil von Metastasen [60]. Zudem hat von PSC sezerniertes Fibronectin1 einen positiven Einfluss auf das Überleben von Tumorzellen [64], sowie ihre Chemoresistenz [65]. Eine Erhöhung von TIMP1 als Matrix-modulierendes Enzym wurde bereits in PSC-Sphäroid-Ko-Kulturen nachgewiesen [63]. Eine Hochregulation in Pankreaskarzinomen sowie eine Assoziation mit Ikterus und Kachexie ist bekannt [66]. In KC-Standard-Ko-Kulturen sind Prozesse des EZM-Stoffwechsels insbesondere nach 72 h signifikant erhöht. Dies zeigt sich zum Beispiel in hochregulierten GO-Annotationen wie „Tissue remodeling“ nach 72 h, aber auch in signifikanten Anreicherungen von einzelnen Genen wie MMP13 und GREM1. In den beiden Standard-Ko-Kulturen mit KC-Zellen und KPC-Zellen werden wenig Gene gemeinsam signifikant unterschiedlich exprimiert. Unter den gemeinsam exprimierten Genen wird jedoch das Gen MMP13 in beiden Kulturen zum 72 h Zeitpunkt signifikant stärker exprimiert. MMP13 übt diverse Funktionen im Stoffwechsel der EZM aus [67] und wird in humanen Pankreastumoren überexprimiert [68]. Auch über verschiedene Ko-Kultur-Modelle hinweg finden sich immer wieder auftauchende hochregulierte Gene des EZM-Stoffwechsels. Das Proteoglykan Versican wird beispielsweise sowohl in der Standard KPC-Ko-Kultur, als auch in den Inversen-Ko-Kulturen zu beiden Zeitpunkten signifikant stärker exprimiert. Eine Akkumulation von Versican im PDA und eine immunsuppressive Rolle ist beschrieben, es findet sich sogar schon in frühen Stadien der ADM eine vermehrte Akkumulation in KPC-Mäusen [69]. Eine wiederholte, signifikante Anreicherung von Versican über Modelle und unterschiedliche Tumorzellarten hinweg spricht für eine zentrale, schon früh relevante Rolle des Proteoglykans im Tumor-Stroma Stoffwechsel. In PSC in 3D-Kultur finden bereits ohne Tumorzelleinfluss diverse Veränderungen der EZM statt, auf diese wird in Kapitel 5.2.2 genauer eingegangen. Insgesamt sind diverse für den EZM-Stoffwechsel relevante Signalwege und Gene in allen 2D-Modellen signifikant hochreguliert,

wobei einige Gene wie beispielsweise Versican in unterschiedlichen Modellen mit unterschiedlichen Tumorzellarten vertreten sind.

5.1.3 Zytokin-Stoffwechsel und parakrine Kommunikation

Es ist eines der Ziele dieser Arbeit, die Kommunikation von PSC und Tumorzellen mittels Zytokinen genauer zu beleuchten und in den verschiedenen Modellen zu untersuchen. Die signifikante Anreicherung von Zytokin-relevanten Signalwegen in KEGG-Analysen in behandelten PSC bestätigt den vorhandenen parakrinen Austausch der Zellen in den verschiedenen etablierten Ko-Kulturen. Der KEGG-Signalweg Cytokine-cytokine receptor interaction wurde in den Inversen-Ko-Kulturen in beiden Modellen, KC921 und KPC, signifikant stärker in behandelten PSC angereichert. In den PSC der 3D-Ko-Kulturen sind nur wenig signifikante Unterschiede hinsichtlich der Genexpression im direkten Vergleich der behandelten Gruppen und Kontrollgruppen ersichtlich. Im zeitlichen Vergleich der behandelten PSC wird jedoch ebenfalls der Signalweg Cytokine-cytokine receptor interaction signifikant angereichert. In Standard-Ko-Kulturen werden zwar keine KEGG-Signalwege, aber dennoch einzelne Zytokine signifikant unterschiedlich exprimiert.

Mithilfe von Zell-Zell-kontaktlosen Ko-Kulturen wurde mehrfach die besondere Rolle der Zytokine als parakrines Kommunikationsmittel beleuchtet. Eine verstärkte Expression der Zytokine IL6, LIF und IL11 wurden bereits im Zusammenhang der Subtypisierung von Tumor-assoziierten Fibroblasten, speziell für den Subtyp der iCAF, beschrieben [17]. Öhlund et al. haben ebenfalls eine Zell-Zell-kontaktlose Ko-Kultur mithilfe eines Transwell-Einsatzes etabliert. Es bestehen jedoch erhebliche Unterschiede zum Versuchsaufbau der Zell-Zell-kontaktlosen Ko-Kulturen PSC dieser Arbeit, da einerseits PSC mit magnetischer 3D-Kultur anstelle von Matrigel inaktiviert wurden und andererseits verschiedene Tumorzellen und Tumorzelllinien anstelle von Organoiden als Partner der PSC in der Ko-Kultur eingesetzt wurden. Trotz bestehender Unterschiede im Versuchsaufbau im Vergleich zu Öhlund et al. werden auch in Ko-Kultur-Modellen dieser Arbeit die Zytokine IL6, LIF und IL11 zu verschiedenen Zeitpunkten signifikant hochreguliert. Daher ist anzunehmen, dass die genannten Zytokine konsistent und schon nach kurzer Zeit im parakrinen Austausch von PSC mit Pankreas-Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen. IL6 als proinflammatorisches Zytokin hat mehrere prominente Rollen im PDA. Es ist im Serum von PDA-Patienten erhöht und fördert über Aktivierung der kleinen GTPase CDC42 die Invasion von Tumorzellen in vitro sowie in vivo [70]. Zudem vermindert IL6 über die Aktivierung des STAT3-Signalweg das Ansprechen auf Chemotherapeutika des PDA [71]. In beiden Inversen-Ko-Kulturen ist eine deutlich stärkere Expression von IL6 zu beiden Zeitpunkten mit ansteigender Dynamik nachweisbar, wobei die Expression in der KPC-Ko-Kultur höher ist als in der KC921-Ko-

Kultur. Auch in 3D-PSC wird IL6 zum 72 h Zeitpunkt in behandelten PSC stärker exprimiert. Als einer der wichtigsten sezernierten Mediatoren aktivierter PSC hat LIF unter anderem Einfluss auf das Ansprechen von PDA-Zellen auf Chemotherapie und die Progression der Erkrankung [72]. LIF wird in beiden Inversen-Ko-Kulturen sowie in 3D-PSC signifikant stärker exprimiert, allerdings erst zum 72 h Zeitpunkt. In Standard-Ko-Kulturen ist keine signifikant unterschiedliche LIF-Expression zu verzeichnen. IL11 ist ein proinflammatorisches Zytokin mit proliferations- und Progressions-fördernden Eigenschaften im PDA [73]. Dem Zytokin IL11 wird zudem über die Aktivierung von STAT3 eine bedeutende Rolle bei der Progression von gastrointestinalen Tumoren zugesprochen [74]. IL11 ist in beiden Inversen-Ko-Kultur-Modellen zum 72 h Zeitpunkt signifikant erhöht, im KC921-Modell zusätzlich bereits zum 24 h Zeitpunkt. Die IL-11 Expression ist in 3D-PSC nicht nur im zeitlichen Verlauf von 24 h zu 72 h signifikant erhöht, auch im Vergleich von 3D-PSC zu 2D-PSC in KPC-Modellen ist die Expression in 3D-PSC signifikant stärker.

Der Ciliary-Neurotrophic-Factor-Rezeptor (CNTFR) wird zur Familie der IL6-Rezeptoren gezählt und ermöglicht als Ligand-bindende Domäne eines dreiteiligen Rezeptorkomplexes zusammen mit GP130 und LIF eine Signaltransduktion [75]. CNTFR wurde in dem schon oben beschriebenen Modell in der Arbeit von Öhlund et al. von PSC in Ko-Kultur geringer exprimiert als von PSC in Monokultur. Interessanterweise zählt CNTFR auch in dieser Arbeit zu den Genen, die von 3D-PSC zum 72 h Zeitpunkt geringer exprimiert werden. In Standard- und Inversion-Ko-Kulturen findet jedoch keine signifikant unterschiedliche Expression von CNTFR statt, dementsprechend ist davon auszugehen, dass diese Prozesse in der 2D-Ordnung nicht angestoßen werden. Zu den wenigen Genen, die im direkten Vergleich zu den Kontrollen in der 3D-Kultur signifikant stärker exprimiert werden, zählt das Zytokin CXCL1. CXCL1 hat einen fördernden Einfluss auf das Tumorzellwachstum des PDA und die Angiogenese und wird durch den Ras-Signalweg aktiviert. Eine hohe CXCL1-Expression mit einer geringeren Überlebenserwartung assoziiert [76; 77]. Dies zeigt, dass auch in der 3D-Kultur Karzinogenese-assoziierte Prozesse angestoßen wurden.

In der Standard-KPC-Ko-Kultur wird unter anderem das Zytokin TNFSF15 zu beiden Zeitpunkten signifikant stärker exprimiert, wobei zusätzlich ein deutlicher Anstieg im zeitlichen Verlauf zu beobachten ist. TNFSF15 als multifunktionelles Zytokin spielt sowohl eine Rolle in der Inhibierung des Wachstums von endothelialen Zellen, als auch in der Rekrutierung des Immunsystems [78]. In der Standard-KC-Ko-Kultur zeigt sich eine Heterogenität der Genexpression, die darauf hindeutet, dass durch die duktaalen KC-Zellen sowohl eine pro-, als auch eine antiinflammatorische Antwort hervorgerufen wird, wobei die inflammatorische Reaktion bei den behandelten PSC zu 24 h vermindert zu sein scheint. Eine heterogene Expression zeigt sich auch an einzelnen Genen: eine zeitliche Dynamik mit ansteigender

Expression im Verlauf der Zeit weist beispielsweise das Gen für das Glycoprotein NMB auf, welches im proinflammatorischen Milieu erhöht ist. Zu den im Vergleich zu den Kontrollen zu beiden Zeitpunkten herunterregulierten Genen zählen der Wachstums- und Motilitäts-stimulierende Faktor HGF oder das in Entzündungsreaktionen und Tumorigenese involvierte Chemokin Cxcl12 [79].

