

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Expression und Regulation der Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 in pankreatischen
Karzinomzelllinien und humanem Pankreasgewebe**

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

vorgelegt
der medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kira Vögeding

geboren am 30.06.1994 in Bielefeld

Betreuer: Prof. Dr. Jörg Kleeff

Gutachter:
PD S. Krug
Prof. A. Mihaljevic, Ulm

07.12.2021

29.08.2022

Referat

Veränderungen, die den Zellmetabolismus betreffen, sind von entscheidender Bedeutung bei der Entstehung, Metastasierung sowie Rezidivbildung von Karzinomen. Neben zahlreichen metabolischen Prozessen sind weitere vielfältige Risikofaktoren bzw. begünstigende Faktoren bekannt und ebenso vielfältig sind die Möglichkeiten der Diagnostik und frühen Erkennung. Die Aldehyd-Dehydrogenase-Gruppe stellt einen relevanten Komplex in mehreren Stoffwechselfvorgängen dar und beeinflusst maßgeblich physiologische Prozesse in sämtlichen Zellen und nimmt einen wesentlichen Stellenwert in bestimmten Tumorprozessen ein.

Bedeutend für die Diagnostik, aber auch für das weitere Management einer Krebserkrankung sind Tumormarker. Sie sind meist Moleküle, die bei Erstdiagnostik einen entscheidenden Hinweis geben bzw. erste Erkenntnisse über erfolgreiche Therapieansätze sowie ein mögliches Tumorrezidiv liefern können.

In dieser Doktorarbeit wird die Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 (ALDH1A3) untersucht, eine Unterform eines großen Aldehyd-Dehydrogenase-Komplexes. Bereits beschrieben wurde eine erhöhte Expression der ALDH1A3 in mehreren Karzinomarten. Daher wurde in dieser Arbeit mittels PCR geprüft, wie stark die Expression in humanem Pankreaskarzinomgewebe ausgeprägt ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass die ALDH1A3-Expression im Karzinomgewebe stärker ist als in den Pankreatitis- sowie nicht pathologisch veränderten Gewebeprobe. Im nächsten Schritt wurde anhand von Pankreazelllinien durch Western-Blot sowie PCR geprüft, welche funktionellen Konsequenzen die Herunterregulierung von ALDH1A3 mittels spezifischer siRNA und der Anwendung leitliniengerechter Chemotherapie haben kann. Nach erfolgreicher Herunterregulierung sollte durch ein MTT Assay untersucht werden, wie sich dieses auf die Proliferation der Krebszellen auswirkt. Hierbei zeigte sich, dass eine erfolgreiche direkte und indirekte Verminderung der ALDH1A3-Expression auch einen proliferationshemmenden Effekt aufweist.

Durch den Stellenwert der Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 in sämtlichen metabolischen Prozessen und der in dieser Arbeit untersuchten erhöhten Expression im Pankreaskarzinomgewebe sowie der Möglichkeiten der Herunterregulation und der Korrelation zu proliferationshemmenden Wirkungen auf Karzinomzelllinien, könnte es sich bei der Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 um einen neuen möglichen Tumormarker handeln. Dieses könnte einen Weg darstellen, um neue Hinweise für eine frühzeitige Diagnostik zu liefern, aber auch entscheidende weitere potentielle Ansätze im Rahmen der Pankreaskrebstherapie aufzeigen.

<Vögeding>, <Kira>: <Expression und Regulation der Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 in pankreatischen Karzinomzelllinien und humanem Pankreasgewebe>, <Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss.> <70 Seiten>, 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Übersetzungen	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Pankreas	1
1.2 Pankreastumore	1
1.2.1 Pankreasadenokarzinom	1
1.2.2 Papillenkarzinom	4
1.2.3 Neuroendokrine Tumoren (NET)	4
1.3 Aldehyd-Dehydrogenase	4
1.3.1 Aldehyd-Dehydrogenase 1A3	5
1.4. Tumormarker	7
1.4.1 Carbohydrate Antigen 19-9	8
1.4.2 Carcinoembryonales Antigen	9
1.5 Pankreatitis	9
1.5.1 Akute Pankreatitis	9
1.5.2 Chronische Pankreatitis	10
2. Zielstellung	11
3 Material und Methoden	12
3.1 Materialien und Geräte	12
3.2 Patientengewebe	16
3.2.1 Homogenisierung	19
3.3 Pankreaszelllinien	19
3.3.1 Zellkultivierung	20
3.3.2 Zellpassagierung	21
3.3.3 Transiente Transfektion mittels spezifischer siRNA	21
3.3.4 Behandlung der Zellen mit Chemotherapie	22
3.4 RNA-Gewinnung und Real-Time PCR	22
3.4.1 RNA-Isolation und Vermessung	22

3.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	23
3.4.3 Real-Time PCR.....	24
3.4.4 Auswertung	24
3.5 Protein-Gewinnung und Western-Blot	25
3.5.1 Proteinisolation und Vermessung	25
3.5.2 Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	25
3.5.3 Western-Blotting	28
3.5.4 Antikörpernachweisreaktion	28
3.5.5 Auswertung	30
3.6 MTT Assay	30
3.6.1 MTT Assay-Auswertung.....	32
3.7 Statistische Methoden	33
4. Ergebnisse	34
4.1 ALDH1A3-Expression in humanem Pankreasgewebe	34
4.2 Ergebnisse der pankreatischen Karzinomzelllinien.....	39
4.2.1 ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien auf RNA-Ebene.....	39
4.2.2 ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien auf Proteinebene	40
4.3 Regulation der ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien	41
4.3.1 ALDH1A3-Regulation durch transiente Transfektion auf RNA-Ebene.....	41
4.3.2 ALDH1A3-Regulation durch transiente siRNA Transfektion auf Proteinebene.....	43
4.3.3 Einfluss der transienten ALDH1A3-Herunterregulierung mittels siRNA auf die Zellproliferation	47
4.3.4 ALDH1A3-Regulation durch Behandlung mittels Chemotherapie auf RNA-Ebene	49
4.3.5 Einfluss der Chemotherapie auf die Zellproliferation	51
5. Diskussion.....	53
5.1 ALDH1A3-Expression in humanem Pankreasgewebe	53
5.2 ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien.....	56
5.3 Auswirkung der Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression auf die Zellproliferation ...	58

5.4 ALDH1A3-Stellenwert als möglicher Tumormarker	60
6. Zusammenfassung	62
Literaturverzeichnis.....	63
Thesen	70
Selbstständigkeitserklärung mit Unterschrift	X
Erklärung über frühere Promotionsversuche	XI
Danksagung.....	XII

Abkürzungsverzeichnis und Übersetzungen

5-FU	5-Fluoruracil
18s	Small subunit ribosomal RNA
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALDH1A3	Aldehyd-Dehydrogenase 1A3
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua Bidest	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BRCA1	Breast Cancer Antigen 1
BRCA2	Breast Cancer Antigen 2
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
C	Celsius
ca.	circa
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A

cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure/ complementary Desoxyribonucleid Acid
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CHAPS	3-Cholamidopropyldimethylammonio-1- Propanesulfonat
Cl ⁻	Chloridionen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTx	Chemotherapie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Diffuses neuroendokrines System
dNTP	Desoxy-nucleosidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
f	female
FAMMM	Familiäres atypisches Muttermal- und Melanom-Syndrom
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	Fragment Crystallisable
g	Gramm
GSCs	Glioma Stem Cells
H ₂ O	Wasser

h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Hydrogenchlorid
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
HRPII	Histidine-rich protein II
IgG	Immunglobulin G
insb.	Insbesondere
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
l	Liter
Lig.	Ligamentum
m	male, männlich
M	Molarität
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mes GSCs	Mesenchymal Glioma Stem Cells
ml	Milliliter
MLH1	MutL homolog 1
mM	millimolar
mRNA	Messenger Ribonucleid Acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide

MW	Molecular Weight
N ₀	kein Lymphknotenbefall
N ₁	1-3 regionäre Lymphknotenmetastasen (bezogen auf das Pankreaskarzinom)
N ₂	>4 regionäre Lymphknotenmetastasen (bezogen auf das Pankreaskarzinom)
NaCl	Natriumchlorid
NAD/NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen (oxidiert/reduziert)
NADP+	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NET	Neuroendokrine Tumoren
nm	Nanometer
NMIBC	Non-Muscle Invasive Bladder Cancer
npG	nicht pathologisch verändertes Gewebe
Nr.	Nummer
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
o.g.	oben genannte
p53	tumor protein 53, cellular tumor antigen 53
PALB2	Partner And Localizer of BRCA2
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	Duktales Pankreasadenokarzinom
pH	potentia Hydrogenii
PN GSCs	Proneural Glioma Stem Cells

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-qPCR	Real Time quantitative PCR
RO-Resektion	Resektion in sano
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RNA	Ribonukleinsäure/ Ribonucleic Acid
RNP	Ribonucleoprotein-Partikeln
rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
shRNA	Small hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
siRNA-coA	siRNA Kontrolle A
SDS	SodiumDodecylSulfat
SMAD4	Mother Against Decpentaplegic Homolog 4
TBS/T	Tris-Buffered-Saline /Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TNM	Tumorklassifikation zur Einteilung von T (Tumorgröße), N (Lymphknotenbefall), M (Fernmetastasen)
TP53	Tumorprotein 53
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate
U	Umdrehungen

u.a.	unter anderem
UICC	Union for International Cancer Control
Urea	Harnstoff
V	Volt
w	weiblich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Pankreas

Das Pankreas unterteilt sich in eine exokrine und eine endokrine Drüse (Kleeff et al. 2016). Durch den exokrinen Teil werden täglich etwa 1,5 l alkalisches Pankreassekret produziert, welches aus Wasser, Ionen (insb. HCO_3^- und Cl^-) und Verdauungsenzymen besteht. Zu diesen Verdauungsenzymen zählen proteolytische Enzyme, die im Duodenum aktiviert werden, Proteaseinhibitoren, Nukleasen, die Amylase und Lipasen (Herold 2020). Der exokrine Anteil wird durch Drüsenläppchen gebildet, die wiederum aus mehreren hundert Drüsenendstücken, den sogenannten Azini, bestehen. Der endokrine Teil wird durch die Langerhans-Inseln gebildet, die eine wichtige Funktion in der Regulation des Glukosestoffwechsels ausführen. Das Pankreas lässt sich in drei verschiedene Abschnitte gliedern: Pankreaskopf, Pankreaskörper und Pankreasschwanz, welches relevant wird für die Therapieplanung bei Karzinomen, die man entsprechend der variablen Lokalisation differenzieren kann (Kleeff et al. 2016).

1.2 Pankreastumore

1.2.1 Pankreasadenokarzinom

Das Adenokarzinom ist die am häufigsten auftretende Pankreaskarzinomart (Kleeff et al. 2016) und befindet sich meist im Bereich des Pankreaskopfes (Herold 2020). Häufig entsteht es in einem mehrschrittigen Prozess, welcher auch intermediäre Vorläuferläsionen wie u.a. pankreatische intraepitheliale Neoplasien umfasst (Tanaka 2014), es kann sich jedoch auch aus selteneren Vorläuferläsionen wie der muzinös zystischen Neoplasie oder der intraduktalen papillär muzinösen Neoplasie entwickeln (Brugge William R. et al. 2004; Hezel et al. 2006; Tanaka 2014). In 90% der Fälle handelt es sich um sogenannte duktale Karzinome, wobei am ehesten azinär zu duktalem Metaplasien den Ursprung des Karzinoms bilden. Bei den anderen 10% handelt es sich um die azinäre Form, diese geht dementsprechend vom Azinusepithel aus. Charakteristisch für das Adenokarzinom sind die frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierung, woraus u. a. eine schwierige Therapieplanung sowie eine schlechte Prognose resultieren (Kleeff et al. 2016).

Das Pankreaskarzinom ist ein häufiger Grund der krebsassoziierten Sterblichkeit, es stellt die dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache in den westlichen Ländern dar (Klaiber et al. 2019; Bray et al. 2018) und ist insgesamt mit einer schlechten Langzeitüberlebensprognose assoziiert, die sich in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich gebessert hat (Kleeff et al. 2016). Mit einer Inzidenz von 15/100.000 Einwohnern jährlich ist es zudem der dritthäufigste Tumor des

Verdauungstraktes nach dem Kolon- und dem Magenkarzinom und zeigt ein mittleres Erkrankungsalter von 70-76 Jahren (Herold 2020). Das Lebensalter stellt den entscheidenden Faktor für das Langzeitüberleben dar. Die meisten Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung das 50. Lebensjahr bereits überschritten (Whiteman et al. 2015).

Mehre genetische Syndrome sind mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms assoziiert, wie bspw. familiärer Brust- und Eierstockkrebs sowie das Peutz-Jeghers-Syndrom, die erbliche Pankreatitis (Hezel et al. 2006; Lochan et al. 2008) und das familiäre atypische Muttermal- und Melanom-Syndrom (FAMMM) (Goldstein Alisa M. et al. 1995). Dem entsprechend können Keimbahnmutationen in Genen wie u.a. BRCA2, BRCA1, MLH2 und PALB2 ebenfalls das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, erhöhen (Iqbal et al. 2012; Kastrinos et al. 2009; Dunne und Hezel 2015). Im Pankreastumor findet man häufig somatische Mutationen von Genen wie KRAS, TP53, CDKN2 und SMAD4, die zu einer Aktivierung von Wachstum und vermehrtem Zellüberleben sowie Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Apoptose führen (Jones et al. 2008; Waddell et al. 2015).