Die Expression diverser Gene wird durch das Vorherrschen eines inflammatorischen Milieus begünstigt, so auch die Expression des Gens PTX3. Pentraxin3 ist ein löslicher Rezeptor mit Funktion im Immunsystem und aktiviert unter anderem das Komplementsystem. Mit seinem Liganden TNFAIP6 übt PTX3 Einfluss auf den EZM-Stoffwechsel sowie die Tumorzell-Invasion aus und wird als Biomarker für das Pankreaskarzinom diskutiert [80]. Diese inflammatorisch getriggerte Expression kann aufgrund der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen bestätigt werden, wobei sowohl in beiden Standard-, als auch in beiden Inversen-Ko-Kulturen das Gen PTX3 signifikant stärker zum 72 h Zeitpunkt exprimiert wird. Hierbei sind die Unterschiede der Expression bei allen genannten Genen deutlicher im KPC- als im KC- beziehungsweise KC921-Modell, was die Induktion einer stärkeren Reaktion durch KPC-Zellen vermuten lässt.

In Summe ist in den Inversen-Ko-Kulturen beider Zellarten indirekt eine starke parakrine Antwort nachweisbar, wobei im KC921-Modell bereits früher stärkere Unterschiede sichtbar sind. In behandelten 3D-PSC, als auch in Inversen-Ko-Kulturen werden iCAF-assoziierte Zytokine signifikant stärker zum 72 h Zeitpunkt angereichert. Bei den Standard-Ko-Kulturen findet sich zwar keine signifikante Anreicherung der Zytokine wie IL6, IL11 oder LIF, dennoch werden Zytokine wie TNFSF15 und inflammatorische Mediatoren wie PTX3 signifikant angereichert. In KC-Standard-Ko-Kulturen zeigt sich ein heterogeneres Bild der Expression als in Standard-KPC-Ko-Kulturen, was für eine stärkere Triggerung der PSC durch KPC-Zellen als KC-Zellen spricht.

5.1.4 Tumor-assoziierte Signalwege im PDA und in PSC

Für das PDA sind verschiedene für die Karzinogenese relevante Signalwege beschrieben worden. Zu den am häufigsten im PDA aktivierten Signalwegen zählen unter anderem die MAPK- und PI3K-AKT-Signalwege, die unter anderem über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Epithelialen-Mesenchymalen-Transition führen [81; 82]. In-vitro-Studien zeigen, dass sezernierte Faktoren aus PSC Signalwege in Tumorzellen, wie den MAPK- und PI3K-AKT-Signalweg, aktivieren [83; 65]. Auch in PSC selbst spielt der PI3K-AKT-Signalweg eine Rolle, so wird über PDGF eine PI3K-AKT-medierte Migration von PSC ausgelöst [84]. Gene des PI3K-AKT-Signalweges werden in beiden Inversen-Ko-Kulturen zum 72 h Zeitpunkt signifikant stärker

exprimiert, sodass in dieser Arbeit von einer verstärkter Migrationsfähigkeit behandelter PSC auszugehen ist.

Auch der TGF β -Signalweg aktiviert über SMADs Transkriptionsfaktoren, die eine Epitheliale-Mesenchymale-Transition verursachen können [82]. Der TGF β -Signalweg hat in frühen Stadien der Karzinogenese des PDA eine Wachstums-inhibierende Funktion, im Verlauf der Zeit jedoch einen Tumorwachstum-fördernden Einfluss [85]. Eine Verschlechterung der Prognose ist in Zusammenhang mit einer Smad3-Hochregulation bereits beschrieben worden [86]. Auch in PSC weisen Smads als Vermittler von Signalen von der Zelloberfläche zum Zellkern eine regulatorische Funktion im TGF β -Signalweg auf [87]. TGF β 1, als Hauptverursacher von pankreatischer Fibrose, entfaltet über Smad2, Smad3 und Smad4 seine Wirkung. Zudem wird die Existenz von autokrinen Schleifen zwischen IL6 und TGF β 1 über Smad2 und Smad3-abhängige Signalwege diskutiert [84]. TGF β 1 ist im KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modell zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht. Smad3 ist sowohl im KC921-, als auch im KPC-Inversen-Ko-Kultur-Modellen in PSC zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht. Die hier beobachtete Hochregulation von Smad3 und TGF β 1 in in-vitro-Versuchen legt die Vermutung nahe, dass auch schon in frühen Stadien der Ko-Kultur Fibrose-fördernde Prozesse eingeleitet werden.

Eine Herunterregulation des Gens Klotho β wurde in diversen Tumoren, so auch im PDA beschrieben. Folge ist eine proliferationsfördernde Wirkung der Tumorzellen sowie ein anti-apoptotischer Effekt. Klotho β agiert hierbei unter anderem über den Insulin-like growth factor-Signalweg, den Wnt/ β Catenin-Signalweg und den Fibroblast growth factor-Signalweg [88]. In in-vitro-Versuchen inhibierte überexprimiertes Klotho β den Insulin-like growth factor-Signalweg sowie den Fibroblast growth factor-Signalweg. In-vivo sorgte eine Behandlung der Karzinomzellen mit Klotho β hingegen für ein vermindertes Tumorwachstum [89]. Bisher wurde insbesondere die Expression von Klotho β in Karzinomzellen untersucht, nicht im Tumorbindegewebe beziehungsweise PSC oder CAF. In PSC dieser Arbeit kann ebenfalls eine Klotho β Erniedrigung nachgewiesen werden. In der Inversen-KPC-Ko-Kultur ist Klotho β nach 72 h über 72-fach, in der Inversen-KC921-Ko-Kultur 15-fach im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. FGF2 ist hingegen signifikant in beiden Inversen-Ko-Kulturen hochreguliert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Rahmen der Karzinogenese eine Erniedrigung von Klotho β als potenzielles Tumorsuppressorgen nicht nur in den Karzinomzellen selbst, sondern auch in PSC/ CAF induziert wird.

Eine verminderte Expression pro-apoptotischer Faktoren kann das Tumorwachstum positiv fördern. Der Transkriptionsfaktor KLF2 induziert die Seneszenz von pankreatischen Tumorzellen.

Er wirkt zudem inhibierend auf eine durch onkogenes K-ras hervorgerufene maligne Transformation [90]. Eine verringerte Expression von KLF2 im humanen PDA wurde beschrieben [91]. Sowohl in der Standard-KC-, als auch in der Standard-KPC-Ko-Kultur wird das Gen KLF2 in beiden Ko-Kulturen zum 72 h Zeitpunkt signifikant schwächer exprimiert. Eine Kooperation von KLF2 mit FOXO4 zur Induktion von Seneszenz wurde beschrieben. Hierbei verringerte eine verminderte Expression von FOXO4 die durch KLF2 verursachte Seneszenz [91]. In PSC der Inversen-KC921 Kultur wird FOXO4 zum 72 h Zeitpunkt signifikant schwächer exprimiert. Derzeit sind die Folgen von erniedrigtem KLF2 in PSC noch nicht bekannt. Ob eine Herunterregulation von KLF2 proliferationsfördernde Wirkungen, analog zu humanem PDA-Gewebe hat, könnte Gegenstand weiterer Forschung sein.

5.1.5 Zuordnung der PSC zu CAF-Subgruppen

Diverse CAF-Subgruppen wurden anhand der Expression bestimmter Marker definiert [17; 19]. Der Subtyp der myCAF ist durch enge räumliche Nähe und direkten Zell-Zell-Kontakt zu Tumorzellen charakterisiert [17]. Wie erwartet zeigen sich daher PSC der Zell-Zell-kontaktlosen, parakrinen Modelle bei der Überprüfung einer myCAF-Signatur nicht zuordenbar. In zellkontaktlosen in vitro Ko-Kulturen von PSC und Tumorganoiden wird die Entwicklung der PSC hin zu einem iCAF-Phänotyp beschrieben [17]. Es zeigen sich in den Inversen-Ko-Kulturen dieser Arbeit signifikante Unterschiede hinsichtlich der Expression einiger Marker der iCAF/apCAF-Subtypen im Vergleich Behandlung vs. Kontrolle. Eine Abgrenzung ist, insbesondere in den KPC-Ko-Kulturen, besonders deutlich zum 72 h Zeitpunkt vorhanden. Dies lässt die Notwendigkeit eines gewissen Zeitraums zur Differenzierung der PSC in Subtypen vermuten. Sowohl dem Subtyp der iCAF, als auch dem Subtyp der apCAF zugeordnete Gene werden unterschiedlich von behandelten PSC exprimiert. Dieser heterogenen Expression von Genen, welche eine eindeutige Zuordenbarkeit zu einer definierten Gruppe erschwert, könnte das Vorliegen eines noch nicht definierten Subtyps beziehungsweise Misch-Subtyps zugrunde liegen, welcher sowohl Marker von iCAF, als auch apCAF-Marker exprimiert. Bei Betrachtung der Expression von iCAF-assoziierten Genen in den 3D-PSC im zeitlichen Verlauf zeigt sich zwar eine deutliche Gruppierung hinsichtlich 24 h und 72 h, jedoch werden hierbei einige Gene zum 24 h, einige zum 72 h Zeitpunkt stärker exprimiert. Es ist denkbar, dass auch innerhalb des definierten Subtyps der iCAFs PSC einem Wandel unterliegen und bestimmte Zytokine früher exprimiert werden und dann im zeitlichen Verlauf wieder abnehmen, andere wiederum erst ab einer gewissen Zeit nach Einwirken der Tumorzellen deutlich exprimiert werden. In Summe ist eine eindeutige Zuordnung der PSC zu einer bereits definierten Subgruppe anhand von bereits definierten CAF-Markern in keiner der Ko-Kultur Modelle möglich. Jedoch zeigen sich besonders

in den Inversen-Ko-Kultur Modellen signifikante Unterschiede im Hinblick auf iCAF- und apCAF-Marker, was an der unmittelbaren Nähe von PSC und Tumorzellen in diesem Modell liegen könnte.

5.2 Einfluss der Ko-Kultur-Modelle auf das Verhalten der PSC

Ein Aspekt dieser Arbeit ist die Ermittlung der Einflüsse der verschiedenen Kulturmodelle auf die Genexpressionsprofile der PSC. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden.

5.2.1 Ko-Kultur-Modelle: Standard-, 3D- und Inverse-Ko-Kultur

Etablierte PDA Ko-Kultur-Modelle lassen sich in Modelle mit direktem Zellkontakt, Misch-Kulturen [92] und Zell-Zell-kontaktlose Modelle einteilen [17; 63; 59]. Erstgenannte haben den Nachteil, dass sich einzelne Zellpopulationen nur schwer analysieren lassen, zudem liegt der Fokus dieser Arbeit auf der parakrinen Induktion einer Antwort, sodass ein direkter Zellkontakt unerwünscht ist. In bereits etablierten Zell-Zell-kontaktlosen Ko-Kulturen mit PSC wurden als Partner oft Tumor-Organoiden verwendet [63; 59]. Der Einsatz von Organoiden ist nur schwer standardisierbar, weshalb in dieser Arbeit Tumorzelllinien verwendet wurden. Immortalisierte PSC-Zelllinien sind einfach zu kultivieren und eine wiederholte Zell-Isolation aus Mäusen ist nicht notwendig. Sie finden daher oft Anwendung in Studien. Jedoch unterscheiden sie sich von Primärzell-PSC hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens, der Morphologie, sowie des Verhaltens bei Exposition gegenüber Tumorzellmedium [93]. Um ein möglichst realistisches Abbild der Situation in vivo zu erhalten, sind die in dieser Arbeit verwendeten PSC frisch isolierte murine Primärzellen. Auch wurden bereits 3D-Ko-Kulturen mit levitierten Zellen etabliert, wobei hier oftmals die Tumorzellen, nicht die PSC in 3D-Kultur gehalten wurden [63; 17]. Ko-Kultur Modelle unterscheiden sich bezüglich der differenziell exprimierten Gene. Inverse-Ko-Kulturen exprimieren deutlich mehr Gene unterschiedlich als die Vergleichsmodelle. Dieser bei den Inversen-Ko-Kulturen vorhandene, deutliche Unterschied könnte durch die verminderte Distanz der PSC von den Tumorzellen und einen so potenziell verstärkten Austausch erklärt werden (siehe Kapitel 4.5). Auch beim Vergleich der unterschiedlichen Modelle mit identischer verwendeter Tumorzellart, KPC-Zellen, bleibt die unterschiedliche hohe Anzahl differenziell exprimierter Gene in den Inversen-Modellen bestehen. Dies spricht dafür, dass der Anstieg durch den Einfluss des Kultur-Modells und nicht durch spezifische Tumorzellen verursacht wird. Im globalen Vergleich aller KPC-Ko-Kulturen zeigen sich keine gemeinsam differenziell exprimierten Gene, vermutlich sind hier die Einflüsse der Kultur-Modelle, vor allem die des 3D-Kultur-Modells, deutlich stärker als die der Tumorzellen. Jedoch weist eine zunehmende Clusterung in der PCA im Verlauf der Zeit zumindest in den 2D-Modellen darauf hin, dass die Einflüsse der Tumorzellen auf die PSC zunehmen. Abschließend wäre dies jedoch nur durch die

Beobachtung eines ausgedehnteren Zeitraums und die Hinzunahme eines weiteren Zeitpunkts zu klären. Vorläufer-Zellen verursachen eine stärkere Änderung der Anzahl signifikant unterschiedlich exprimierter Gene der PSC. Sowohl in der Standard-, als auch in der Inversen-Ko-Kultur tritt eine signifikante Expression zu beiden Zeitpunkten bei deutlich mehr Genen in der KC- und KC921-Kultur auf als in der KPC-Kultur. Jedoch sind hierbei die Unterschiede tendenziell schwächer, sodass vermutet werden kann, dass eine breite, aber unspezifische Antwort durch KC- und KC921-Zellen ausgelöst wird.

Zusammenfassend ist ein deutlicher Unterschied der Genexpression je nach Kultur-Modell feststellbar, wobei die Inverse-Ko-Kultur die stärkste Antwort der PSC im Sinne einer signifikanten Änderung des Genexpressionsprofils hervorruft.

5.2.2 Verhalten von PSC in multizellulären Sphäroiden

Frühere Analysen der PSC in 3D-Kultur ohne Tumorzelleinfluss zeigten die Heterogenität der PSC in einem multizellulären Aggregat. Es wurden für das Mikromilieu der MCS diverse mathematischen Modelle aufgestellt, die sich allerdings an stark proliferierenden Tumorzellen orientieren und so von den in dieser Arbeit verwendeten PSC unterscheiden [94]. Ab einer gewissen Größe ($> 500 \mu\text{m}$) weisen nicht alle Zellen im Sphäroid die gleichen Eigenschaften auf. Ein nekrotischer Kern wird von einer Zone mit ruhenden Zellen, diese wiederum von einer proliferierenden Zone umgeben. In diesem Schicht-Modell bestehen zwei Gradienten: ein Richtung Zentrum hin abnehmender Gradient aus Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren und ein entgegengesetzter Gradient aus Metaboliten [57]. Experimentell wurden die unterschiedlichen Gradienten innerhalb eines Sphäroids unter anderem mit Mikroelektroden die den Sauerstoffdruck messen [95], oder auch mit pH-Messungen nachgewiesen [96]. Dies war in dieser Arbeit aufgrund des technischen Aufwands nicht möglich. In der Zusammenschau der Daten der RNASeq-Analyse, des zeitlichen Verlaufs der RNA-Ausbeute in den 3D-Experimenten und der Größe der in dieser Arbeit erzeugten MCS ist jedoch auch hier die Existenz von Gradienten und unterschiedlichen Zonen denkbar. Unter der Annahme, dass ein potenzieller nekrotischer Kern sich im Verlauf der Zeit ausdehnt, könnte auch die geringere RNA-Ausbeute sowohl von behandelten PSC, als auch von Kontroll-PSC zum 72 h Zeitpunkt erklärt werden. Mit dieser Vermutung übereinstimmend ist die signifikante Hochregulation der Prozesse „Response to hypoxia“ und „Response to decreased oxygen levels“ der GO-BP-Analysen bei 72 h im Vergleich zu 24 h. Auch die signifikant stärkere Anreicherung des HIF-1-Signalwegs und des Signalwegs Ferroptose bei den 3D-Kulturen zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zur 2D-Kultur bekräftigt die Hypothese eines vorhandenen nekrotischen Kerns der MCS. Der Hypoxie induzierbare Faktor (HIF), spielt eine entscheidende Rolle bei der Anpassung

von Zellen im Fall einer mangelnden Sauerstoffversorgung [97]. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen in 3D-Kultur aufgrund der Kultivierung als kugelförmiges Zellaggregat einen verminderten Zugang zu Nährstoffen und Sauerstoff im Vergleich zu der Monolayer-2D-Kultur haben, was die verstärkte Expression von Genen des HIF-Signalwegs zur Folge hat. Die Ferroptose wird als eigenständiger, nicht-apoptotischer Zelltod durch die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht [98]. Ein vermehrter Zelltod ist mit der verminderten relativen RNA-Ausbeute in 3D-PSC-Experimenten kongruent. Im zeitlichen Verlauf findet zudem eine verändernde Organisation der Zellen im Zellverband statt. Es besteht ein zeitlich signifikant unterschiedliches, allerdings heterogenes Bild der Integrin- und Cadherin-Expression. KEGG-Analysen zeigen den Signalweg EZM-Rezeptor-Interaktion zum 24 h Zeitpunkt und den Rap1-Signalweg zum 72 h Zeitpunkt signifikant angereichert. Eine Bedeutung der kleinen GTPase Rap1 wird in diversen Prozessen der Zelladhäsion postuliert, unter anderem sowohl in Cadherin-, als auch in Integrin-Bindungen [99]. Es scheint, dass zu unterschiedlichen Zeiten der Levitation unterschiedliche Prozesse der Produktion und Organisation von EZM und Zelladhäsion im MCS von Bedeutung sind.

5.2.3 Einfluss der Tumorzellen auf PSC in 3D-Kultur

In 3D-PSC werden im direkten Vergleich mit ihren Kontrollen auffallend wenige Gene signifikant unterschiedlich exprimiert, wofür verschiedene Ursachen möglich sind. Zum einen geht mit dem Aufbau der 3D-Kultur eine stärkere Heterogenität der PSC als in 2D-Kulturen einher. Heterogen meint hierbei den unterschiedlichen biologischen Zustand und das dadurch sich unterscheidende Genexpressionsprofil der einzelnen PSC. Daraus folgt subsequent eine stärkere Heterogenität der einzelnen biologischen Replikate in 3D-Kultur-Modellen im Vergleich zu 2D-Kultur-Modellen. Bedingt durch die Heterogenität der Replikate könnten bei einer Gruppenbildung kleine Veränderungen nicht über die experimentellen Unsicherheiten hinaus in Erscheinung treten. Die Interpretation der Ergebnisse und ein Vergleich der Proben untereinander wird dadurch erschwert. Zum anderen könnten im Multizellulären-3D-Aggregat angestoßene, zellbiologische, autokrine Prozesse einen stärkeren Einfluss auf das gesamte Genexpressionsprofil der PSC haben als die parakrinen Einflüsse der Tumorzellen und so den Einfluss der Tumorzellen maskieren. Hinweis dafür ist ein sehr deutlicher Unterschied der 3D-Kulturen im zeitlichen Verlauf (siehe Kapitel 4.6.7), als auch ein deutlicher Unterschied der 3D-Kultur zu Proben der 2D-Kultur (siehe Kapitel 4.6.8). Zusammenfassend ist der Einfluss der 3D-Kultur auf PSC ohne Tumorzellen bereits gravierend, sodass ein Überwiegen des Einflusses des Kultur-Modells in der relativ kurzen Dauer der Ko-Kultur mit Tumorzellen wahrscheinlich ist.

Dennoch sind Einflüsse der Tumorzellen sichtbar, auch wenn diese nicht so ausgeprägt sind wie in den anderen Ko-Kultur-Modellen.