Auch metabolische Veränderungen wie Anpassung der Mikroumgebung sind wesentliche Faktoren, die zur Karzinomentstehung im Pankreas führen. So sind besonders hypoxische Bedingungen und Nährstoffmangel im umgebenen Gewebe charakteristisch (Erkan et al. 2009; Kong et al. 2015). Häufig bleiben jedoch die Ursache, die prädisponierenden Umweltfaktoren sowie genetische Mechanismen der Entstehung eines Pankreaskarzinoms unklar (Wolpin et al. 2009).

Als gesicherte Risikofaktoren für ein Pankreaskarzinom gelten das Tabakrauchen, Typ 2 Diabetes mellitus und die chronische Pankreatitis (Bosetti et al. 2012; Parkin 2011; Whiteman et al. 2015). Eine moderate Risikoerhöhung wird ebenfalls bei gastrointestinalen Ulcera sowie langfristig nach Gastrektomien beobachtet (Bosetti et al. 2013). Weitere Studien haben ergeben, dass die Einnahme von Antidiabetika das Risiko eines Pankreaskarzinoms einerseits reduzieren, wie es bei Metformin gezeigt wurde, andererseits aber auch erhöhen kann, wie es bei Insulin oder Insulinsekretanaloga der Fall ist (Li et al. 2009). Eine genomweite Studie und einige epidemiologische Studien zeigten, dass auch die Blutgruppe Einfluss auf das Risiko einer Pankreaskarzinomentstehung haben kann. So scheinen alle Blutgruppen außer der Blutgruppe 0 zu einer Risikoerhöhung zu führen, auch wenn die genauen Zusammenhänge bis jetzt noch unklar erscheinen (Wolpin et al. 2009).

Randomisierte Studien legen ebenfalls nahe, dass eine Risikosenkung durch die Einnahme von Aspirin z.B. aufgrund einer kardialen Erkrankung, erreicht werden kann (Rothwell et al. 2011; Jacobs et al. 2012).

Ein wichtiger und gleichzeitig der schwierigste Aspekt ist das Fehlen von Frühsymptomen beim Pankreaskarzinom. Dieses führt dementsprechend zur erschwerten Diagnosestellung. Meist entwickeln sich im Verlauf der Erkrankung unspezifische Symptome, wie Appetit- und/oder Gewichtsverlust, epigastrische Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken oder es wird durch einen sich entwickelnden Ikterus auffällig. Möglich sind ebenfalls eine Thromboseneigung sowie eine sich ausbildende pathologische Glukosetoleranz bzw. ein manifester Diabetes mellitus (Wolfgang et al. 2013).

Trotz intensiver Forschung ist das Pankreaskarzinom nach wie vor mit einer extrem schlechten Prognose assoziiert (Siegel et al. 2018), die durch mehrere Faktoren bedingt ist. Zum einen wird das Pankreaskarzinom häufig erst in weit fortgeschrittenen Stadien entdeckt, da frühere Stadien oftmals keine oder nur wenige und unspezifische Symptome verursachen. Zudem fehlt es beim Pankreaskarzinom zum aktuellen Zeitpunkt an maßgebenden sensitiven sowie spezifischen Tumormarkern. Ebenso scheint es häufig schwierig zu sein, frühe Stadien in der Bildgebung darzustellen. Das Pankreaskarzinom ist meist mit einem sehr aggressiven Wachstum sowie einer frühen Fernmetastasierung verbunden, welches eine kurative Therapie mittels chirurgischer Resektion bei den meisten Patienten ausschließt. Ebenso charakteristisch ist eine relative Toleranz gegenüber herkömmlichen Therapiemodellen wie Chemo-, Strahlen- und Targeted-Therapie sowie eine hohe Variabilität von genetisch und epigenetischen Alterationen (Kleeff et al. 2016). All diese Faktoren führen dazu, dass das Pankreaskarzinom insgesamt eine 5-Jahres-Überlebensrate von unter sieben Prozent aufweist (He et al. 2014). Trotz allem gab es einige Fortschritte in der Behandlung wie bspw. effektivere Kombinationen von Chemotherapie sowie bessere und sicherere Operationsmethoden und perioperative Behandlung. Jedoch zeigten diese Maßnahmen nur geringe Auswirkungen auf das Gesamtüberleben. Daher sind aktuelle Inhalte intensiver Forschung die Suche nach Möglichkeiten der früheren Diagnostik, validen Tumormarkern sowie standardisierten Behandlungsmöglichkeiten (Kleeff et al. 2016).

Die einzige potentiell kurative Therapie stellt die R0-Resektion mit Lymphadenektomie dar, welche in nur etwa 10-20% der Fälle zum Zeitpunkt der Diagnosestellung durchführbar ist (Kleeff et al. 2016). Bei einer Lokalisation im Pankreaskopf wird entweder die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie oder die klassische partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple durchgeführt (Diener et al. 2014). Eine Pankreaslinksresektion mit

Splenektomie wird sowohl bei einem Adenokarzinomen des Pankreaskorpus als auch des Pankreasschwanzes durchgeführt (Kleeff et al. 2016). Durch eine adjuvante Chemotherapie nach R0-Resektion mittels Gemcitabin oder 5-FU/Folinsäure und Leucovorin wurde eine signifikante Steigerung des Gesamt- sowie des 5-Jahresüberleben erreicht (Klaiber et al. 2019; Herman et al. 2008; Regine et al. 2011), aktuell je nach Allgemeinzustand mit einem modifizierten Folfirinox-Schema. Bei Inoperabilität oder Metastasen ist eine palliative Therapie die erste Wahl, die durch eine systemische Chemotherapie in Form von Folfirinox oder der Kombination von Gemcitabin und nab-Paclitaxel oder der Monotherapie von Gemcitabin, erfolgt (Herold 2020).

1.2.2 Papillenkarzinom

Das Papillenkarzinom ist ein selten auftretender Pankreastumor, der durch einen frühzeitig auftretenden cholestatischen Ikterus meist im frühen Stadium diagnostiziert werden kann. Eine Therapiemöglichkeit stellt die Whipple-Operation dar. Die 5-Jahresüberlebensrate derjenigen Patienten, die sich für diese Operation entscheiden, liegt etwa bei 30% (Herold 2020).

1.2.3 Neuroendokrine Tumoren (NET)

Ein Tumor, der sich von Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems (DES) ableitet, wird neuroendokriner Tumor genannt. Diese zeigen die morphologischen und funktionellen Eigenschaften von endokrinem Gewebe sowie eine Expression sekretorischer Vesikel. Entsprechend der jeweiligen Hormonsekretion werden die funktionell aktiven NET z.B. als Insulinome oder Glukagonome bezeichnet. Das Insulinom ist der am häufigsten vorkommende endokrin aktive Pankreastumor. Meist sind sie sowohl gutartig als auch solitär und klein (wenige Millimeter). Klinisch zeichnen sie sich durch das sogenannte Whipple-Trias aus, welches sich durch folgende Aspekte kennzeichnet: Spontanhypoglykämie, entstanden durch Nahrungskarenz, autonome Symptome wie u.a. Schwitzen, Hitzegefühl, Palpitationen, Tachykardie sowie eine rasche Besserung der Symptomatik nach Glukoseapplikation (Herold et al).

1.3 Aldehyd-Dehydrogenase

Der Aldehyd-Dehydrogenase-Komplex besteht aus insgesamt 19 Mitgliedern, die zusammen zu den wichtigsten Vertretern der im Stoffwechsel aktiven Aldehyden gehören (Vasiliou und Nebert 2005). Die Aldehyd-Dehydrogenasen spielen eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation sowie Differenzierung. Die Hauptaufgabe ist die irreversible Oxidation der endogenen als auch exogenen Aldehyde zu ihren entsprechenden Säuren mit Verbrauch von NADP⁺ oder NAD. Somit nehmen sie eine besondere Stellung als entgiftende

Enzyme ein (Vasiliou et al. 2004; O'Brien et al. 2005), spielen jedoch auch eine regulatorische Rolle u.a. bei Tumorinitiation sowie -progress (Singh et al. 2015). Eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung scheint v.a. die Bildung von DNA-Addukten mit Acetaldehyden zu spielen, insbesondere bei Tumoren, die auch in Verbindung mit Alkoholkonsum verursacht wurden (Vaca et al. 1995). Bisherige Untersuchungen lassen zudem vermuten, dass die Aldehyd-Dehydrogenasen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Metastasen spielen und damit auch einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben von Krebspatienten ausüben (Rasheed et al. 2010).

Eine weitere wesentliche Eigenschaft der ALDH1A3 ist die Fähigkeit, das Tumorsuppressorprotein p53 zu aktivieren sowie intrazelluläre freie Radikale zu reduzieren, um Körperzellen vor oxidativem Schaden zu schützen (Yoon et al. 2004).

Der Aldehyd-Dehydrogenase-Komplex wirkt in sämtlichen Prozessen mit, die in Verbindung zum Glukose-, Aminosäuren- oder Fettstoffwechsel stehen (Vasiliou et al. 2004), hier übt auch der Subtyp ALDH1A3 wesentliche Funktionen aus. Weiterführend gibt es Hinweise darauf, dass die katalytische Aktivität der Aldehyd-Dehydrogenasen als Marker genutzt werden könnte, um Krebsstammzellen von normalen Stammzellen zu unterscheiden, da die ALDH1A3-Expression u.a. mit Tumorentstehung und der pro-angiogenen Aktivität der Krebszellen eng assoziiert ist (Duan et al. 2016). Diese Eigenschaften zeigen somit Ähnlichkeiten zu denen der allgemeinen Charakteristiken der Krebsstammzellen, wie die Fähigkeit der Selbsterneuerung, Differenzierungseigenschaften, sowie der bestehenden Medikamentenresistenz, auf (Ward und Dirks 2007).

Diese katalytische Aktivität scheint ebenfalls stark mit der Prognose von Krebspatienten, zu korrelieren, scheinbar zunächst unabhängig davon, welches Organ betroffen ist (Marcato et al. 2011b; van den Hoogen et al. 2010).

All diese Faktoren und die Tatsache, dass die Aldehyd-Dehydrogenasen in vielen Karzinomen hoch exprimiert sind und viele noch unerforschte, variable Regulationsvorgänge zeigen und daher Gegenstand sämtlicher Forschung bezüglich Karzinomentstehung sowie -therapie sind, betonen die Relevanz weiterer Studien und Untersuchungen.

1.3.1 Aldehyd-Dehydrogenase 1A3

Die Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 ist ein Subtyp im Komplex der NADP+ und NAD abhängigen Aldehyd-Dehydrogenasen (Vasiliou und Nebert 2005). Sie liegt beim Menschen auf dem Chromosom 15 (Duan et al. 2016) und ist primär für die Umwandlung von all-trans-retinal in

Retinsäure (Grün et al. 2000; Sima et al. 2009) verantwortlich. Zudem nimmt sie eine wichtige Rolle in sämtlichen metabolischen wie auch physiologischen Prozessen ein, wie z.B. Glykolyse und Gluconeogenese, Aminosäuren- und Fettsäuremetabolismus (Duan et al. 2016), aber auch in der Entwicklung des Gesichts, der Nieren und des Riech- und visuellen Systems (Dupe´ et al. 2003; Everts et al. 2005). So wurde gezeigt, dass eine nicht normale ALDH-Expression zu einer Mikrophthalmie oder sogar Anophthalmie führen kann (Fares-Taie et al. 2013). Dupe´ et al. (2003) untersuchten, inwiefern sich die Ausschaltung der ALDH1A3 bei Mäusen auswirkte, und entdeckten, dass es aufgrund von Malformationen im Gesichtsbereich, die vor allem die Nase betreffen, zum Absterben des Embryos kommt.

Auch bei der Regulation der Apoptose und damit im gesamten Zellzyklus übernimmt die ALDH1A3 wesentliche Funktionen, da nach einem ALDH1A3 Knockout die Anzahl der Apoptosen ansteigt, während sich die der Mitosen verringert (Ginestier et al. 2007).

Betrachtet man die ALDH1A3-Expression, fällt auf, dass sie in normalem Gewebe stark verteilt ist, so findet man eine hohe Expression sowohl im Bereich der vorderen Retina als auch in den Speicheldrüsen sowie im Magen (Duan et al. 2016; Ali et al. 2011). Bekannt ist bereits, dass die ALDH1A3 in einigen verschiedenen Karzinomarten übermäßig stark exprimiert ist. So konnte schon eine erhöhte ALDH1A3-Expression in Ovarial-Karzinomen (Saw et al. 2012), Mammakarzinomen (Marcato et al. 2011b) und auch im Pankreaskarzinom (Jia et al. 2013) festgestellt werden.