5.2.4 Inaktivität von PSC in magnetischer 3D-Kultur

Die magnetische 3D-Kultur, und besonders die Inaktivierung von PSC mittels magnetischer 3D-Kultur, ist eine neuartige Methode. Es ist bekannt, dass die Kultivierung von PSC in Matrigel einen inaktiven Phänotyp hervorruft. Zu diesem inaktiven Phänotyp zählen unter anderem die verminderte Expression von α -SMA und CTGF, die Veränderung der Zellmorphologie von einer spindelförmigen hin zu einer abgerundeten Form und die Anreicherung von zytoplasmatischen Lipid-Droplets [16]. Als biologisches Produkt kann bei der Verwendung von Matrigel jedoch die Qualität der Chargen schwanken, eine Kontamination mit Viren ist möglich und zudem sind oft Wachstumsfaktoren enthalten, die einen eigenständigen Einfluss auf die Zellen ausüben könnten [29]. Daher wurde in dieser Arbeit die magnetische 3D-Levitation der PSC eingesetzt. Die reduzierte Expression verschiedener Aktivierungsmarker wie α -SMA, CTGF und FAP, die sowohl immunhistochemisch, als auch auf RNA-Ebene nachgewiesen werden können, deutet auf die Inaktivierung hin. Auch die steigende und unterschiedlich signifikante Expression von Perilipin 2 (PLIN2) im zeitlichen Verlauf, welchem Lipid-Droplet fördernde Eigenschaften zugesprochen werden [100], entspricht einem Charakteristikum ruhender PSC. Lipid-Droplets werden ebenfalls immunhistochemisch in 3D-PSC nachgewiesen (siehe Kapitel 4.3). Die in 2D-PSC signifikant stärker exprimierte Signalwege der KEGG-Analyse wie DNA replication und der Signalweg Regulation of actin cytoskeleton zeugen von einer verminderten transkriptionellen Aktivität sowie einer Abwendung des für die 2D-Kultur typischen, myofibroblastischen Phänotyps der Zellen in 3D-Kultur. Jedoch wirft die unterschiedliche Zytokinexpression in 2D-Kulturen und 3D-PSC Fragen auf. Möglicherweise handelt es sich eher um eine Transformation von einem myofibroblastischen Phänotyp hin zu einem neuartigen Zustand, der zwar durch eine geringe Expression von α -SMA und anderen Markern, allerdings auch durch eine im Vergleich zur 2D-Kultur gesteigerten Zytokinproduktion gekennzeichnet ist. Auch wenn filamentöse Verbindungen bei einer Kultivierung der PSC in Matrigel beschrieben wurden [16], sind diese optisch von der Stärke nicht vergleichbar mit der Vernetzung der PSC in der magnetischen 3D-Kultur. Die beobachtete Verdichtung ist nicht nur auf magnetische Kräfte durch Nano-Shuttle Partikel, sondern auch auf eine vorhandene interzelluläre EZM-ähnliche Substanz zurückführbar (Abbildung 9).

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Genexpressionsprofile der PSC analysiert. Um das Bild der Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen zu komplettieren, wäre auch die Analyse der Genexpressionsprofile der unterschiedlichen Tumorzellen von Interesse. So könnte beispielsweise untersucht werden, ob die im zeitlichen Vergleich in den Ko-Kulturen erhöhten IL6-Spiegel sich auch in einer Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs als einer der Adressaten des Zytokins in den Tumorzellen äußern, wie es schon für Ko-Kulturen mit Tumororganoiden beschrieben wurde [17]. Auch eine Aktivierung weiterer, in PSC dieser Arbeit aktivierter Signalwege (siehe Kapitel 5.1.4) könnte in Tumorzellen und Tumorzellvorläufern untersucht werden. In fortführenden Arbeiten könnte durch die Analyse weiterer, längerer Zeiträume eine höhere zeitliche Auflösung und ein eindeutigeres Bild eines etwaigen zeitlichen Verlaufs erlangt werden. Dies wäre sowohl für den Verlauf der Expression gewisser Zytokine, als auch für die eindeutigere Zuordnung von PSC zu CAF-Subtypen hilfreich. Weitere Forschung bezüglich der Zell-Heterogenität der PSC in magnetischer 3D-Kultur mittels Single-Cell-RNA-Sequencing Methoden, dem Einsatz unterschiedlicher Startzellzahlen und der Hinzunahme weiterer Replikate könnte Aufschluss über die Entwicklung und den Zustand der einzelnen PSC geben. Auch ein Einfluss der Tumorzellen beispielsweise hinsichtlich proliferationsfördernder Effekte würde so gegebenenfalls stärker zum Vorschein kommen. Für verschiedene Methoden der Inaktivierung der PSC, wie Matrigel, wurde deren Reversibilität beschrieben. Nach einer Transformation hin zu einem inaktiven Zustand konnten PSC ebenso in Standard-Kultur wieder in einen aktiven Zustand versetzt werden [17]. Ob PSC nach Kultivierung in magnetischer 3D-Levitation in anschließender 2D-Kultur wieder einen myofibroblastischen Phänotyp annehmen, ist noch nicht bekannt und könnte ebenfalls Gegenstand weiterer Forschung sein.

6. Zusammenfassung

Um die Wechselwirkungen von PSC mit Tumorzellen des PDA genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene zellkontaktlose Ko-Kultur-Modelle etabliert: Standard-, 3D- und Inverse-Ko-Kultur. PSC der verschiedenen Modelle unterscheiden sich bezüglich ihrer Genexpressionsprofile im Hinblick auf Stärke und Qualität. Ein proliferationsfördernder Einfluss der Tumorzellen auf PSC kann in den 2D-Kultur-Modellen nachgewiesen werden. Diverse Signalwege und Gene des EZM-Stoffwechsels werden insbesondere zum späteren Zeitpunkt signifikant stärker von behandelten PSC der 2D-Kulturen exprimiert. Auch wenn sich diverse Unterschiede zwischen KC- und KPC-Modellen zeigen, finden sich ebenfalls gemeinsam exprimierte Gene, wie beispielweise Versican, was auf eine zentrale, frühe Schlüsselstellung dieser Gene im Tumorbindegewebe schließen lässt. Die vermehrte parakrine Kommunikation der PSC mit den Tumorzellen mittels Zytokinen wird in allen Ko-Kultur-Modellen in unterschiedlich starken Ausprägungen deutlich, unter anderem spielen hier die Zytokine IL6, LIF und IL11 eine Rolle. Eine Expression von in der Karzinogenese des PDA relevanten Signalwegen wie des PI3K-AKT-Signalwegs kann insbesondere in Inversen-Ko-Kultur-Modellen gezeigt werden. Bei dem Versuch der Zuordnung der PSC zu bekannten CAF-Subgruppen kann die Expression diverser iCAF- und apCAF-assoziiierter Gene festgestellt werden, auch wenn die eindeutige Zuordnung zu einem Subtyp nicht abschließend vorgenommen werden kann. Magnetisch levitierte 3D-PSC zeigen bereits ohne den Einfluss von Tumorzellen eine starke Veränderung ihres Genexpressionsprofils im zeitlichen Verlauf. Eine Inaktivierung der 3D-PSC kann gezeigt werden, im Vergleich zu bekannten Inaktivierungsmethoden sind dennoch Unterschiede im Expressionsmuster der PSC feststellbar. In allen Modellen zeichnet sich eine zunehmende Antwort der PSC auf die Signale der Tumorzellen im Verlauf der Zeit ab. Die stärkste Veränderung ist in Inversen-Ko-Kulturen sichtbar, was durch die verminderte Distanz der Zellen zueinander im Vergleich zu den anderen Ko-Kulturen erklärt wird. Der Vergleich aller KPC-Modelle, der keine gemeinsam exprimierten Gene ergibt, verdeutlicht den Einfluss der Kultur-Methode auf die Genexpression der PSC. KPC-Zellen lösen insgesamt eine stärkere Veränderung aus als KC- oder KC921-Zellen. Diese Arbeit demonstriert den Einfluss unterschiedlicher Kultur-Methoden auf das Genexpressionsprofil der PSC. Mit der magnetischen 3D-Ko-Kultur wurde ein neuartiges Modell etabliert, welches sowohl Ergebnisse bekannter Forschungsarbeiten reproduziert, als auch neue Fragen aufwirft. Der Einfluss der räumlichen Nähe von PSC und Tumorzellen auf die Stärke der Zellkommunikation und somit auch das Genexpressionsprofil wurde demonstriert. Weitere Forschung ist notwendig, um die parakrine Kommunikation von PSC in verschiedenen Kultur-Modellen weiter zu beleuchten.

7. Literatur

- [1] Safran M, Rosen N, Twik M, BarShir R, Stein TI, Dahary D, Fishilevich S, Lancet D: The GeneCards Suite. In: Abugessaisa I, Kasukawa T (Hrsg): Practical Guide to Life Science Databases. Springer, Singapore, 2021, S. 27–56.
- [2] Oberg K und Eriksson B (2005) Endocrine tumours of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19:753–781.
- [3] Al-Hader A, Al-Rohil RN, Han H, Hoff D von (2017) Pancreatic acinar cell carcinoma: A review on molecular profiling of patient tumors. *World J Gastroenterol* 23:7945–7951.
- [4] Ilic M und Ilic I (2016) Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 22:9694–9705.
- [5] Cancer tomorrow: A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden. Estimated number of deaths from 2020 to 2030. gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2030&single_unit=50000&cancers=13&types=1. Zugegriffen: 13. Dezember 2022
- [6] Cancer tomorrow: A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden. Estimated number of deaths from 2020 to 2040. gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2040&single_unit=50000&cancers=13&types=1. Zugegriffen: 13. Dezember 2022
- [7] Mizrahi JD, Surana R, Valle JW, Shroff RT (2020) Pancreatic cancer. *The Lancet* 395:2008–2020.
- [8] S3 - Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom, Gültig bis: 31.07.2024. register.awmf.org/assets/guidelines/032-0100LI_Exokrines-Pankreaskarzinom_2022-12.pdf. Zugegriffen: 13. Dezember 2022
- [9] Morris JP, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M (2010) Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* 120:508–520.
- [10] Lee JW, Komar CA, Bengsch F, Graham K, Beatty GL (2016) Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Cancer: The KPC Model (LSL-Kras(G12D/+); LSL-Trp53(R172H/+); Pdx-1-Cre), Its Variants, and Their Application in Immuno-oncology Drug Discovery. *Curr Protoc Pharmacol* 73:14.39.1-14.39.20.
- [11] Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7:469–483.
- [12] Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M (2007) Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11:291–302.
- [13] Bynigeri RR, Jakkampudi A, Jangala R, Subramanyam C, Sasikala M, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R (2017) Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J Gastroenterol* 23:382–405.
- [14] Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS (1998) Peri-acinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut* 43:128–133.
- [15] Means AL (2013) Pancreatic stellate cells: small cells with a big role in tissue homeostasis. *Lab Invest* 93:4–7.
- [16] Jesnowski R, Fürst D, Ringel J (2005) Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab Invest* 85:1276–1291.