Neben der verhältnismäßig starken ALDH1A3-Expression in den Karzinomen besteht ebenfalls eine Korrelation zu erhöhter Resistenz gegenüber Chemo- sowie Strahlentherapie. Einige Untersuchungen anhand von Kolonkarzinomzellen und Pleura-Mesotheliomgewebe zeigten, dass eine hohe ALDH1A3-Expression mit einer erhöhten Medikamentenresistenz vergesellschaftet ist (Golubovskaya et al. 2015; Kong et al. 2016). Dieses ist mitverantwortlich dafür, dass die ALDH1A3-Expression mit der Prognose einer Vielzahl von Karzinomen zusammenhängt, denn eine Herunterregulierung der Expression führte beim Pleura-Mesotheliom zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cisplatin und Pemetrexed (Kong et al. 2016). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Expression der ALDH1A3 im Pankreaskarzinom liegt, wäre es für die Zukunft interessant, ob ebensolche Ergebnisse auch beim Pankreaskarzinom erzielt werden können.

Die genauen Mechanismen der Regulation der ALDH1A3-Expressionen werden weiterhin untersucht, so konnten bereits mehrere Faktoren festgestellt werden, die Einfluss auf diese zu haben scheinen. Dazu zählen u.a. das Tumorsuppressorgen p53 (Koch et al. 2007; Yoon et al.

2004) und auch das Onkogen KRAS, welches transgene Mausmodelle zeigten (Kong et al. 2016). Aber auch die Promoter-Methylierung scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation zu haben (Duan et al. 2016). Daher wird in dieser Arbeit neben der Expression auch der Fokus auf eine mögliche Regulation bzw. Herunterregulierung mittels spezifischer siRNA gelegt, um damit möglicherweise neue Aspekte für Therapieansätze zu gewinnen.

Durch die vielseitigen Funktionen übernimmt die ALDH1A3 eine wichtige Stoffwechselfunktion. Bekannt ist, dass metabolische Prozesse ein Kennzeichen von Karzinomen darstellen (Hanahan und Weinberg 2011). Daher kann man behaupten, dass die ALDH1A3 das Potential hat, ein möglicher Marker für eine Krebsdiagnose, -therapie und -prognose zu werden. Und eben deswegen besteht der Schwerpunkt dieser Arbeit darin, die ALDH1A3-Expression und Regulation beim Pankreaskarzinom näher zu untersuchen und mögliche Aussagen bezüglich der Korrelation zwischen diesen und der Proliferation von Karzinomzellen zu treffen.

1.4. Tumormarker

Tumor- bzw. Biomarker sind in der Diagnostik vieler Karzinome unersetzbar. Sie sind einerseits bei der Erkennung von Karzinomen von Bedeutung, andererseits spielen sie auch bei der Prüfung eines Therapieansprechens oder eines Tumorrezidivs eine unverzichtbare Rolle. Ebenso werden sie häufig bei der Fragestellung, ob es sich um einen neoadjuvanten, adjuvanten oder palliativen Therapieansatz handelt, mit in die Entscheidungsfindung einbezogen (Kleeff et al. 2016; Lennon et al. 2014). Der beim Pankreaskarzinom bisher am häufigsten verwendete Tumor- bzw. Biomarker für die Diagnostik wie auch das Management der Behandlung, ist das Carbohydrate Antigen 19-9, kurz CA 19-9, gefolgt von CEA, Carcinoembryonales Antigen. Die insgesamt in der Allgemeinbevölkerung eher geringe Inzidenz des Pankreaskarzinoms erfordert einen sehr genauen Screening-Test um die Rate an falsch positiven Ergebnissen zu minimieren, die zu weiteren bestätigenden und vor allem teuren und belastenden Untersuchungen führen (Poruk et al. 2013a). Allerdings besitzt bisher keiner der verwendeten Biomarker eine wünschenswerte Genauigkeit bzw. Präzision, noch zeichnet sie eine besonders hohe Sensitivität oder Spezifität aus, um in der frühzeitigen Krebsdiagnostik wesentliche Hinweise zu geben. Dennoch werden sie im klinischen Alltag routinemäßig bezüglich der Fragestellung und auch des Überprüfens von Krankheitsprogress sowie des Therapieerfolges bzw. des Tumorrezidivs verwendet (Poruk et al. 2013b). Die Tatsache der fehlenden spezifisch sowie sensitiv hochwertigen Tumormarker des Pankreaskarzinoms führte bereits in den letzten Jahren dazu, dass die Suche nach neuen, verbesserten Biomarkern enorm an Priorität gewann (Poruk et al. 2013a) und verdeutlicht weiterhin die besondere Herausforderung der aktuellen und

zukünftigen Forschung, einen verbesserten Tumormarker zu entdecken, der auch in der frühen Diagnostik wesentliche Hinweise geben kann, um die aktuell schlechte Prognose durch frühzeitigere Therapie möglicherweise verbessern zu können.

1.4.1 Carbohydrate Antigen 19-9

Das Carbohydrate Antigen 19-9 ist Sialisiertes Lacto-N-Fucopentaose II und steht in Zusammenhang mit dem Lewis- Antigen, welches sich bei der Mehrheit der Menschheit an der Oberfläche der Erythrozyten befindet. Es wurde erstmalig 1979 durch Nachforschungen bzgl. der Isolation tumorassoziierter Antigene im kolorektalen Karzinom durch monoklonale Antikörper entdeckt. Einige Jahre später wurde herausgefunden, dass es auch von Pankreaskarzinomen produziert wird (Koprowski et al. 1981). CA 19-9 nimmt eine wichtige Position in der klinischen Behandlung der Patienten mit einem Pankreaskarzinom ein. So konnte durch bisherige Studien vermutet werden, dass die Höhe des CA 19-9 Wertes genutzt werden kann, um möglicherweise vorherzusagen, ob ein Patient für eine operative Behandlung in Frage kommt oder ob eine Fernmetastasierung vorliegt (Maithel et al. 2008; Poruk et al. 2013b). Weitere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen dem CA 19-9 Wert vor Behandlung und dem Gesamtüberleben der Patienten und legen nahe, dass der Wert ein unabhängiger Prognosemarker für das Gesamtüberleben ist (Reni et al. 2009; Poruk et al. 2013b). Zudem zeigten andere Studien, dass CA 19-9 Werte mit der Progression bzw. Remission einer Erkrankung korrelierten. So zeigten Studien, dass bei Patienten, die eine operative Behandlung erfahren, eine postoperative Erniedrigung des CA 19-9 Wertes ein Marker für verbessertes Überleben zu sein scheint (Kondo et al. 2010). Ebenso soll eine Senkung der postoperativen CA 19-9 Werte im Vergleich zum präoperativen Wert ein prognostischer Marker für ein verbessertes Gesamtüberleben bei Patienten sein, die sich zusätzlich einer Chemotherapie unterziehen (Halm et al. 2000; Poruk et al. 2013b).

CA 19-9 ist aktuell der am häufigsten verwendete Tumormarker für das Pankreaskarzinom, auch wenn es wiederum mehrere Faktoren gibt, die dessen Bedeutung begrenzen. So gibt es bspw. Menschen, die das Lewis-Antigen nicht exprimieren, und daher auch kein CA 19-9. CA 19-9 wird somit bei diesem Teil der Population (etwa 6% der weißen, 22% der dunkelhäutigen Bevölkerung betroffen) (Tempero et al. 1987) falsch negativ ausfallen, welches die Effektivität als diagnostischen Marker erheblich reduziert. Der klinische Grenzwert liegt aktuell bei 37 U/ml (Poruk et al. 2013b). Zudem legen weitere Studien nahe, dass aufgrund des niedrigen positiv prädiktiven Wertes, ein Screening asymptomatischer Patienten mittels CA 19-9 ineffektiv ist, ebenso wie bei sehr kleinen Karzinomen im Anfangsstadium (Locker et al. 2006). Die Tatsache,

dass CA 19-9 kein allzu spezifischer Tumormarker für das Pankreaskarzinom ist, wird ebenfalls dadurch verdeutlicht, dass CA 19-9 auch bei gutartigen Leber-, Gallenwegs- und Pankreaserkrankungen erhöht sein kann sowie bei anderen extrapankreatischen Karzinomen. CA 19-9 ist daher zusammenfassend ein sehr gut nützlicher Serummarker, um das Tumorstadium, die Resektabilität, das Gesamtüberleben sowie das Therapieansprechen vorherzusagen, jedoch weniger für diagnostische Zwecke geeignet (Poruk et al. 2013b). Dieses betont noch einmal die Priorität der zukünftigen Untersuchungen, weitere, präzisere sowie spezifisch und sensitiv hochwertige Tumormarker des Pankreaskarzinoms zu finden.

1.4.2 Carcinoembryonales Antigen

Das Carcinoembryonale Antigen, kurz CEA, ist nach CA 19-9 der zweithäufigste verwendete Biomarker des Pankreaskarzinoms. Aufgrund einer geringeren Spezifität sowie Sensitivität im Vergleich zu CA 19-9, ist er noch weniger geeignet für die Diagnostik des Pankreaskarzinoms. Der obere Grenzwert liegt zwischen 2,5-5 ng/ml (Poruk et al. 2013b).

CEA nimmt jedoch einen enorm wichtigen Stellenwert in der Diagnostik sowie Behandlung von Patienten ein, die an einem Karzinom des Magen-Darm-Traktes leiden und wird dort als Routinemarker sowohl in den Therapieprozess als auch in das klinische Management mit einbezogen (Hall et al. 2019).

1.5 Pankreatitis

1.5.1 Akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis stellt eine der häufigsten Gründe einer Krankenhausbehandlung in der Gastroenterologie in den Vereinigten Staaten dar (Peery et al. 2012). Das Risiko einer akuten Pankreatitis steigt progredient mit dem Alter (Yadav und Lowenfels 2013), hat insgesamt jedoch nur eine geringe Mortalitätsrate mit etwa 1% (Peery et al. 2012). Die häufigste Ursache einer akuten Pankreatitis ist weltweit die biliäre Genese, gefolgt von Alkoholkonsum bzw. -abusus (Yadav und Lowenfels 2006). Das Risiko einer biliären Genese steigt mit dem Alter und häufiger sind hierbei Frauen mittleren Alters betroffen. Die Cholezystektomie ist bei biliärer Genese der wichtigste Therapieansatz, um rezidivierende Schübe, die häufig schwerwiegender ausfallen, zu verhindern (Yadav und Lowenfels 2013). Weiterführend erhöhen Nikotinabusus (Alexandre et al. 2011), abdominale Adipositas (Khatua et al. 2017) und metabolische Faktoren wie Hypercalcämie, Hypertriglyceridämie, sowie azidotische Verhältnisse das Risiko einer akuten Pankreatitis (Yadav und Lowenfels 2013). Adipositas erhöht zudem auch das Risiko für einen schweren Verlauf und geht häufiger mit systemischen oder lokalen Komplikationen sowie einer

Mortalitätssteigerung einher (Hong et al. 2011). Diabetes mellitus Typ 2 scheint ebenfalls das Risiko, eine akute Pankreatitis zu erleiden, zu erhöhen (Girman et al. 2010), was dazu führt, dass die Anzahl der Pankreatitiden in der Zukunft aufgrund einer stetig zunehmenden Anzahl an Diabeteserkrankungen womöglich steigt (Yadav und Lowenfels 2013). Einige Studien lassen vermuten, dass eine akute Pankreatitis zunächst in eine wiederkehrende akute Pankreatitis und letztendlich in eine chronische Form übergehen kann (Sankaran et al. 2015). Insgesamt haben etwa 20-30% der Patienten eine erneute Pankreatitis und ca. 10% entwickeln eine chronische Pankreatitis, häufig in Verbindung mit einem Alkohol- oder Nikotinabusus oder im Rahmen einer erblichen Pankreatitis (Yadav und Lowenfels 2013).

1.5.2 Chronische Pankreatitis

Die chronische Pankreatitis, auch wenn sie eine geringere Inzidenz aufweist als die akute Form, reduziert die Lebensqualität der Patienten deutlich. Sie ist charakterisiert durch permanente abdominelle Schmerzen, häufige Schmerzexazerbationen sowie exokrine und/oder endokrine Insuffizienz und ist häufig eine Erkrankung des mittleren Alters, während Männer insgesamt häufiger betroffen sind als Frauen. Die in den letzten Jahren zunehmende Prävalenz ist auch durch die verbesserte und hochwertigere Qualität der bildgebenden Verfahren bedingt (Yadav und Lowenfels 2013). Alkoholkonsum ist und bleibt vermutlich der wichtigste Risikofaktor (Coté et al. 2011; Frulloni et al. 2009). So wurde herausgefunden, dass die Prävalenz einer chronischen Pankreatitis um das Vierfache höher ist bei Menschen mit einem Alkoholabusus in der Vorgeschichte im Vergleich zu jenen ohne (Yadav et al. 2007). Nikotinabusus stellt einen Cofaktor zum Alkoholkonsum dar und sorgt dementsprechend für eine Risikoerhöhung (Yadav et al. 2009). Daneben gelten auch einige Autoimmunerkrankungen, wie Zöliakie, systemischer Lupus erythematodes oder auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen als Risikofaktoren (Yadav und Lowenfels 2013; Sadr-Azodi et al. 2012).