- [17] Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, Chio IIC, Hwang C-I, Tiriác H, Baker LA, Engle DD, Feig C, Kultti A, Egeblad M, Fearon DT, Crawford JM, Clevers H, Park Y, Tuveson DA (2017) Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* 214:579–596.
- [18] Sherman MH, Yu RT, Tseng TW, Sousa CM, Liu S, Truitt ML, He N, Ding N, Liddle C, Atkins AR, Leblanc M, Collisson EA, Asara JM, Kimmelman AC, Downes M, Evans RM (2017) Stromal cues regulate the pancreatic cancer epigenome and metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:1129–1134.
- [19] Vennin C, Méléneć P, Rouet R, Nobis M, Cazet AS, Murphy KJ, Herrmann D, Reed DA, Lucas MC, Warren SC, Elgundi Z, Pinese M, Kalna G, Roden D, Samuel M, Zaratzian A, Grey ST, Da Silva A, Leung W, Mathivanan S, Wang Y, Braithwaite AW, Christ D, Benda A, Parkin A, Phillips PA, Whitelock JM, Gill AJ, Sansom OJ, Croucher DR, Parker BL, Pajic M, Morton JP, Cox TR, Timpson P (2019) CAF hierarchy driven by pancreatic cancer cell p53-status creates a pro-metastatic and chemoresistant environment via perlecan. *Nat Commun* 10:3637.
- [20] Provenzano PP und Hingorani SR (2013) Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer. *Br J Cancer* 108:1–8.
- [21] Apte MV, Xu Z, Pothula S, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS (2015) Pancreatic cancer: The microenvironment needs attention too! *Pancreatology* 15:32–38.
- [22] Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, Jesus-Acosta A de, Sharma P, Heidari P, Mahmood U, Chin L, Moses HL, Weaver VM, Maitra A, Allison JP, LeBleu VS, Kalluri R (2014) Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell* 25:719–734.
- [23] Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, Teinor JA, Belleau P, Biffi G, Lucito MS, Sivajothi S, Armstrong TD, Engle DD, Yu KH, Hao Y, Wolfgang CL, Park Y, Preall J, Jaffee EM, Califano A, Robson P, Tuveson DA (2019) Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer Discov* 9:1102–1123.
- [24] Chen K, Wang Q, Li M, Guo H, Liu W, Wang F, Tian X, Yang Y (2021) Single-cell RNA-seq reveals dynamic change in tumor microenvironment during pancreatic ductal adenocarcinoma malignant progression. *EBioMedicine* 66:2352–3964.
- [25] Herreros-Villanueva M, Hijona E, Cosme A, Bujanda L (2012) Mouse models of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 18:1286–1294.
- [26] Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4:437–450.
- [27] Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T (2004) Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119:847–860.
- [28] Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10:57–63.
- [29] Schmitz S: *Der Experimentator: Zellkultur*. 4. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg. 2020. S. 191–205.
- [30] Souza GR, Molina JR, Raphael RM, Ozawa MG, Stark DJ, Levin CS, Bronk LF, Ananta JS, Mandelin J, Georgescu M-M, Bankson JA, Gelovani JG, Killian TC, Arap W, Pasqualini R (2010) Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nature Nanotech* 5:291–296.

- [31] Caleffi JT, Aal MCE, Gallindo HdOM, Caxali GH, Crulhas BP, Ribeiro AO, Souza GR, Delella FK (2021) Magnetic 3D cell culture: State of the art and current advances. *Life Sciences* 286:1–8.
- [32] T123 – Technical Bulletin. tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf. Zugegriffen: 04. Februar 2021
- [33] Nordheim A und Knippers R: *Molekulare Genetik*. 10 Aufl. Thieme, Stuttgart. 2016. S. 475–486.
- [34] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28:511–515.
- [35] Anders S und Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Nat Prec* 11:1–12.
- [36] Benjamini Y und Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc* 57:289–300.
- [37] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25–29.
- [38] Kanehisa M (1996) Toward pathway engineering: a new database of genetic and molecular pathways. *Science & Technology Japan* 59:34–38.
- [39] Kanehisa M und Goto S (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–30.
- [40] Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Aufl. Springer, Heidelberg. 2007. S. 241–248.
- [41] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263–273.
- [42] Holzapfel B und Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biol. Unserer Zeit* 37:120–126.
- [43] McCurdy RD, McGrath JJ, Mackay-Sim A (2008) Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. *Gene Ther Mol Biol* 12:15–24.
- [44] Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 10:92–95.
- [45] Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:1–11.
- [46] Hogan M, Souza G, Birla R (2016) Assembly of a functional 3D primary cardiac construct using magnetic levitation. *AIMS Bioengineering* 3:277–288.
- [47] Meng F-T, Huang M, Fan F-F, Shao F, Wang C, Huang Q (2019) A modified method for isolating human quiescent pancreatic stellate cells. *Cancer Manag Res* 11:1533–1539.
- [48] Spurr AR (1969) A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31–43.
- [49] Die Interpretation des p-Wertes – Grundsätzliche Missverständnisse. www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jbnst-2015-1030/html?lang=de. Zugegriffen: 13.12.22
- [50] Agbunag C und Bar-Sagi D (2004) Oncogenic K-ras drives cell cycle progression and phenotypic conversion of primary pancreatic duct epithelial cells. *Cancer Res* 64:5659–5663.

- [51] Erkan M, Adler G, Apte VM (2012) StellaTUM current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* 61:172–178.
- [52] Hingorani SR, Petricoin III EF, Maitra A (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4:437–450.
- [53] Su GH: Pancreatic cancer. *Methods and protocols*. Humana Press, Totowa N.J. 2005. S. 120-123.
- [54] Standards, Guidelines and Best Practices for RNA-Seq. genome.ucsc.edu/ENCODE/protocols/dataStandards/ENCODE_RNAseq_Standards_V1.0.pdf. Zugegriffen: 13. Dezember 2022
- [55] Jolliffe IT und Cadima J (2016) Principal component analysis: a review and recent developments. *Phil. Trans. R. Soc. A*. 374:1–16.
- [56] Rabin RL: CC, C, and CX3C Chemokines. In: Norman AW, Henry HL (Hrsg): *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier Science Ltd., 2003, S. 255-263.
- [57] Lin R-Z, Lin R-Z, Chang H-Y (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3:1172–1184.
- [58] Jaganathan H, Gage J, Leonard F, Srinivasan S, Souza GR, Dave B, Godin B (2014) Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci Rep* 4:1–9.
- [59] Lee J-H, Kim S-K, Khawar IA, Jeong S-Y, Chung S, Kuh H-J (2018) Microfluidic co-culture of pancreatic tumor spheroids with stellate cells as a novel 3D model for investigation of stroma-mediated cell motility and drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res* 37:1–12.
- [60] Bachem MG, Schönemann M, Ramadani M, Siech M, Beger H, Buck A, Zhou S, Schmid-Kotsas A, Adler G (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. *Gastroenterology* 128:907–921.
- [61] Erkan M, Kleeff J, Gorbachevski A, Reiser C, Mitkus T, Esposito I, Giese T, Büchler MW, Giese NA, Friess H (2007) Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology* 132:1447–1464.
- [62] Yoshida S, Yokota T, Ujiki M, Ding X-Z, Pelham C, Adrian TE, Talamonti MS, Bell RH, Denham W (2004) Pancreatic cancer stimulates pancreatic stellate cell proliferation and TIMP-1 production through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1241–1245.
- [63] Hwang HJ, Oh M-S, Lee DW, Kuh H-J (2019) Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells. *J Exp Clin Cancer Res* 38:1–14.
- [64] Pandol S, Gukovskaya A, Edderkaoui M, Edderkoui M, Dawson D, Eibl G, Lugea A (2012) Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol* 27:127–134.
- [65] Wu Y, Zhang C, Jiang K, Werner J, Bazhin AV, D'Haese JG (2020) The Role of Stellate Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Targeting Perspectives. *Front Oncol* 10:1–16.
- [66] Prokopchuk O, Grünwald B, Nitsche U, Jäger C, Prokopchuk OL, Schubert EC, Friess H, Martignoni ME, Krüger A (2018) Elevated systemic levels of the matrix metalloproteinase inhibitor TIMP-1 correlate with clinical markers of cachexia in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *BMC Cancer* 18:1–12.
- [67] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:221–233.
- [68] Slapak EJ, Duitman J, Tekin C, Bijlsma MF, Spek CA (2020) Matrix Metalloproteases in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Key Drivers of Disease Progression? *Biology* 9:1–21.

- [69] Versican production is driven by both epithelial and stromal cells in pancreatic cancer. aacrjournals.org/cancerres/article/79/13_Supplement/1904/633946/Abstract-1904-Versican-production-is-driven-by. Zugegriffen: 13. Dezember 2022
- [70] Razidlo GL, Burton KM, McNiven MA (2018) Interleukin-6 promotes pancreatic cancer cell migration by rapidly activating the small GTPase CDC42. *J Biol Chem* 293:11143–11153.
- [71] Whittle MC und Hingorani SR (2019) Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Mechanisms and Therapeutic Targets. *Gastroenterology* 156:2085–2096.
- [72] Shi Y, Gao W, Lytle NK, Huang P, Yuan X, Dann AM, Ridinger-Saison M, DelGiorno KE, Antal CE, Liang G, Atkins AR, Erikson G, Sun H, Meisenhelder J, Terenziani E, Woo G, Fang L, Santisakultarm TP, Manor U, Xu R, Becerra CR, Borazanci E, Hoff DD von, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Leblanc M, Umetsu SE, Collisson EA, Scadeng M, Lowy AM, Donahue TR, Reya T, Downes M, Evans RM, Wahl GM, Pawson T, Tian R, Hunter T (2019) Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. *Nature* 569:131–135.
- [73] Ren C, Chen Y, Han C, Fu D, Chen H (2014) Plasma interleukin-11 (IL-11) levels have diagnostic and prognostic roles in patients with pancreatic cancer. *Tumour Biol* 35:11467–11472.
- [74] Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttill RA, Wilson NJ, Ziegler PK, Nguyen PM, Preaudet A, Farid R, Edwards KM, Boglev Y, Luwor RB, Jarnicki A, Horst D, Boussioutas A, Heath JK, Sieber OM, Pleines I, Kile BT, Nash A, Greten FR, McKenzie BS, Ernst M (2013) Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell* 24:257–271.
- [75] Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59–63.
- [76] Balkwill FR (2012) The chemokine system and cancer. *J Pathol* 226:148–157.
- [77] Zhang Z, Chen Y, Jiang Y, Luo Y, Zhang H, Zhan Y (2019) Prognostic and clinicopathological significance of CXCL1 in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Biol Ther* 20:1380–1388.
- [78] Zhang Z und Li L-Y (2012) TNFSF15 Modulates Neovascularization and Inflammation. *Cancer Microenviron* 5:237–247.
- [79] Janssens R, Struyf S, Proost P (2018) The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol* 15:299–311.
- [80] Goulart MR, Watt J, Siddiqui I, Lawlor RT, Imrali A, Hughes C, Saad A, ChinAleong J, Hurt C, Cox C, Salvia R, Mantovani A, Crnogorac-Jurcevic T, Mukherjee S, Scarpa A, Allavena P, Kocher HM (2021) Pentraxin 3 is a stromally-derived biomarker for detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *NPJ Precis Oncol* 5:1–10.
- [81] Benitz S, Straub T, Mahajan UM, Mutter J, Czerniak S, Unruh T, Wingerath B, Deubler S, Fahr L, Cheng T, Nahnsen S, Bruns P, Kong B, Raulefs S, Ceyhan GO, Mayerle J, Steiger K, Esposito I, Kleeff J, Michalski CW, Regel I (2019) Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. *Gut* 68:2007–2018.
- [82] Polireddy K und Chen Q (2016) Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment. *J Cancer* 7:1497–1514.
- [83] Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008) Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68:918–926.
- [84] Masamune A und Shimosegawa T (2009) Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J Gastroenterol* 44:249–260.