Die chronische Pankreatitis erhöht die Gesamtmortalität, häufig sterben die Patienten jedoch an anderen, nicht das Pankreas betreffenden chronischen Erkrankungen, Krebs oder Infektionen (Yadav und Lowenfels 2013). Die chronische Pankreatitis erhöht das Risiko für ein Pankreaskarzinom um das Zehnfache (Kleeff et al. 2016).

2. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war der Nachweis der Expression von ALDH1A3 in sechs verschiedenen pankreatischen Karzinomzelllinien mittels Western-Blot und qPCR sowie in humanem Pankreasgewebe mittels qPCR. Ebenfalls sollte die Regulation dieses Enzyms bei drei der sechs Zelllinien näher untersucht werden, sowie nachfolgend die dadurch entstehenden Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen.

Folgende Fragen sind dabei besonders von Bedeutung:

Wie hoch ist die Expression der ALDH1A3 in ausgewählten humanen Gewebeproben und in den untersuchten pankreatischen Karzinomzellen?

Welche proliferativen Effekte sind nach der transienten ALDH1A3-Herunterregulierung in pankreatischen Karzinomzelllinien zu erwarten?

Wie wirkt sich der Einsatz von leitliniengetreuer Chemotherapie auf die ALDH1A3 - Regulation und die Proliferation der Zellen aus?

Ergeben sich aus den gewonnenen Daten Hinweise auf eine diagnostische und therapeutische Nutzung?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort, Land
5xRT-Puffer	Invitrogen, Karlsbad, USA
Abraxane 5 mg/ ml	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Acrylamid/ Bis-Acrylamid 30% 29:1	Carl Roth GmbH+Co KG Karlsruhe, Deutschland
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	Biochrom, Berlin, Deutschland
APS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bovine Fetal Serum	Gibco, Paisley, Schottland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
CHAPS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
DEPC-Wasser	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DMEM	ThermoFisher Scientific, Dreieich, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
dNTP (dATP, dTTP, CCTP, dGTP)	Invitek, Berlin, Deutschland
DTT (Proteinlysepuffer)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DTT (reverse Transkriptase)	Invitrogen, Carlsbad, USA
ECL-Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA

Entwickler	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Fixierer	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gemcitabin 40 mg/ ml	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HBSS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	TSI GmbH&Co KG, Zeven, Deutschland
MasterMix 5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus (no ROX)	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Methanol	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
MTT	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphat Buffered Saline	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Protein-Assay-Kit	Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland
PVDF-Membran	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Rainbowmarker	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Random Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNasin	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI-1640-Medium	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
SDS	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
siRNA ALDH1A3	Santacruz, Heidelberg, Deutschland

siRNA CoA ALDH1A3	Santacruz, Heidelberg, Deutschland
SiRNA Transfectionmedium	Santacruz, Heidelberg, Deutschland
Superscript II	Invitrogen, Carlsbad, USA
TEMED	Bio-Rad, München, Deutschland
Thiourea	Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
TRIS	Carl Roth GmbH+Co KG Karlsruhe, Deutschland
TRIZOL Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin	Gibco, Paisley, Schottland
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Urea	AmershamBiosciences, Uppsala, Schweden

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Hersteller, Ort, Land
6-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Brutschrank Cytoperm 2	Heraeus, Gera, Deutschland
Elektronik-Rührer Poly 15	VARIOMAG, München, Deutschland
Elektrophoresekammer Mini-Protean®Series	Bio-rad, München, Deutschland
Kühlzentrifuge Biofuge 28s	Heraeus, Gera, Deutschland
Mikro-Dismembrator S	Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	ZEISS, Jena, Deutschland
UV-Spectrophotometer	Shimadzu, Jena, Deutschland

Pipette Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Pipetus	Hirschman Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Rollenmischgerät RM5	VWR, Darmstadt, Deutschland
Rotor-Gene Q System	Qiagen, Mainz, Deutschland
Schüttler	HLC, Bovenden, Deutschland
Teflonbehälter mit Mahlkugel	Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Transferkammer	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Waage	Sartorius Basic, Göttingen, Deutschland
Wasserbad WN 14	Memmert GmbH& CO KG, Schwabach, Deutschland
Zellkulturzentrifuge Multifuge X3R	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Sicherheitswerkbank	Hera Safe, Gera, Deutschland
Zellkulturflasche 25cm ² ,75cm ² ,175cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper	Zielspezies	Ursprung	Hersteller
Anti-ALDH1A3	Human	Rabbit	Sigma-Aldrich
Anti-β-Actin	Human	Mouse	Sigma-Aldrich
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Rabbit	Goat	Abcam
Goat Anti-Mouse-IgG-HRP	Mouse	Goat	Abcam

Tabelle 4: Primer

Zielgen	Primersequenz 5' → 3'	Temperatur (°C)	Basenpaarlänge
ALDH1A3	S AGGAGATTTTCGGGCCAGTG AS AGCCAACCTTCAGGGCTTTGT	60	137 bp
β-Actin	S AGGCACCAGGGCGTGAT AS GCCCACATAGGAATCCTTCTGAC	60	51 bp
18s	S GTTGGTGGAGCGATTGTCTGG AS AGGGCAGGGACTTAATCAACGC	64	151 bp
hRPII	S CGCTTAAGCCTTCCAACAAG AS GAGGACGACCTTGCTGTCTC	60	213 bp

3.2 Patientengewebe

Die Gewebe entstammen Patienten, die bei medizinischer Indikation in der Universitätsklinik für Viszerale, Gefäß- und Endokrine Chirurgie operiert wurden. Die Patienten erklärten sich mit einer wissenschaftlichen Untersuchung und der Nutzung der Gewebe zu Forschungszwecken einverstanden, ebenso lag eine Genehmigung der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor (07.12.2001).

Unmittelbar nach der operativen Entnahme der Gewebeproben wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gelagert. Alle Proben wurden durch ein pathologisches Institut begutachtet und klassifiziert. Die Proben, die als nicht pathologisch verändertes Gewebe klassifiziert wurden, wurden im Rahmen von Karzinomoperationen entnommen und zeigten sich makro- sowie mikroskopisch tumorfrei.

Insgesamt wurden 40 Gewebe mittels Real-Time-PCR untersucht (Tabelle 5), als Positivkontrolle diente die Zelllinie AsPC-1.

Tabelle 5: Untersuchte Gewebeproben und jeweilige Entitäten

Gewebetyp	Pankreaskarzinom	Pankreatitis	nicht pathologisch verändertes Gewebe
Anzahl (n)	16	13	11

Tabelle 6: Differenzierung der Gewebeproben

Probe	Gewebe	TNM-Stadium	Geschlecht	Alter
1	duktales Pankreasadenokarzinom	pT2 pN1 M1	m	71
2	duktales Pankreasadenokarzinom	pT1b N0 M0	f	70
3	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3 pN1a M1	m	71
4	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3 N1b M0	m	77
5	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3 N1b M1	f	73
6	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3 pN0 M1	m	47
7	duktales Pankreasadenokarzinom	pT4 pN1 M0	m	58
8	duktales Pankreasadenokarzinom	pT1 pN0 M0	f	75
9	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3p N1 M1	m	66
10	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3 pN0 M0	f	61
11	duktales Pankreasadenokarzinom	pT4 pN1b M0	f	68
12	duktales Pankreasadenokarzinom	pT4p N1 M0	m	64
13	duktales Pankreasadenokarzinom	T3 N1 M1	m	57
14	duktales Pankreasadenokarzinom	pT2 N1 M0	f	58
15	duktales Pankreasadenokarzinom	pT3 N1b M0	m	73
16	duktales Pankreasadenokarzinom	pT1 pN0 M0	f	65

17	chronische Pankreatitis		m	58
18	chronische Pankreatitis		m	39
19	chronische Pankreatitis		m	31
20	chronische Pankreatitis		f	63
21	chronische Pankreatitis		m	45
22	chronische Pankreatitis		m	61
23	chronische Pankreatitis		f	48
24	chronische Pankreatitis		f	57
25	chronische Pankreatitis		m	42
26	chronische Pankreatitis		f	75
27	chronische Pankreatitis		m	55
28	chronische Pankreatitis		m	38
29	chronische Pankreatitis		m	53
30	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		f	72
31	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	45
32	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		f	53
33	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	54
34	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	55
35	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	56
36	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	60
37	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	64

38	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		f	80
39	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	42
40	Nicht pathologisch verändertes Gewebe		m	71

3.2.1 Homogenisierung

Für die weitere Untersuchung der tiefgefrorenen und gelagerten Gewebeproben mussten diese zunächst homogenisiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gewebe und alle benötigten Materialien in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden, damit ein An- bzw. Auftauen verhindert werden konnte. Das gefrorene Gewebematerial sowie eine teflonbeschichtete Mahlkugel wurden in einen Teflon Behälter gegeben und in einem Micro-Dismembrator S für 45 Sekunden bei 2.500 rpm geschüttelt. Infolge der mechanischen Zerkleinerung gewinnt man aus den Gewebeproben ein homogenes Pulver.

3.3 Pankreaszelllinien

In dieser Arbeit wurden insgesamt sechs pankreatische Karzinomzelllinien, die Adenokarzinome repräsentieren, die sich aus Pankreaszellen entwickeln, hinsichtlich ihrer ALDH1A3-Expression untersucht: AsPC-1, BxPC-3, Capan- 1, MIA PaCa 2, PANC-1, SU.86.86. Sie sind kommerziell bei ATCC erhältlich.

Die Zelllinie Capan-1 wurde aus einer Lebermetastase eines pankreatischen Adenokarzinoms eines 40-jährigen männlichen Patienten etabliert (lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-79.aspx?geo_country=de#generalinformation).

Aus einem pankreatischem Adenokarzinom eines 65-jährigen männlichen Patienten entstammt die Zelllinie MIA PaCa-2 (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx?geo_country=de#generalinformation).

Die Zelllinie PANC-1 entstammt aus dem pankreatischen Adenokarzinom eines 56-jährigen männlichen Patienten (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1469.aspx?geo_country=de#generalinformation).

Die folgenden drei pankreatischen Karzinomzellen wurden weiterführend hinsichtlich einer Korrelation zwischen der Reduktion der ALDH1A3-Expression und proliferationshemmenden Wirkungen untersucht.

Die Zelllinie AsPC-1 entstammt dem malignen Aszites einer weiblichen 62-jährigen Patientin mit einem histologisch bestätigten und metastasierten Pankreas-Adenokarzinom (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx?&p=1&rel=generalinformation). Diese Zellen exprimieren CEA (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx?geo_country=de#characteristics).

Aus dem pankreatischen Adenokarzinom einer 61-jährigen Patientin wurde die Zelllinie BxPC-3 etabliert (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1687.aspx?&p=1&rel=generalinformation). Auch diese Zelllinie exprimiert CEA (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1687.aspx?geo_country=de#characteristics).

Die Zelllinie SU.86.86 entstammt einer Lebermetastase eines duktales Pankreas-Adenokarzinoms einer 57-jährigen Patientin. Ebenfalls exprimiert wird CEA (lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1837.aspx?geo_country=de#characteristics).

3.3.1 Zellkultivierung

Jegliche Arbeiten an den Zelllinien wurden steril in einer Sicherheitswerkbank vollzogen. Sorgfältiges Arbeiten in Kombination mit der dort vorhandenen vertikalen Luftströmung sowie die Verwendung von 70% vergällten Ethanol zur Hand- und Arbeitsplatzdesinfektion und steriler Materialien sorgten für eine saubere Umgebung, wodurch Kontaminationen vermieden wurden. Drei der sechs Zelllinien, Capan-1, MIA PaCa-2 und PANC-1, benötigten das Nährmedium DMEM. Die drei Zelllinien, die weiterführend hinsichtlich einer Korrelation zwischen der Reduktion der ALDH1A3-Expression und proliferationshemmender Wirkung untersucht wurden, benötigten das Nährmedium RPMI-1640, welches unter anderem Biotin und Vitamin B 12 enthält. Zusätzlich wurde diesem 10% fötales Kälberserum (FBS) zugesetzt. Vor Gebrauch wurde das FBS durch Hitzeinaktivierung bei 56°C für insgesamt 30 Minuten inaktiviert. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden wurde dem Nährmedium zusätzlich eine Antibiotikamischung, bestehend aus Penicillin und Streptomycin, zum Anteil von 1% der Gesamtmenge des Mediums hinzugefügt. Verwendet wurde dieses Vollmedium, nachdem es auf 37°C Grad erwärmt wurde.

Die Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Zellkultivierung mussten sie aufgetaut werden. Dazu wurden die Zellen mit dem auf 37°C erwärmten Nährmedium versetzt und langsam erwärmt. Anschließend wurden sie für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, damit sich das Zellpellet am Boden sammelt. Der Überstand wurde verworfen. Dieses dient dem Entfernen des Dimethylsulfoxid (DMSO), welches zuvor zu 1:9 mit FBS für die Kryokonservierung verwendet wurde. Anschließend wurde die Zellanzahl mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer bestimmt, um eine 25 cm² Zellkulturflasche mit der entsprechenden Zellzahl beimpfen zu

können. Die mit den Zellen befüllte Zellkulturflasche wurde dann in einem Inkubator mit einer 95°C-wasserdampf-gesättigten Atmosphäre und einer CO₂-Konzentration von 5% bei 37°C kultiviert. In entsprechenden zeitlichen Abständen wurden das Aussehen sowie das Wachstumsverhalten und die Morphologie der Zellen durchs Mikroskop beurteilt und dementsprechend das Medium gewechselt.

3.3.2 Zellpassagierung

Nach regelmäßigem Mediumwechsel und entsprechender Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei etwa 37°C wuchsen die Zellen angemessen, sodass sie sich schließlich in einem konfluenten Zustand befanden, woraufhin sie gesplittet werden mussten. Dazu wurden sie zunächst mit HBSS zweimal gewaschen, um das FBS zu entfernen, anschließend wurde je nach Zellflaschengröße eine definierte Menge an Trypsin auf die Zellen gegeben, welches dazu diente, die Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Die gelösten Zellen wurden in einem nächsten Arbeitsschritt zu dem entsprechenden Vollmedium gegeben, anschließend wurde die Suspension für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das sich am Boden befindliche Zellpellet wurde mittels Vollmedium resuspendiert. Nach entsprechender Zellzählung wurde eine neue Zellkulturflasche mit ausgezählter Zellzahl beimpft. Dieser Vorgang wurde bis zur vierten Passage wiederholt, bevor die Zellen für weitere Versuche verwendet wurden, um eine Beeinflussung durch die Kryokonservierung zu vermeiden.

3.3.3 Transiente Transfektion mittels spezifischer siRNA

Bei der small interfering RNA (siRNA) handelt es sich um kurze (20-30 Nukleotide), doppelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle, die keine Proteine codieren. Sie assoziieren sich mit Ribonucleoprotein-Partikeln (RNP) zum RNA-Induced Silencing Complex (RISC), in diesen sind nur einzelsträngige siRNA enthalten, und verbinden sich mit komplementären einzelsträngigen mRNA-Molekülen. RISC spaltet die Ziel-mRNA in der Mitte der komplementären Region und verhindert dadurch ihre Expression, sodass die ursprüngliche Funktion dieser unterbunden wird. Man spricht von einer RNA-Interferenz (Siomi und Siomi 2009; Meister und Tuschl 2004; Elbashir et al. 2000).

Die oben erwähnten drei Zelllinien wurden mit der spezifischen siRNA behandelt, um anschließend sowohl auf Protein- mittels Western-Blot wie auch auf RNA-Ebene mit Hilfe einer qPCR-Analyse zu prüfen, ob eine Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression erfolgt ist. Die RNA- bzw. Proteinisolation erfolgte nach 72 Stunden.

Es wurde entsprechend des siRNA Transfektion Protokoll von Santa Cruz Biotechnology, Inc vorgegangen. Zunächst wurde die jeweilige Anzahl an benötigten 6-Well-Platten mit im Vorfeld gezählter Zellanzahl (2×10^5)/Well beimpft. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 10% FBS- haltigem, antibiotikafreiem RPMI-Medium inkubiert. Bei 70%iger Konfluenz erfolgte die Transfektion mit der spezifischen ALDH1A3 siRNA (im Folgenden siRNA) und der siRNA- Kontrolle A (im Folgenden siRNA CoA) über einen Zeitraum von 72h. Dazu wurde zusätzlich die ALDH1A3-Expression der Zellen untersucht, die nur reines Vollmedium erhielten, diese wurden als Wildtypen gekennzeichnet (WT 1/ WT 2). Nach Ablauf der 72h wurden sowohl die RNA als auch die Proteine isoliert wie auch der MTT Assay durchgeführt.

3.3.4 Behandlung der Zellen mit Chemotherapie

Neben dem Einsatz der spezifischen siRNA sollte ebenfalls der Einfluss der in der klinischen Behandlung von Pankreaskarzinomen eingesetzten Chemotherapie auf die Expression der ALDH1A3 überprüft werden. Verwendet wurde hier das Chemotherapeutikum Gemcitabin in Kombination mit Abraxane. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigte sich bisher in klinischen Studien eine gewisse Korrelation zwischen hoher ALDH1A3-Expression und erhöhter Resistenz gegenüber einer Strahlenbehandlung wie auch einer Chemotherapie. Aufgrund dieser Feststellung war es nun auch interessant zu untersuchen, inwiefern die Behandlung auch mögliche Auswirkungen auf die ALDH1A3-mRNA-Expression zeigen könnte. Zunächst wurde eine entsprechende Anzahl an 6-well-Patten mit einer im Vorfeld definierten Anzahl an Zellen beimpft (2×10^5)/ Well. Für 24h erfolgte die Inkubation, verwendet wurde ein antibiotikafreies RPMI- Medium mit 10% FBS. Anschließend erfolgte die Auftragung der Chemotherapie, die Dosierungen (Abraxane 125 mg/ 10.000 cm²; Gemcitabin 1000 mg/ 10.000 cm²) erfolgten gemäß Herstellerangaben und wurde entsprechend der Oberfläche der Zellkulturflaschen bzw. Well-Platten angepasst. Nach Ablauf weiterer 24h erfolgte die RNA-Isolation sowie ebenfalls der MTT-Test.

3.4 RNA-Gewinnung und Real-Time PCR

3.4.1 RNA-Isolation und Vermessung

Die RNA-Gewinnung erfolgte mittels Trizol Reagent. 1 ml Trizol wurde auf 100 mg Gewebehomogenisat gegeben, nach fünf Minuten Inkubationszeit wurde 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, welches nun für 15 Minuten bei 14.000 x g und 4°C zentrifugiert wurde. Im nächsten Schritt wurde die farblose, obere, RNA enthaltende Phase in ein neues Tube überführt und mit 0,5 ml Isopropanol versetzt. Nach weiteren zehn Minuten Inkubationszeit erfolgte eine

weitere Zentrifugation für zehn Minuten bei 14.000 x g und 4°C. Folglich wurde das sichtbare RNA-Pellet mit 75% Ethanol zweimal gewaschen, anschließend erfolgte die Lufttrocknung. Nachfolgend wurde RNase freies Wasser hinzugegeben, sodass die RNA im weiteren Schritt bei 60°C für 10 Minuten gelöst wurde. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Photometer sowie dafür hergestellten RNA- Vermessungspuffer (s. Tabelle 7) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Tabelle 7: RNA-Vermessungspuffer 10 mM TRIS/HCL

Substanz	Menge
DEPC-H ₂ O	10 ml
1 M TRIS	100 µl
HCL	auf pH-Wert 7,5

3.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Damit eine qPCR erfolgen kann, muss zunächst die gewonnene Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dabei wurde 1 µg RNA mit DEPC-Wasser versehen, sodass sich ein Gesamtvolumen von 10 µl ergibt. Dieses wurde 3 Minuten bei 70°C mittels Thermocycler inkubiert. Anschließend wird 15 µl des Reaktionsmixes (s. Tabelle 8) hergestellt und der RNA hinzugegeben, woraufhin ein weiterer Inkubationsschritt folgt, unterteilt in 45 Minuten bei 42°C, gefolgt von drei Minuten bei 95°C. Die nun hergestellte cDNA wird bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Zusammensetzung Reaktionsmix (15 µl) Reverse Transkription

Substanz	Menge
5x RT-Puffer	5,0 µl
12,5 mM dNTP-Mix	1,0 µl
Randomprimer 100 ng/µl	3,0 µl
0,01 M DTT	2,5 µl
RNasin (40 U/µl)	0,5 µl
Superscript II (200 U/µl)	0,3 µl
DEPC-H ₂ O	2,7 µl

3.4.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mittels Rotor-Gene Q System sowie dem Enzym MasterMix 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) nach den aufgelisteten Bedingungen durchgeführt (s. Tabelle 9). Verwendet wurde ein Ansatz von insgesamt 20 µl, bestehend aus 18 µl hergestelltem Enzym-MasterMix (5xHOT FIREPol®, Forward Primer, Reverse Primer, RNase freies H₂O) und 2 µl cDNA. Bei allen untersuchten Proben erfolgte eine Doppelbestimmung. Durch den Einsatz spezifischer Primer und einer DNA-Polymerase wird die Vervielfältigung der bestimmten cDNA-Sequenz ermöglicht, dadurch kann es zu einer Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs EvaGreen kommen. Während der standardmäßig erfolgenden 40 PCR-Zyklen wird die Veränderung der Farbstoffeinlagerung gemessen und in Form einer PCR-Kurve dargestellt. Als Positivkontrolle diente entweder der jeweilige Wildtyp oder die spezifische siRNA-Kontrolle. Zur Überprüfung der mRNA-Expression in allen sechs verwendeten Karzinomzellen wurde die Expression der Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 als 100% angesetzt und die untersuchten Expressionen der anderen Zelllinien ins Verhältnis gesetzt. Als Negativkontrolle wurde RNase freies Wasser verwendet.

Tabelle 9: Real-Time PCR- Bedingungen

Vorgang	Temperatur in °C	Dauer
Hold	95°C	15 Min
Denaturierung	95°C	15s
Annealing	60°C	20s
Elongation	72°C	20s

Zum Abgleich der Abweichungen der qPCR-Reaktionen der Ziel-Transkripte während der Umschreibung in cDNA wurden die Proben mit Hilfe der Housekeeping Genes β -Actin, 18 s und hRPII normalisiert (s. Tabelle 4). Die Länge der Primer sollte bei dem Rotor-Gene Q System 200 Basenpaare nicht überschreiten, daher wurde ein spezifischer ALDH1A3-Primer nach etwaigen Richtlinien designt.

3.4.4 Auswertung

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Rotor-Gene Q Series Software Qiagen. Hierbei wurde zunächst die Schmelzkurve aller Proben eines Primers kontrolliert. Im nächsten Schritt wurden die Ziel- und Housekeeping-Gene-Transkripte jeweils mit der entsprechenden Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Ziel-Transkripte wurden in

eine Excel-Software überführt und mit den entsprechenden Werten der Housekeeping Gene Ergebnisse normalisiert und anschließend als Prozentwerte im Vergleich zur Positivkontrolle dargestellt.

3.5 Protein-Gewinnung und Western-Blot

3.5.1 Proteinisolation und Vermessung

Für die Proteinisolation wurde ein aus Harnstoff bestehender Lysepuffer verwendet (s. Tabelle 10). Die Zellen, die zum konfluenten Mono-Layer angewachsen sind, wurden durch Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die entsprechend benötigte Menge an Lysepuffer den Zellen beigefügt. Anschließend wurde das Protein-Lysat gevortext und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert, um die ungelösten Zellreste zu pelletieren. Für nachfolgende Untersuchungen wurde nur der Überstand verwendet, in dem sich das gewünschte Protein befand. Die sich an die Proteinisolation anschließende Vermessung erfolgte per Doppelbestimmung nach der Bradford Methode bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Protein-Lysepuffers (10 ml)

Substanz	Menge
7 M Urea	4,2 g
2 M Thiourea	1,524 g
4% CHAPS	0,4 g
40 mM DTT	0,0616 g
Aqua Bidest	auf 10 ml auffüllen

3.5.2 Probenvorbereitung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei einer Western-Blot-Analyse werden Proteine auf einer SDS-Page anhand ihrer Größe aufgetrennt, nachfolgend auf eine spezifische Membran geblottet und anschließend mit bestimmten Antikörpern detektiert. Die für diese Methode benötigten Polyacrylamidgele bestanden sowohl aus einem Trenn- als auch aus einem Sammelgel, deren Zusammensetzung erfolgte wie unten aufgeführt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Substanz	Trenngel 12%	Substanz	Sammelgel 4%
H ₂ O	3,3 ml	H ₂ O	1,4 ml
30% Acrylamid mix 29:1	4,0 ml	30 % Acrylamid mix 29:1	0,33 ml
1.5 M TRIS (pH 8.8)	2,5 ml	1.0 M TRIS (pH6.8)	0,25 ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,02 ml
10% APS	0,1 ml	10% APS	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,002 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung 1,5 M TRIS/HCl

Substanz	Menge
TRIS (MW 121,14)	90,85 g
Aqua Bidest	in 400 ml lösen
27% HCl	25 ml
Aqua Bidest	auf 500 ml auffüllen

Tabelle 13: Zusammensetzung 1,0 M TRIS/HCl

Substanz	Menge
TRIS (MW 121,14)	6,057 g
Aqua Bidest	in 40 ml lösen
27% HCl	6 ml
Aqua Bidest	auf 50 ml auffüllen

Tabelle 14: Zusammensetzung 10% SDS

Substanz	Menge
SDS	5 g
Aqua Bidest	in 50 ml lösen

Tabelle 15: Zusammensetzung 10 % APS

Substanz	Menge
APS	0,1 g
Aqua Bidest	in 1 ml lösen

Über Nacht wurden die vorbereiteten Gele gelagert, um ein Festwerden der Materialien zu gewährleisten. Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele in einer mit 1 x Laufpuffer (s. Tabelle 16) gefüllten Elektrophoresekammer eingespannt. 5 µg Protein jeder zuvor vermessenen Probe wurde vor der Elektrophorese mit 5 µl eines hergestellten Ladepuffers versetzt (s. Tabelle 17) sowie anschließend 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Daraufhin erfolgte die Auftragung der Proben auf die Gele.