- [85] Shen W, Tao G-Q, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian Z-Q (2017) TGF- β in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci* 7:1–7.
- [86] Yamazaki K, Masugi Y, Effendi K, Tsujikawa H, Hiraoka N, Kitago M, Shinoda M, Itano O, Tanabe M, Kitagawa Y, Sakamoto M (2014) Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest* 94:683–691.
- [87] Singh P, Wig JD, Srinivasan R (2011) The Smad family and its role in pancreatic cancer. *Indian J Cancer* 48:351–360.
- [88] Zhou X und Wang X (2015) Klotho: a novel biomarker for cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 141:961–969.
- [89] Abramovitz L, Rubinek T, Ligumsky H, Bose S, Barshack I, Avivi C, Kaufman B, Wolf I (2011) KL1 internal repeat mediates klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 17:4254–4266.
- [90] Zhang D, Dai Y, Cai Y, Suo T, Liu H, Wang Y, Cheng Z, Liu H (2016) KLF2 is downregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibits the growth and migration of cancer cells. *Tumour Biol* 37:3425–3431.
- [91] Yuedi D, Houbao L, Pinxiang L, Hui W, Min T, Dexiang Z (2020) KLF2 induces the senescence of pancreatic cancer cells by cooperating with FOXO4 to upregulate p21. *Exp Cell Res* 388:1–8.
- [92] Norberg KJ, Liu X, Fernández Moro C, Strell C, Nania S, Blümel M, Balboni A, Bozóky B, Heuchel RL, Löhr JM (2020) A novel pancreatic tumour and stellate cell 3D co-culture spheroid model. *BMC Cancer* 20:1–13.
- [93] Lenggenhager D, Amrutkar M, Sántha P, Aasrum M, Löhr J-M, Gladhaug IP, Verbeke CS (2019) Commonly Used Pancreatic Stellate Cell Cultures Differ Phenotypically and in Their Interactions with Pancreatic Cancer Cells. *Cells* 8:1–18.
- [94] Jiang Y, Pjesivac-Grbovic J, Cantrell C, Freyer JP (2005) A multiscale model for avascular tumor growth. *Biophys J* 89:3884–3894.
- [95] Mueller-Klieser W (1984) Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophys J* 46:343–348.
- [96] Carlsson J und Acker H (1988) Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *Int. J. Cancer* 42:715–720.
- [97] Semenza GL (1998) Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Current Opinion in Genetics & Development* 8:588–594.
- [98] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, Stockwell BR (2012) Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149:1060–1072.
- [99] Boettner B und van Aelst L (2009) Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. *Curr Opin Cell Biol* 21:684–693.
- [100] Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S (2017) Identification of markers for quiescent pancreatic stellate cells in the normal human pancreas. *Histochem Cell Biol* 148:359–380.
- [101] Liot S, Balas J, Aubert A, Prigent L, Mercier-Gouy P, Verrier B, Bertolino P, Hennino A, Valcourt U, Lambert E (2021) Stroma Involvement in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Overview Focusing on Extracellular Matrix Proteins. *Front Immunol* 12:1–12.
- [102] Picornell Y, Mei L, Taylor K, Yang H, Targan SR, Rotter JI (2007) TNFSF15 is an ethnic-specific IBD gene. *Inflamm Bowel Dis* 13:1333–1338.
- [103] Polster A, Dittmer PJ, Perni S, Bichraoui H, Sather WA, Beam KG (2018) Stac Proteins Suppress Ca²⁺-Dependent Inactivation of Neuronal I-type Ca²⁺ Channels. *J Neurosci* 38:9215–9227.

- [104] Sun J, Liu X, Gao H, Zhang L, Ji Q, Wang Z, Zhou L, Wang Y, Sui H, Fan Z, Li Q (2017) Overexpression of colorectal cancer oncogene *CHRD12* predicts a poor prognosis. *Oncotarget* 8:11489–11506.
- [105] Chaillou T, Hynynen H, Ferreira D, Pironti G, Kenne E, Andersson DC, Ruas JL, Tavi P, Lanner JT (2016) *NDUFA4L2* – Connecting Metabolic Signals and Mitochondrial Function in Cardiac and Skeletal Muscle. *Free Radic Biol Med* 100:186.
- [106] Zhu Z, Kleeff J, Friess H, Wang L, Zimmermann A, Yarden Y, Büchler MW, Korc M (2000) Epiregulin is Up-regulated in pancreatic cancer and stimulates pancreatic cancer cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 273:1019–1024.
- [107] Amrutkar M, Aasrum M, Verbeke CS, Gladhaug IP (2019) Secretion of fibronectin by human pancreatic stellate cells promotes chemoresistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* 19:1–16.
- [108] Mathew SJ, Hansen JM, Merrell AJ, Murphy MM, Lawson JA, Hutcheson DA, Hansen MS, Angus-Hill M, Kardon G (2011) Connective tissue fibroblasts and *Tcf4* regulate myogenesis. *Development* 138:371–384.
- [109] Fliegau M, Fröhlich C, Horvath J, Olbrich H, Hildebrandt F, Omran H (2003) Identification of the human *CYS1* gene and candidate gene analysis in Boichis disease. *Pediatr Nephrol* 18:498–505.
- [110] Virtanen S, Alarimo E-L, Sandström S, Ampuja M, Kallioniemi A (2011) Bone morphogenetic protein -4 and -5 in pancreatic cancer-novel bidirectional players. *Exp Cell Res* 317:2136–2146.
- [111] Saade M, Araujo de Souza G, Scavone C, Kinoshita PF (2021) The Role of GPNMB in Inflammation. *Front Immunol* 12:1–10.
- [112] Ludueña RF und Banerjee A: The Isoforms of Tubulin. In: Fojo T (Hrsg): *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. Humana Press, 2008, S. 123–175.
- [113] Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sharma M, Davis RJ (1999) The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 19:7245–7254.
- [114] Mai M, Qian C, Yokomizo A, Smith DI, Liu W (1999) Cloning of the human homolog of conductin (*AXIN2*), a gene mapping to chromosome 17q23-q24. *Genomics* 55:341–344.
- [115] Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149–162.
- [116] Otsuki M (2000) Pathophysiological role of cholecystokinin in humans. *J Gastroenterol Hepatol* 15:71-83.
- [117] La Casa Esperón E de, Cordier G, Engel N (2012) A genomic reservoir for *Tnfrsf* genes is developmentally regulated and imprinted in the mouse. *Epigenetics* 7:626–634.
- [118] Sun Y, Pavey H, Wilkinson I, Fisk M (2021) Role of the IL-33/ST2 axis in cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 16:1-11.
- [119] Lan L, Evan T, Li H, Hussain A, Ruiz EJ, Zaw Thin M, Ferreira RMM, Ps H, Riising EM, Zen Y, Almagro J, Ng KW, Soro-Barrio P, Nelson J, Koifman G, Carvalho J, Nye EL, He Y, Zhang C, Sadanandam A, Behrens A (2022) *GREM1* is required to maintain cellular heterogeneity in pancreatic cancer. *Nature* 607:163–168.
- [120] Williams A: *CXC Chemokine Family*. In: Janes SM (Hrsg): *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Elsevier, 2022, S. 357–379.
- [121] Taal K, Tuvikene J, Rullinkov G, Piirsoo M, Sepp M, Neuman T, Tamme R, Timmusk T (2019) Neuralized family member *NEURL1* is a ubiquitin ligase for the cGMP-specific phosphodiesterase 9A. *Sci Rep* 9:1–12.

- [122] Hamm MJ, Kirchmaier BC, Herzog W (2016) Sema3d controls collective endothelial cell migration by distinct mechanisms via Nrp1 and PlxnD1. *J Cell Biol* 215:415–430.
- [123] Oliveira AG, Araújo TG, Carvalho BdM, Rocha GZ, Santos A, Saad MJA (2018) The Role of Hepatocyte Growth Factor (HGF) in Insulin Resistance and Diabetes. *Front Endocrinol* 9:1–10.
- [124] González-Castillo C, Ortuño-Sahagún D, Guzmán-Brambila C, Pallàs M, Rojas-Mayorquín AE (2014) Pleiotrophin as a central nervous system neuromodulator, evidences from the hippocampus. *Front Cell Neurosci* 8:1–7.
- [125] Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R (2006) Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem* 281:3494–3504.
- [126] Prokesch A, Bogner-Strauss JG, Hackl H, Rieder D, Neuhold C, Walenta E, Krogsdam A, Scheideler M, Papak C, Wong W-C, Vinson C, Eisenhaber F, Trajanoski Z (2011) Arxes: retrotransposed genes required for adipogenesis. *Nucleic Acids Res* 39:3224–3239.
- [127] Gonelle-Gispert C, Halban PA, Niemann H, Palmer M, Catsicas S, Sadoul K (1999) SNAP-25a and -25b isoforms are both expressed in insulin-secreting cells and can function in insulin secretion. *Biochem J* 339:159–165.
- [128] Li XY und Skidgel RA (1999) Release of glycosylphosphatidylinositol-anchored carboxypeptidase M by phosphatidylinositol-specific phospholipase C upregulates enzyme synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 258:204–210.
- [129] Denis CJ und Lambeir A-M (2013) The potential of carboxypeptidase M as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 17:265–279.
- [130] Ban MJ, Ji SH, Lee C-K, Bae SB, Kim HJ, Ahn TS, Lee MS, Baek M-J, Jeong D (2017) Solute carrier organic anion transporter family member 4A1 (SLCO4A1) as a prognosis marker of colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 143:1437–1447.
- [131] Johnson SK und Haun RS (2009) Insulin-like growth factor binding protein-5 influences pancreatic cancer cell growth. *World J Gastroenterol* 15:3355–3366.
- [132] Justilien V, Regala RP, Tseng I-C, Walsh MP, Batra J, Radisky ES, Murray NR, Fields AP (2012) Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential. *PLoS One* 7:1-12.
- [133] Gibbs GM, Roelants K, O'Bryan MK (2008) The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr Rev* 29:865–897.
- [134] Klüppel M: The Roles of Chondroitin-4-Sulfotransferase-1 in Development and Disease. In: Zhang L (Hrsg): *Glycosaminoglycans in Development, Health and Disease*. Elsevier textbooks, 2010, S. 113–132.
- [135] Chen J, Ding C, Chen Y, Hu W, Yu C, Peng C, Feng X, Cheng Q, Wu W, Lu Y, Xie H, Zhou L, Wu J, Zheng S (2021) ACSL4 reprograms fatty acid metabolism in hepatocellular carcinoma via c-Myc/SREBP1 pathway. *Cancer Lett* 502:154–165.
- [136] Schmid F, Wang Q, Huska MR, Andrade-Navarro MA, Lemm M, Fichtner I, Dahlmann M, Kobelt D, Walther W, Smith J, Schlag PM, Stein U (2016) SPON2, a newly identified target gene of MACC1, drives colorectal cancer metastasis in mice and is prognostic for colorectal cancer patient survival. *Oncogene* 35:5942–5952.
- [137] Ireland L, Lockett T, Schmid MC, Mielgo A (2020) Blockade of Stromal Gas6 Alters Cancer Cell Plasticity, Activates NK Cells, and Inhibits Pancreatic Cancer Metastasis. *Front Immunol* 11:1–16.