Tabelle 16: Zusammensetzung 1 x Laufpuffer

Substanz	Menge
TRIS	30 g
Glycin	144 g
SDS	6 g
Aqua Bidest	in 1 l lösen

Tabelle 17: Zusammensetzung Ladepuffer

Substanz	Menge
1 M TRIS/HCl pH 6,8	2,4 ml
Glycerin (Glycerol 87%)	4 ml
SDS	0,8 g
DTT	0,154 g
Aqua Bidest	10 ml
Bromphenolblau	0,01%

Für spätere Molekulargewichtsbestimmungen wurde zusätzlich für jede Membran bei jedem Lauf ein Rainbowmarker verwendet. Durch das aufgebaute elektrische Feld wurden die Proteine bei 20-40 mA innerhalb von 1,5-2 Stunden aufgetrennt.

3.5.3 Western-Blotting

Die auf der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in einer Blot-Kammer auf eine PVDF- Membran transferiert. Dieses Verfahren nennt man Nass-Blot. Zur Vorbereitung, wird das Gel auf die Membran gelegt, dabei war stets darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen bildeten. Von beiden Seiten wurden sowohl die Membran, die einmalig kurz zuvor in Methanol gelegt wurde, als auch das Gel von je zwei Filterpapieren sowie von einem Schwammtuch umhüllt, beides wurde vorher in einem hergestellten Transferpuffer (s. Tabelle 18) eingeweicht, und mit Hilfe eines Gitters, das für Stabilität und Halt sorgen sollte, in die Blot-Kammer verlagert. Zusätzlich wurde eine Kühlspirale in die Blot-Kammer gespannt, die eine dauerhafte Temperatur von 6°C gewährleisten sollte. Die Blot-Kammer wurde ebenfalls mit Transferpuffer gefüllt und das elektrische Feld anschließend angeschlossen. Der Blot-Vorgang erfolgte für 120 Minuten bei einer Stromstärke von 1 A.

Tabelle 18: Zusammensetzung Transferpuffer:

Substanz	Menge
Glycin	42 g
TRIS	9 g
Methanol	600 ml
Aqua Bidest	auf 2 l auffüllen

Durch die angeschlossene elektrische Spannung wanderten die Proteine vom Minuspol zum Pluspol und damit vom Gel auf die Membran.

3.5.4 Antikörpernachweisreaktion

Nach dem Blot-Vorgang wurde die PVDF-Membran zunächst für eine Stunde in einem Blocking- Puffer (TBS/T (s. Tabelle 20) und 5% Magermilchpulver) geblockt. Dieses verhindert, dass unspezifische Bindungen der Antikörper erfolgten. Nach Ablauf der 60 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem primären Rabbit Anti-ALDH1A3-Antikörper, der mittels Blocking-Puffer 1:200 verdünnt wurde, bei 4°C auf einem Rollenmischgerät über Nacht. Danach wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit 10 ml TBS/T bei Raumtemperatur gewaschen, um Antikörper zu lösen, die nicht spezifisch gebunden hatten. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörpers, Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), 1:20.000 in TBS verdünnt. Die Herkunft des sekundären Antikörpers richtet sich nach dem FC-Teil des primären Antikörpers. Die Inkubation erfolgte während kontinuierlichem Schwanken für eine Stunde bei

Raumtemperatur, anschließend fand erneut ein Waschvorgang statt. Nach dem Waschschrift wurde die PVDF-Membran 1 Minute in einer ECL™-Lösung inkubiert und die spezifischen immunoreaktiven ALDH1A3-Proteinbanden wurden auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-MP) mittels Entwickler- und Fixierlösung sichtbar gemacht. (s. Tabelle 21/22). Danach wurden alle zuvor gebundenen Antikörper mit Hilfe eines Stripping-Puffers (s. Tabelle 23) gelöst und mittels einer erneuten Waschprozedur entfernt.

Um sicher zu stellen, dass eine gleichmäßige Proteinmenge aufgetragen wurde, sind anschließend auf allen Membranen Inkubationen und Detektionen von β -Actin, einem Housekeeping Gene, durchgeführt worden. Die Auftragung von β -Actin erfolgte in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS. Inkubiert wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift, wurde der entsprechende sekundäre, Peroxidase-konjugierte Antikörper, Goat Anti-Mouse IgG H&L in einer Konzentration von 1:20.000, ebenfalls in TBS gelöst, aufgetragen. Anschließend erfolgte die Entwicklung für 5 Sekunden.

Tabelle 19: Zusammensetzung 10xTBS

Substanz	Menge
TRIS	24,2 g
NaCl	80 g
HCl	auf pH-Wert 7,5
Aqua Bidest	auf 1 l auffüllen

Tabelle 20: Zusammensetzung TBS/T

Substanz	Menge
10xTBS	100 ml
Aqua Bidest	900 ml
Tween 20	1000 μ l

Tabelle 21: Zusammensetzung Entwicklerlösung

Substanz	Menge
Aqua Bidest	473 ml
Entwickler	103 ml

Tabelle 22: Zusammensetzung Fixierlösung

Substanz	Menge
Aqua Bidest	370 ml
Fixierer	103 ml

Tabelle 23: Zusammensetzung Stripping Puffer

Substanz	Menge
0,2 M Glycin	15 g
HCL	auf pH-Wert 2,5
Aqua Bidest	1 l
Tween 20 (0,05%)	500 µl

3.5.5 Auswertung

Der Röntgenfilm (Hyperfilm-MP) wurde mittels Desktop-Scanner eingescannt und die darauf sichtbaren Banden wurden ihrer Größe nach anhand eines Markers zugeordnet. Für die Auswertung wurde das Computerprogramm Alpha View SA (Protein Simple) verwendet. Hierbei wurden zunächst die Grauwerte der Banden der entsprechenden Proben bestimmt und anschließend mit den Grauwerten der Banden der zugehörigen β -Actin-Proben normalisiert. Durch den vom Programm automatisch erfolgten Hintergrundabgleich sind alle abgebildeten und erhobenen Werte als Protein-Expressionen anzusehen, um zunächst bei allen sechs untersuchten Zelllinien die jeweilige ALDH1A3-Expression untersuchen zu können. Dabei wurden die Grauwerte der Zelllinie AsPC-1 als 100% angesetzt und entsprechend die Grauwerte der anderen Zelllinien ins Verhältnis gesetzt.

Bei den Western-Blots, die zur Untersuchung der ALDH-Herunterregulierung durch siRNA Transfektion angefertigt wurden, wurde stets eine unbehandelte Wildtyp-Kontrolle (WT 1/ WT 2) sowie eine spezifische ALDH1A3 siRNA- Kontrolle A (siRNA CoA), die als Positivkontrolle diente und als 100% angesetzt wurde, eingesetzt.

3.6 MTT Assay

Der MTT Assay ist ein Test, der auf Grundlage einer quantitativen kolorimetrischen Analyse das Überleben bzw. die Proliferation von Zellen misst. Durch ein Spektrophotometer (ELISA Reader) kann die Aktivität lebender Zellen in Form ihrer optischen Dichte abgelesen werden, somit wird

diese Methode genutzt, um Aussagen über Zytotoxizität, Proliferation oder Aktivierung von Zellen zu treffen. Dieses beruht auf der der Reaktion des gelben Substrats MTT in ein blaues Formazan bei der Inkubation mit lebendigen Zellen (Mosmann 1983).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Behandlung von Zellen auf ihre Proliferation mittels MTT Assay getestet werden im Vergleich zu unbehandelten Zellen bzw. ihren Kontrollen.

Zunächst wurde eine entsprechende Anzahl an Wells einer 96-Well-Platte mit einer vorab gezählten Anzahl an Zellen ($1,5 \times 10^4$)/ml ausgesät und für 24h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden 12-40 Wells mit dem jeweiligen Behandlungsmedium (siRNA mit siRNA Transfektionsmedium bzw. Chemotherapie: Abraxane 125 mg/ 10.000 cm² mit Gemcitabin 1000 mg/ 10.000 cm²) versehen, ebenso viele Wells mit der spezifischen siRNA Kontrolle A bzw. dem Leermedium (RPMI-Medium mit 10% FBS), welche jeweils die Positivkontrolle darstellten. Die Dauer des MTT Assays richtete sich nach der Dauer der zu untersuchenden Behandlungsmedien. Da die siRNA Transfektion nach 72h erfolgte, war auch der MTT-Test bei diesem Behandlungsmedium für 72h angesetzt. Alle 24h erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellreste zu entfernen und den wachsenden Zellen neues Nährmedium zur Verfügung zu stellen. Da die Behandlung der Zellen mit der eingesetzten Chemotherapie für 24 Stunden erfolgte, wurde auch der MTT Assay auf eine Dauer von 24 Stunden ausgerichtet. Vier Stunden vor Ablauf der 72 bzw. 24 Stunden, erfolgt die Zugabe von 20 µl MTT pro Well, dieser Farbstoff gelangt bei lebenden Zellen ins Zellinnere, sodass anhand eines Farbumschlags die proliferierenden Zellen detektiert werden können. Vier Stunden lang wurden die Zellen mit dem applizierten MTT im Brutschrank inkubiert, nach Ablauf wurde die sich auf den Zellen befindliche Mischung abgekippt und es wurden pro Well 100 µl DMSO hinzugegeben. Mittels ELISA Reader erfolgte anschließend das Ablesen bei einer Wellenlänge von 570 nm und der Referenzwellenlänge von 630 nm.

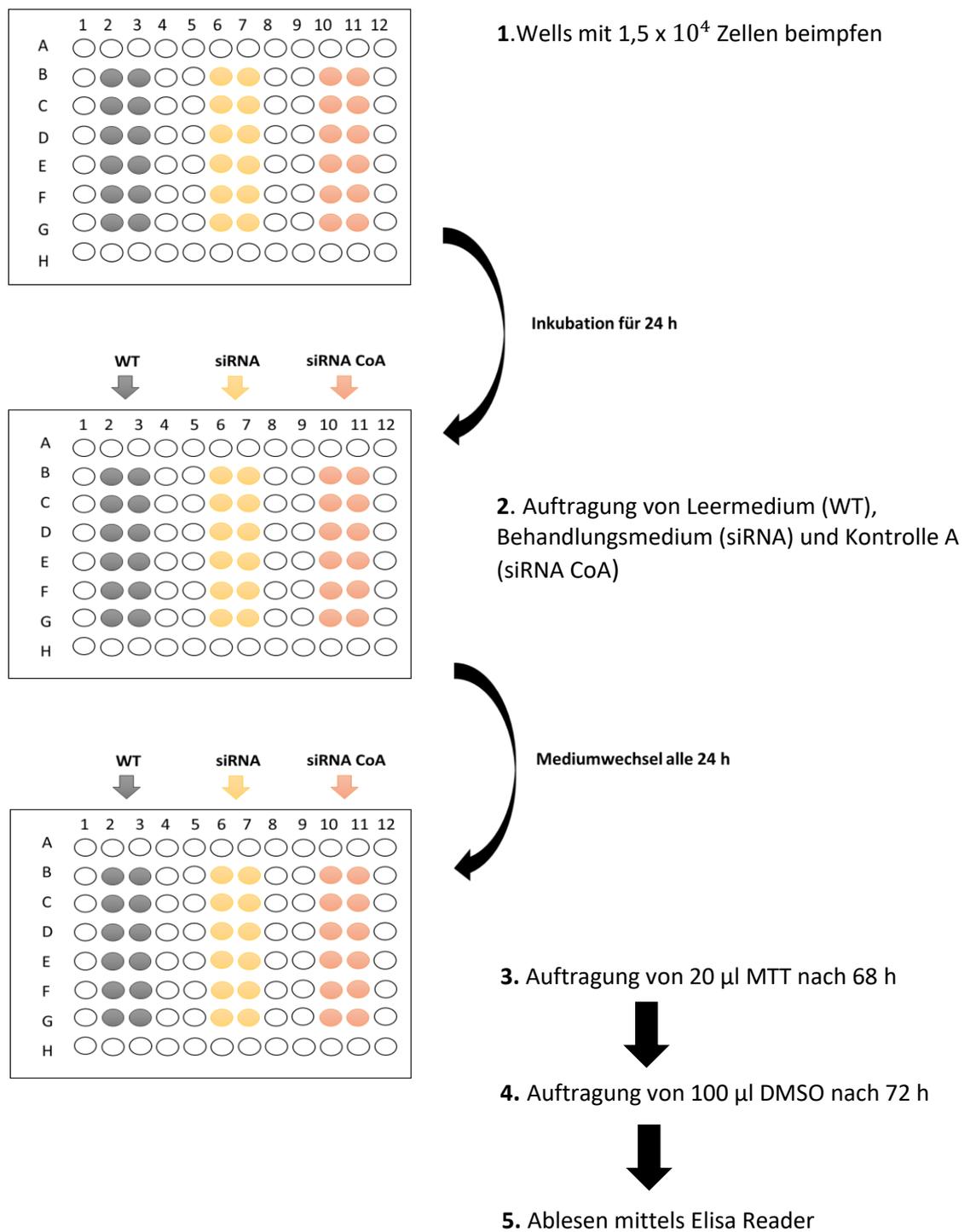


Abbildung 1: Graphik MTT Assay Versuchsdurchführung nach siRNA Transfektion

3.6.1 MTT Assay-Auswertung

Die Auswertung des MTT Assays erfolgte mit Hilfe eines Excel-Formats. Durch das Ablesen mittels Elisa-Reader erhielt man die entsprechende optische Dichte. Es erfolgte die Bestimmung

des Mittelwertes sowie der Standardabweichung. Die errechneten Mittelwerte wurden anhand eines Säulendiagramms dargestellt, sodass ein Vergleich der Proliferation zwischen behandelter Probe und Kontrolle ermittelt werden konnte.

3.7 Statistische Methoden

Alle Experimente in vitro wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und in Säulendiagrammen mit Standardabweichung mittels einer Excel-Software dargestellt. Die Datenverteilung wurde mittels D'Agostino & Pearson Omnibus bzw. Kolmogorow-Smirnow Normalitätstests untersucht. Abhängig von der Datenverteilung zur Überprüfung der Signifikanz wurden der parametrische und nicht-parametrische Mann-Whitney Test sowie für die Untersuchungen des Pankreasgewebe eine One-Way ANOVA Analyse verwendet. Das Signifikanzniveau wurde je nach p-Wert folgendermaßen markiert: *= p-Wert <0,05, **= p- Wert < 0,01, ***= p- Wert < 0,001.

Die Expression der ALDH1A3 in den Gewebeproben wurde mittels Streudiagramm mit Medianen und Interquartilsabständen dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 ALDH1A3-Expression in humanem Pankreasgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob sich die ALDH1A3-Expression in exemplarischen Pankreaskarzinom-, chronischer Pankreatitis- und nicht pathologisch veränderten Gewebeproben unterscheidet.

In dem folgenden Streudiagramm sind die Daten der Real-Time-PCR von insgesamt 40 Gewebeproben dargestellt und ausgewertet. Hierbei wurden die einzelnen Proben nur entsprechend der Hauptdiagnose aufgelistet: Pankreaskarzinom, chronische Pankreatitis und nicht pathologisch verändertes Gewebe. Deutlich zu erkennen ist die Varianz der Expression in den unterschiedlichen Entitäten, so ist die ALDH1A3-Expression am stärksten im Pankreaskarzinom, gefolgt von den Proben der Entität chronischer Pankreatitis. Am geringsten ist sie in den Proben, die als nicht pathologisch verändertes Gewebe klassifiziert wurden. Zusammenfassend und zur besseren Beurteilung wurden die Daten mittels Streudiagramm dargestellt. Hierbei wird die deutlich und signifikant erhöhte ALDH1A3-mRNA-Expression im Pankreaskarzinom im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen verbildlicht.

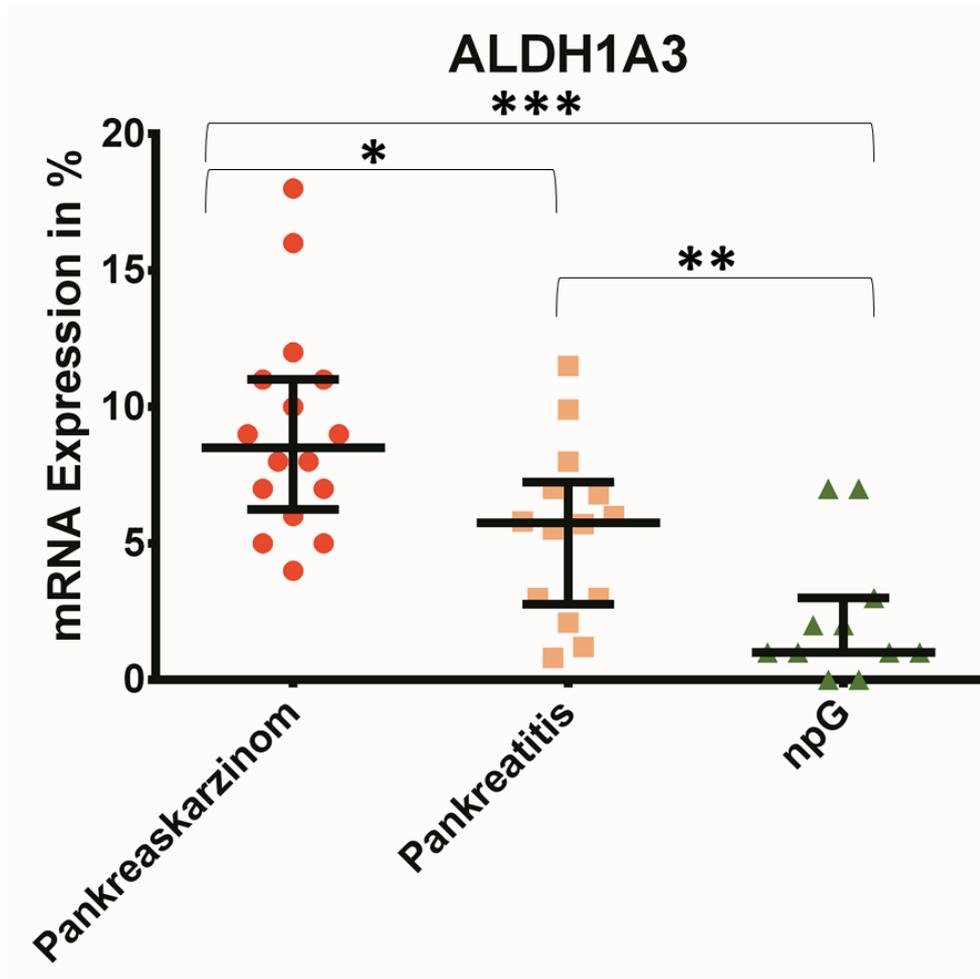


Abbildung 2: Streudiagramm (Mediane + Interquartilsabstand) der ALDH1A3-mRNA-Expression in den verschiedenen Pankreas-Entitäten. *= p-Wert <0,05; **=p-Wert: <0,01, ***=p- Wert<0.001

Als Positivkontrolle diente die pankreatische Karzinomzelllinie AsPC-1, die als 100% angesetzt wurde. Deutlich erkennbar wird die starke Varianz der Pankreaskarzinomproben. So ist in einigen Gewebeproben die ALDH1A3-mRNA-Expression mit bis zu 16% oder 18% recht stark, während sich in anderen nur eine schwache Expression darstellen lässt. Der Medianwert beträgt 8,5% innerhalb eines Bereichs zwischen 4-18%.

Auch bei den Proben der chronischen Pankreatitis zeigt sich eine gewisse Varianz der Ergebnisse, allerdings ist deutlich erkennbar, dass die ALDH1A3-mRNA-Expression in den Proben der Entität chronische Pankreatitis etwas geringer ausfällt als in denen des Pankreaskarzinoms. Der Medianwert beträgt 5,75% innerhalb eines Gesamtbereichs zwischen 0,8-11,5%.

Verdeutlicht wird ebenfalls, dass die ALDH1A3-mRNA-Expression in dem nicht pathologisch veränderten Pankreasgewebe am geringsten ausfällt, so beträgt der höchste Wert lediglich 7%. Insgesamt acht Proben zeigen eine geringere Expression als 3% auf. Der Medianwert liegt bei 1% in einem Bereich von 0-7%.

Anhand des dargestellten Streudiagramms wird deutlich, dass die ALDH1A3-mRNA-Expression im humanen Pankreaskarzinomgewebe einen deutlich höheren Wert aufweist als in den Proben der beiden Entitäten chronischer Pankreatitis und nicht pathologisch verändertes Gewebe. Auch wenn es sich hier um einen geringen Probenumfang handelt, so wird dennoch anhand der Ergebnisse bestätigt, dass die ALDH1A3-mRNA-Expression auch im malignen Gewebe des Pankreas signifikant erhöht ist.

Aufgrund der starken Varianz der ALDH1A3-mRNA-Expressionslevel der Proben, die der Entität des Pankreaskarzinoms zugeordnet wurden, wurden die einzelnen Proben anschließend anhand ihrer TNM-Stadien klassifiziert, um eine mögliche Korrelation zwischen diesen und der Stärke der ALDH1A3-Expression zu untersuchen.

Zunächst werden die Daten anhand ihres T-Stadiums gegliedert dargestellt:

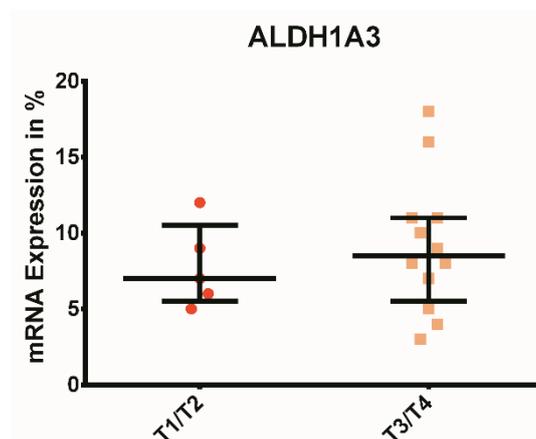


Abbildung 3: Streudiagramm der ALDH1A3-mRNA-Expression in Abhängigkeit zum T-Stadium

Anhand des Streudiagramms wird erkennbar, dass eine erhöhte ALDH1A3-mRNA-Expression mit einer erhöhten Ausdehnung (Größe, Infiltrationstiefe) des Primärtumors korreliert, auch wenn die Differenz insgesamt gering ist, zeigt sich die große Streuung der ALDH1A3-Expressionswerte bei den Proben, die als T3 bzw. T4 klassifiziert wurden.

Anschließend erfolgt die Darstellung der ALDH1A3-mRNA-Expression anhand des N-Stadiums.

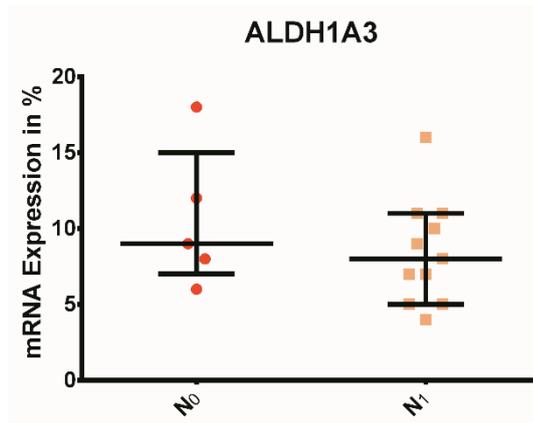


Abbildung 4: Streudiagramm der ALDH1A3-mRNA-Expression in Abhängigkeit zum N-Stadium

Im Gegensatz zum zuvor dargestellten T-Stadium, lässt sich hier keine Korrelation zwischen der ALDH1A3-mRNA-Expressionsstärke und der Ausprägung des Lymphknotenbefalls erkennen, auch wenn die Unterschiede insgesamt nur als gering beschrieben werden können.

Ein anderes Ergebnis ergibt sich jedoch wieder, wenn man die Korrelation zwischen der ALDH1A3-Expression sowie einer stattgehabten Fernmetastasierung untersucht. So zeigt sich im nachfolgend dargestellten Streudiagramm (Abbildung 5) eine erhöhte ALDH1A3-Expression bei den Proben, die einem M1-Stadium zugeordnet wurden.

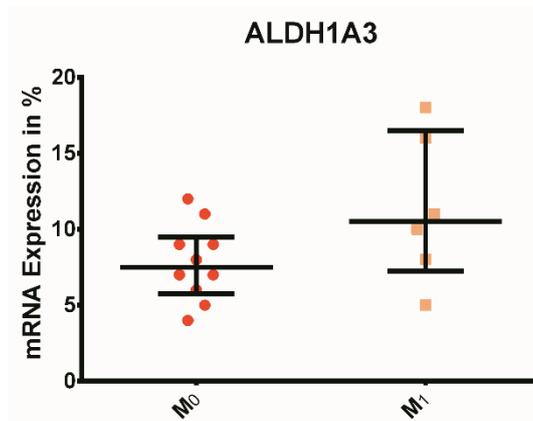


Abbildung 5: Streudiagramm der ALDH1A3-mRNA-Expression in Abhängigkeit zum M-Stadium

Weiterführend wurden alle untersuchten Gewebeproben, unabhängig ihrer Entität, anhand des Alters sowie Geschlechts der Patienten gegliedert.

Zunächst wird das Streudiagramm der ALDH1A3-mRNA-Expression dargestellt, indem die Altersverteilung abgebildet wurde. Als Grenzwert wurde das Alter von 55 Jahren festgelegt.

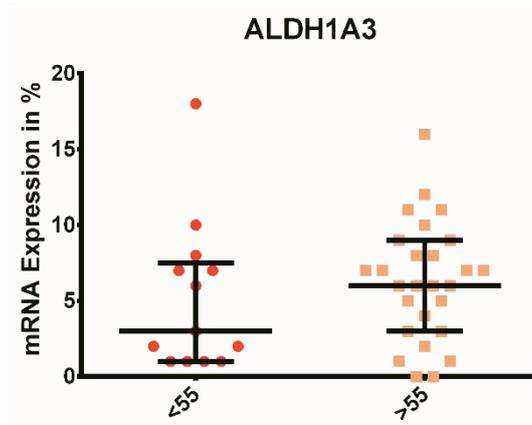


Abbildung 6: Streudiagramm der ALDH1A3-mRNA-Expression in Abhängigkeit des Alters

Erkennbar wird, dass das zunehmende Alter positiv mit der Stärke der ALDH1A3-Expression korreliert. Insgesamt zeigt sich auch, dass die Mehrheit der untersuchten Proben von Patienten stammt, die das 55. Lebensjahr bereits überschritten haben.