8. Thesen

1. PSC aus Wildtyp-Mäusen in Ko-Kultur mit KPC-, K921- oder duktaalen Pankreas KC-Zellen unterscheiden sich in ihren Genexpressionsprofilen signifikant von den jeweiligen Kontroll-PSC. Eine proliferationsfördernde Wirkung der Tumorzellen ist in Inversen- und Standard-Ko-Kulturen, ein gesteigerter Zytokin-Stoffwechsel in allen Ko-Kultur-Modellen nachweisbar.
2. Eine Verringerung der Distanz zu Tumorzellen bei gleichzeitiger Verhinderung eines Zellkontakts scheint die Genexpression und Kommunikation der PSC zu verstärken. PSC in Inverser-Ko-Kultur reagieren zu beiden beobachteten Zeitpunkten in einem stärkeren Ausmaß auf Einflüsse von unterschiedlichen Tumorzellen als PSC in Standard-Ko-Kultur.
3. Prozesse und Gene des EZM-Stoffwechsels werden in PSC der Inversen- und Standard-Ko-Kulturen signifikant angereichert, wobei eine stärkere Reaktion in Inversen-Ko-Kulturen nachweisbar ist.
4. Eine Zuordnung der PSC dieser Arbeit zu definierten Subgruppen ist bei den Inversen-Ko-Kulturen teilweise möglich. Da die Gene von iCAF- und apCAF-Subgruppen teilweise stärker, teilweise schwächer exprimiert werden, kann ein Misch-Subtyp vermutet werden.
5. PSC organisieren sich bei entsprechend eingesetzter Zellzahl in magnetischer 3D-Kultur zu multizellulären Sphäroiden und befinden sich in einem Zustand, der Charakteristika inaktiver PSC widerspiegelt, wesentliche bekannte PSC-Aktivierungsproteine und -Marker vermindert exprimiert, sich von dem der PSC in 2D-Kultur deutlich unterscheidet und durch eine erhöhte Zytokinsekretion gekennzeichnet ist. Hierbei bestehen erhebliche Unterschiede der Genexpression im zeitlichen Verlauf, was auf komplexe Umbauvorgänge in den multizellulären Sphäroiden und ausgeprägte PSC-PSC-Interaktionen hindeutet.
6. In den verschiedenen in dieser Arbeit etablierten KPC-Ko-Kultur-Modellen, Standard-, 3D- und Inverse-Ko-Kultur, bestehen deutliche Unterschiede in den RNA-Expressionsprofilen der PSC und somit eine unterschiedliche Empfänglichkeit der PSC hinsichtlich der Reize von KPC-Tumorzellen je nach Ko-Kultur-Modell.

9. Anlagen

Tabelle 16: Funktion einiger der am stärksten signifikant unterschiedlich exprimierte Gene der KPC-Standard-Ko-Kultur und log 2 fold change im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zu 24 h und 72 h; grün hinterlegt: herunter-regulierte Gene, rot hinterlegt: hoch-regulierte Gene; n. s.: nicht signifikant unterschiedlich exprimiert

Gen		log 2 fold change 24 h	log 2 fold change 72 h	Funktion
VCAN	Versican	1,62	1,57	Proteoglycan, immunsuppressive Rolle und vermehrtes Vorkommen im Pankreaskarzinom [101]
TNFSF15	TNF Superfamily Member 15	2,46	3,11	Zytokin, Induktion der IFN- γ Produktion und Apoptose [102]
STAC2	SH3 and Cysteine Rich Domain 2	1,77	2,11	Involviert in Regulation von Calciumkanälen [103]
CHRD12	Chordin like 2	n. s.	4,82	Bone morphogenetic protein-Antagonist, Tumorwachstum-fördernd, unter anderem Überexpression in Kolorektalem Karzinom [104]
NDUFA4L2	NDUFA4 Mitochondrial Complex Associated Like 2	n. s.	3,54	Induziert durch HIF1A, Reduktion der Produktion von radikalen Sauerstoffspezies in Fibroblasten [105]
MMP13	Matrix Metalloproteinase 13	n. s.	3,05	Diverse Funktionen innerhalb des EZM-Stoffwechsels, insbesondere auch beim Knochenaufbau [67]; Überexpression in humanen Pankreastumoren, assoziiert mit lymphogener Metastasierung [68]
EREG	Epiregulin	n. s.	2,05	Wachstumsfaktor, Hochregulation in Pankreaskarzinomen [106]
TIMP1	TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1	n. s.	1,96	Inhibitor von Metalloproteinasen, Hochreguliert in Pankreaskarzinomen, assoziiert mit Ikterus und Kachexie [66]
FN1	Fibronectin 1	n. s.	1,38	Stromakomponente, spielt Rolle in Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms [107]
MYH2	Myosin Heavy Chain 2	-5,76	n. s.	Motorprotein [108]
CYS1	Cystein 1	-1,70	-2,21	Protein des Zytoskeletts, spielt Rolle in Transport von Proteinen zu Zilien [109]
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	n. s.	-1,99	Signalmolekül, Wachstumsfördernde und -inhibierende Rolle im Pankreaskarzinom [110]

Tabelle 17: Funktion einiger der zu beiden Zeitpunkten signifikant unterschiedlich exprimierte Gene der KC-Standard-Ko-Kultur und log 2 fold change im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zu 24 h und 72 h; grün hinterlegt: herunter-regulierte Gene, rot hinterlegt: hoch-regulierte Gene, n. s.: nicht signifikant unterschiedlich exprimiert

Gen		log 2 fold change 24 h	log 2 fold change 72 h	Funktion
GPNMB	Glycoprotein Nmb	0,74	1,05	Glycoprotein, erhöhte Spiegel im pro-inflammatorischen Milieu [111]
TUBA4A	Tubulin Alpha 4a	0,65	0,76	Hauptbestandteil von Mikrotubuli [112]
MAPK8IP1	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 1	0,55	0,69	Rolle in der Regulation der Funktion von pankreatischen β -Zellen [113]
AXIN2	Axin2	0,78	0,47	Durch Beeinflussung der Stabilität von β Catenin herunterregulierende Rolle im Wnt-Signalweg [114]
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha	0,33	0,39	Untereinheit der Hypoxie-induzierbaren Faktors, der multiple Rollen in der Zellantwort bei Hypoxie spielt [115]
MMP13	Matrix Metalloproteinase 13	n. s.	1,86	Diverse Funktionen innerhalb des EZM-Stoffwechsels, insbesondere auch beim Knochenaufbau [67]; Überexpression in humanen Pankreastumoren, assoziiert mit lymphogener Metastasierung [68]
CCK	Cholecystokinin	n. s.	1,62	Gastrointestinales Hormon mit diversen Funktionen im Verdauungsstoffwechsel [116]
TNFRSF26	TNFR superfamily member 26	n. s.	1,08	Membranständiger Rezeptor, involviert in apoptotische Prozesse [117]
IL1RL1	Interleukin 1 Receptor Like 1	n. s.	1,07	Rezeptor für das Zytokin IL-33, assoziiert mit kardiovaskulären Erkrankungen und regulierenden T-Zellen [118]
GREM1	Gremlin 1	n. s.	1,01	Inhibitor des TGF β -Signalwegs, über BMP-Inhibition Hochregulation von Wachstumsfaktoren, Regulator der zellulären Heterogenität im PDA, trägt vermutlich zum Erhalt epithelialer Zellen bei [119]
CXCL5	C-X-C Motif Chemokine Ligand 5	0,87	n. s.	Chemokin, unter anderem Rolle in Proliferation und Metastasierung von Tumoren [120]
CX3CL1	C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1	-0,79	-0,84	Transmembranprotein mit löslichem Teil, Expression induziert von p53, Arretierung von potenziell malignen Zellen [56]
NEURL1B	Neuralized E3 Ubiquitin Protein Ligase 1B	-0,74	-1,40	Ligase, Positive Regulation des Notch-Signalwegs [121]

SEMA3D	Semaphorin 3D	-0,77	-0,88	Regulierende Rolle im Aktin-Netzwerk und Beeinflussung der Migration von endothelialen Zellen [122]
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	-0,90	-0,60	Chemokin, diverse Funktionen in biologischen Prozessen unter anderem auch in Entzündungsreaktionen, Tumorigenese und Metastasierung[79]
HGF	Hepatocyte Growth Factor	-0,67	-0,66	Chemokin, Wachstumsfaktor mit Motilitäts- und Mitogenitäts-stimulierender Wirkung, spielt Rolle in Homöostase der β -Zellen [123]
PTN	Pleiotrophin	n. s.	-1,53	Wachstumsfaktor und Zytokin, Rolle in Tumorigenese, Migration und Angiogenese [124]
COL28A1	Collagen Type XXVIII Alpha 1 Chain	n. s.	-1,18	Kollagen mit von-Willebrand-Faktor-A-Domäne [125]

Tabelle 18: Gemeinsam signifikant unterschiedlich exprimierte kodierende Gene im Vergleich zu den Kontrollen zum Zeitpunkt 72 h der Standard-KC-Ko-Kultur und Standard-KPC-Ko-Kultur; grün hinterlegt: herunter-regulierte Gene, rot hinterlegt: hoch-regulierte Gene

Gen		<i>log 2 fold change KPC</i>	<i>log 2 fold change KC</i>	Funktion
MMP13	Matrix-Metalloproteinase 13	3,05	1,85	Diverse Funktionen innerhalb des EZM-Stoffwechsels, insbesondere auch beim Knochenaufbau [67]; Überexpression in humanen Pankreastumoren, assoziiert mit lymphogener Metastasierung [68]
PTX3	Pentraxin 3	1,23	0,54	Löslicher Rezeptor mit Funktion im Immunsystem, diskutiert als Biomarker für das Pankreaskarzinom [80]
KLF2	Krüppel-like Factor 2	-1,13	-0,51	Induktion der Seneszenz von Pankreatischen Tumorzellen [91], Herunterreguliert im humanen PDA [90]

Tabelle 19: Funktion signifikant unterschiedlich exprimierte Gene der 3D-Ko-Kultur und log 2 fold change im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (alle Gene bis auf CXCL1 beziehen sich auf den 24 h Zeitpunkt); grün hinterlegt: herunter-regulierte Gene, rot hinterlegt: hoch-regulierte Gene

Gen		log 2 fold change	Funktion
ARXES2	Adipocyte-related X-chromosome expressed sequence 2	-1,65	Expression in Fettgewebe, stark hochreguliert im Rahmen der Adipogenese [126]
SNAP25	synaptosomal-associated protein of 25 kDa	2,75	Bindungsprotein-Rezeptorprotein, Expression in Neuronen und in pankreatischen β -Zellen, spielt Rolle in der Freisetzung von Neurotransmittern und der Insulin-Sekretion [127]
CPM	Carboxypeptidase M	2,35	Membran-Glykoprotein, in Vielzahl von Prozessen involviert wie Regulation der Peptidhormon-Aktivität oder EGF [128]; potentieller Tumor-Marker [129]
SLCO4A1	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 4A1	2,32	Anionentransporter, Hochregulation in diversen Tumoren, u.a. im Kolorektalen Karzinom [130]
IGFBP5	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5	2,11	Regulation von Zellwachstum und Apoptose, Überexpression in humanen Pankreastumoren und potentiell wachstumsfördernde Rolle auf Pankreastumorzellen beschrieben [131]
MMP10	Matrix-Metalloproteinase-10	2,10	Involviert in diverse physiologische Prozesse wie Abbau von EZM, aber auch in Metastasierung von Tumoren u.a. in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [132]
MMP13	Matrix-Metalloproteinase-13	1,93	Diverse Funktionen innerhalb des EZM-Stoffwechsels, insbesondere auch beim Knochenaufbau [67]; Überexpression in humanen Pankreastumoren, assoziiert mit lymphogener Metastasierung [68]
GM38391	RIKEN cDNA B430319G15 gene	1,86	unbekannt
CCK	Cholezystokinin	1,73	Gastrointestinales Hormon mit diversen Funktionen im Verdauungsstoffwechsel [116]
PI15	Peptidase Inhibitor 15	1,19	Sekretorischer Trypsin-Inhibitor, Produktion Hochreguliert in Tumorzelllinien, potentielle Rolle in Gestaltung der EZM während der Pankreas-Embryogenese [133]
CXCL1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1	1,95	Zytokin, fördernder Einfluss auf Tumorzellwachstum und Angiogenese (Pankreaskarzinom), aktiviert durch Ras-Signaling [76]

Tabelle 20: Auswahl der in der Standard-KPC-Ko-Kultur (Std.) und Inversen-KPC-Ko-Kultur (Inv.) mindestens zu einem Zeitpunkt gemeinsam unterschiedlich signifikant exprimierten Gene im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen; Expression in log₂ fold change zur jeweiligen Kontrolle; grün hinterlegt: herunter-regulierte Gene, rot hinterlegt: hoch-regulierte Gene; n. s.: nicht signifikant unterschiedlich exprimiert

Gen		Std. 24 h	Std. 72 h	Inv. 24 h	Inv. 72 h	Funktion
VCAN	Versican	1,62	1,57	1,25	1,26	Proteoglykan, immunsuppressive Rolle, vermehrtes Vorkommen im Pankreaskarzinom [101]
STAC2	SH3 and Cysteine Rich Domain 2	1,77	2,11	1,87	2,23	Involviert in Regulation von Calciumkanälen [103]
CHST11	Carbohydrate Sulfotransferase 11	1,07	1,22	1,06	1,27	Enzym des Proteoglykan-Stoffwechsels [134]
ACSL4	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4	1,1	1,24	0,96	1,09	Enzym des Lipidstoffwechsels, diskutierter Biomarker des Hepatozellulären Karzinoms [135]
NDUFA4L2	NDUFA4 Mitochondrial Complex Associated Like 2	n. s.	3,54	n. s.	4,05	Induziert durch HIF1A, Reduktion der Produktion von radikalen Sauerstoffspezies in Fibroblasten [105]
SPON2	Spondin 2	n. s.	1,35	n. s.	1,9	Protein der EZM, fördert Metastasierung beim Kolorektalen Karzinom [136]
PTX3	Pentraxin 3	n. s.	1,23	n. s.	0,97	Löslicher Rezeptor mit Funktion im Immunsystem, diskutiert als Biomarker für das Pankreaskarzinom [80]
CHRD2	Chordin like 2	n. s.	4,82	n. s.	5,04	Bone morphogenetic protein-Antagonist, Tumorstadium-fördernd, unter anderem Überexpression in Kolorektalem Karzinom [104]
CYS1	Cystein 1	-1,7	-2,21	-1,87	-2,1	Protein des Zytoskeletts, spielt Rolle in Transport von Proteinen zu Zilien [109]
GAS6	Growth-arrest-specific gene-6	n. s.	-0,93	n. s.	-1,36	Protein welches Wachstum und Proliferation beeinflusst, fördert Metastasierung des Pankreaskarzinoms [137]

Tabelle 21: die 10 jeweils alleinig exprimierten Protein-kodierenden signifikant am stärksten hoch- beziehungsweise herunter-regulierten Gene zum 24 h Zeitpunkt und 72 h Zeitpunkt der Inversen-KPC-Ko-Kultur; grün hinterlegt: herunter-regulierte Gene, rot hinterlegt: hoch-regulierte Gene

24 h Zeitpunkt			72 h Zeitpunkt		
Gen		log 2 fold change	Gen		log 2 fold change
Krt18	Keratin 18	9,38	Krt8	Keratin 8	8,46
Sele	Selectin E	6,69	Ccr1	C-C Motif Chemokine Receptor 1	7,04
Cthrc1	Collagen Triple Helix Repeat Containing 1	4,33	Pld5	Phospholipase D Family Member 5	6,67
Gbp8	Guanylate-binding protein 8	3,76	Chst5	Carbohydrate Sulfotransferase 5	6,56
Mycn	N-Myc Proto-Oncogene Protein	3,32	Gml	Glycosylphosphatidylinositol Anchored Molecule Like	6,28
Ifi44	Interferon induced protein 44	3,02	Trim9	Tripartite Motif Containing 9	6,24
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	2,99	A4gnt	Alpha-1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase	5,97
CXCL5	C-X-C motif chemokine 5	2,60	Rasl10a	RAS like Family 10 Member A	5,90
Oas2	2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 2	2,50	Trcg1	Taste Receptor Cell Gene 1	5,86
Zbp1	Z-DNA-binding protein 1	2,38	Cdh15	Cadherin 15	5,82
Megf6	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6	-1,54	Tectb	Tectorinβ	-6,31
Pik3c2b	Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2β	-1,56	Adgrg3	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G3	-6,33
Ramp1	Receptor Activity Modifying Protein 1	-1,59	Adora1	Adenosine A1 Receptor	-6,46
Cntn2	Contactin 2	-1,76	Adamts17	ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif 17	-6,48
Cdkl1	Cyclin Dependent Kinase Like 1	-1,81	Il2rg	Interleukin 2 Receptor Subunit Gamma	-6,49
Tppp	Tubulin Polymerization Promoting Protein	-2,02	Kcnh4	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 4	-6,57
Pappa2	Pappalysin 2	-2,14	Sowahd	Sosondowah Ankyrin Repeat Domain Family Member D	-7,30
Itga8	Integrin Subunit Alpha 8	-2,18	Map7d2	AP7 Domain Containing 2	-7,40
Psm10	Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 10	-2,80	Acot5	Acyl-CoA thioesterase 5	-7,87
Alkal1	ALK And LTK Ligand 1	-5,38	Klb	Klothoβ	-8,49

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jörg Kleeff, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Durch seinen entschiedenen Einsatz für das Projekt und die unkomplizierte, rasche Kommunikation wurde der Fortschritt der Arbeit stark erleichtert.

In meiner Promotion war es mir durch ein einjähriges Stipendium des Hallschen Promotionskolleg Medizin möglich, das Studium zu pausieren und mich in dieser Zeit vollkommen auf die Laborarbeit zu konzentrieren. Durch diese finanzielle Unterstützung wurde mir ein deutlich entspannteres und gleichzeitig intensiveres wissenschaftliches Arbeiten ermöglicht, dafür möchte ich mich herzlich bedanken. Ein besonderer Dank richtet sich hier auch an Herrn Prof. Dr. Christoph Michalski, der mich bei der Bewerbung auf das Stipendium unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Dr. Gerd Hause und dem Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für eine sehr angenehme Kooperation, durch die die anschaulichen elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden sind. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Markus Glaß für die kompetente bioinformatische Beratung und das Anfertigen von Analysen.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei dem gesamten Labor-Team des Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für Viszerale, Gefäß- und Endokrine Chirurgie des Universitätsklinikums Halle (Saale). Besonders Frau Kathrin Hammje hat mich zunächst durch ihre routinierte Einarbeitung, später durch ein offenes Ohr bei Problemen tatkräftig unterstützt. Auch Frau Bernadette Harwardt möchte ich für ihre wertvollen Gedankenanstöße danken. Herr Dr. Bogusz Trojanowicz hat mit Geduld und Ruhe den gesamten Prozess der Arbeit mitverfolgt, begleitet und mit vielen guten Ideen entscheidend vorangebracht, dafür bin ich sehr dankbar.

Meinen Mit-Doktoranden danke ich für die gute Zusammenarbeit und den anregenden Austausch, insbesondere danke ich auch Frau Johanna Häusler für die Weitergabe ihrer Labor-Erfahrungen, die mir sehr geholfen haben.

Ein sehr großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Lucia und Chari und meiner Schwester Laura, die durch ihren ständigen Rückhalt mein Selbstvertrauen gestärkt und meine Schwelle der Frustrationstoleranz erhöht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Benedikt bedanken, für seinen zu jeder Zeit kompetenten wissenschaftlichen Rat, das strenge Korrekturlesen und den persönlichen Beistand seit Beginn der Promotion.