Auch bei der Klassifizierung des Geschlechts (Abbildung 7) zeigt sich ein eindeutiges Ergebnis. So zeigt sich einerseits, dass das männliche Geschlecht mit einer erhöhten ALDH1A3-Expression korreliert, auch wenn der Unterschied im Durchschnitt zwischen männlich und weiblich nur gering ausgeprägt ist, andererseits zeigt sich auch, dass die Mehrheit der untersuchten Proben von männlichen Patienten stammt.

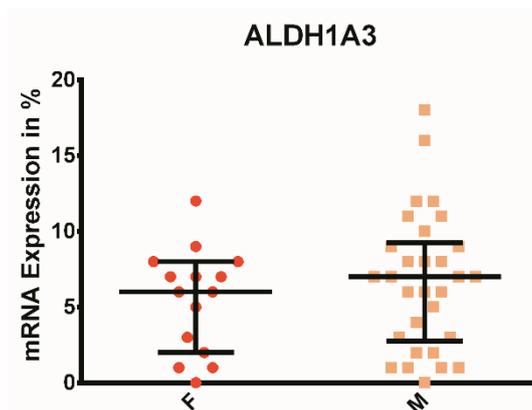


Abbildung 7: Streudiagramm der ALDH1A3-mRNA-Expression in Abhängigkeit des Geschlechts

4.2 Ergebnisse der pankreatischen Karzinomzelllinien

Nachdem die ALDH1A3-mRNA-Expression in den verschiedenen Entitäten des Pankreasgewebes untersucht wurde und gezeigt werden konnte, dass die ALDH1A3-mRNA-Expression im Pankreaskarzinom am stärksten ausgeprägt ist, sollte weiterführend die ALDH1A3-mRNA- und Proteinexpression sowie die Regulation der ALDH1A3 in pankreatischen Karzinomzelllinien untersucht werden.

4.2.1 ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien auf RNA-Ebene

Mittels qPCR wurden zunächst die mRNA-Expressionslevel der nachfolgend genannten sechs Zelllinien untersucht: Capan-1, SU.86.86, BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2 und PANC-1. Die Ergebnisse werden anhand des abgebildeten Diagramms dargestellt.

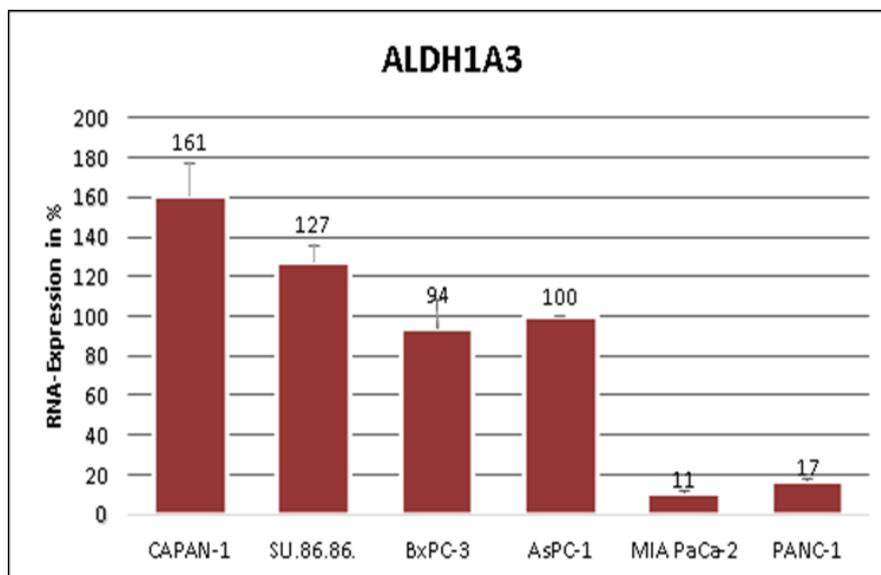


Abbildung 8: ALDH1A3-mRNA-Expression in den sechs Zelllinien

Die ALDH1A3-Expression der Zelllinie AsPC-1 wurde hier ebenfalls als 100% angesetzt und die Expressionslevel der anderen Zelllinien ins Verhältnis gesetzt.

Verdeutlicht werden die Unterschiede der Expressionslevel zwischen den einzelnen Zelllinien. Dabei kann folgendes festgestellt werden: Weisen die Zellen, die aus Primärtumoren des Pankreas stammen, wie MIA PaCa-2 und PANC-1, nur geringe ALDH1A3-mRNA-Expressionslevel auf, so zeigen sich bei Zelllinien, die aus Fernmetastasen etabliert wurden, wie Capan-1, SU.86.86 und AsPC-1, sehr starke ALDH1A3-Expressionswerte.

4.2.2 ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien auf Proteinebene

Nachdem die ALDH1A3-mRNA-Expressionslevel via qPCR in den sechs Zelllinien untersucht wurden, sollten diese auf Proteinebene überprüft werden. Dazu wurden die sechs Zelllinien zusätzlich mittels Western-Blot hinsichtlich ihrer ALDH1A3-Expressionsstärke untersucht.

Hier wird ein exemplarisch angefertigter Western-Blot dargestellt.

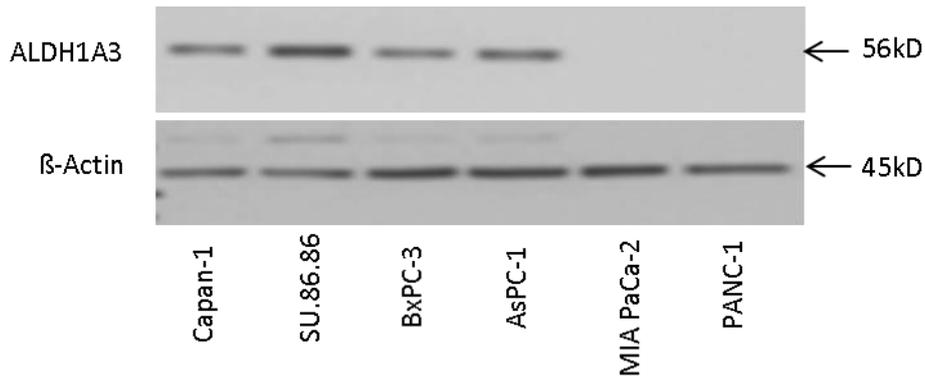


Abbildung 9: oben: Western-Blot ALDH1A3-Proteinexpression, unten: β-Actin-Ladekontrolle.

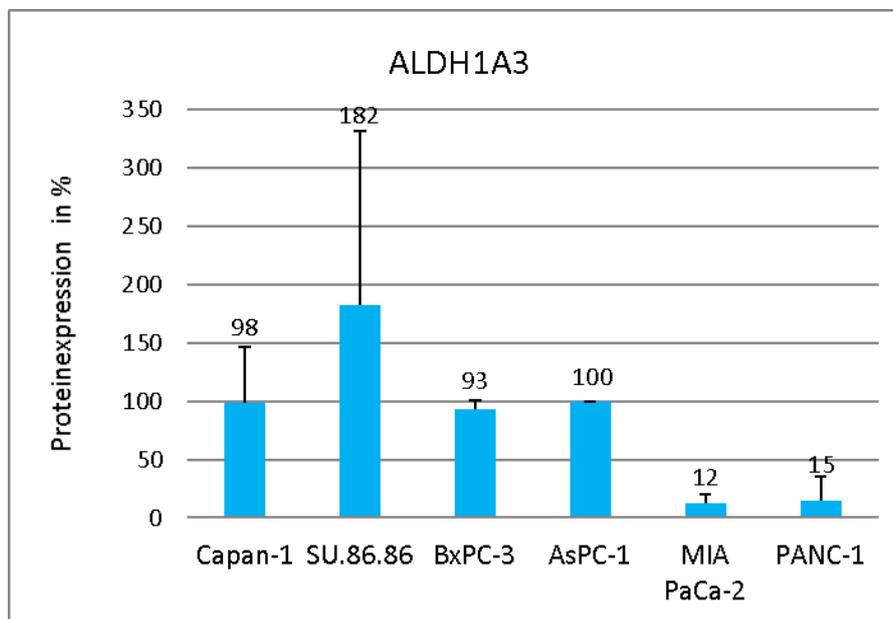


Abbildung 10: ALDH1A3-Proteinexpression in den sechs Zelllinien.

Durch die dargestellten Banden und das abgebildete Diagramm, in dem die Daten verbildlicht wurden, wurden die Unterschiede in der ALDH1A3-Proteinexpression zwischen den sechs Pankreaszelllinien verdeutlicht. Das Expressionslevel der Zelllinie AsPC-1 wurde als 100% angesetzt und die Werte der anderen Zelllinien ins Verhältnis gesetzt.

Die Ergebnisse des Western-Blots bestätigen die der qPCR, da sich insgesamt vergleichbare Expressionswerte zeigen. Auch hier wird deutlich, dass die Zellen, die aus Primärtumoren des Pankreas stammen, wie MIA PaCa-2 und PANC-1, nur geringe ALDH1A3-Proteinexpressionslevel aufweisen im Vergleich zu den Zellen, die aus Fernmetastasen etabliert wurden, wie Capan-1, SU.86.86 und AsPC-1, die starke ALDH1A3-Expressionswerte zeigen. Allerdings zeigt sich bei der Zelllinie Capan-1 ein deutlicher Unterschied zwischen der ALDH1A3-Proteinexpression und der ALDH1A3-mRNA-Expression. War die ALDH1A3-mRNA-Expression von den insgesamt sechs untersuchten Zelllinien bei dieser Zelllinie am stärksten ausgeprägt, so stellt sich auf Proteinebene eine deutlich geringere ALDH1A3-Expression dar.

Somit wurden aufgrund der stärksten Proteinexpressionswerte schließlich die folgenden drei Zelllinien ausgewählt, um Einflüsse auf die Regulation der ALDH1A3-Expression untersuchen zu können: AsPC-1, BxPC-3 und SU.86.86. Nachfolgend wurde untersucht, ob eine erfolgreiche Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression mittels spezifischer siRNA erfolgen kann.

4.3 Regulation der ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien

4.3.1 ALDH1A3-Regulation durch transiente Transfektion auf RNA-Ebene

Nachdem anhand ihrer ALDH1A3-Expressionsstärke drei Zelllinien ausgewählt wurden, sollte im Anschluss der Versuch der siRNA Transfektion erfolgen. Durch diese sollte die Regulation der ALDH1A3-Expression überprüft werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der transienten siRNA Transfektion auf RNA-Ebene dargestellt.

Zunächst werden die Ergebnisse der Zelllinie BxPC-3 dargestellt. Von den insgesamt drei verwendeten Zelllinien zeigt sich bei dieser die stärkste bzw. deutlichste Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression mittels siRNA Transfektion. Nach insgesamt dreimaliger Versuchsdurchführung ergibt sich ein Mittelwert von 38%, allerdings mit vergleichbar hoher Standardabweichung. Es erfolgte also eine erfolgreiche Herunterregulierung um 62% im Vergleich zur siRNA CoA.

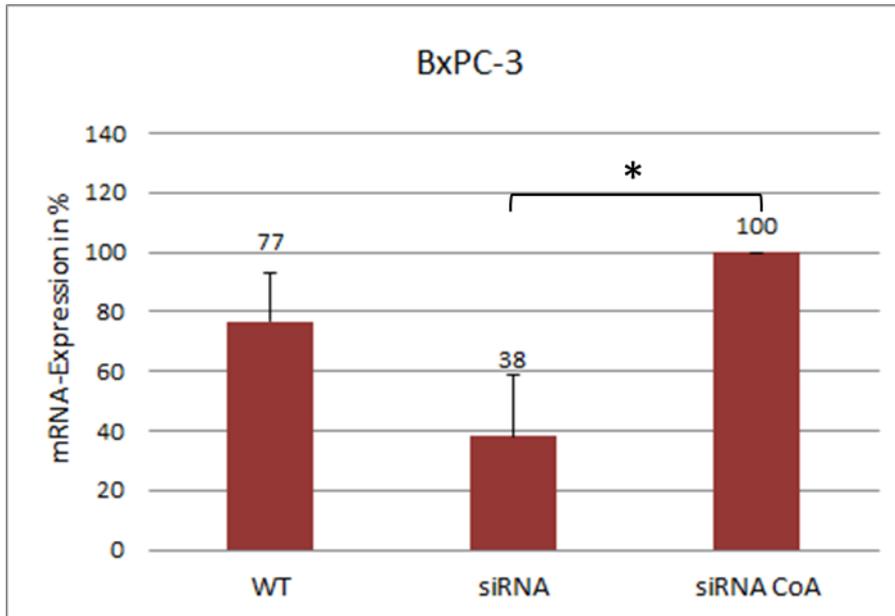


Abbildung 11: ALDH1A3-mRNA-Expression nach siRNA Transfektion. *=p-Wert: <0,05.

Bei der Zelllinie AsPC-1 zeigte sich nach der siRNA Transfektion nach 72h ebenfalls eine erkennbare Herunterregulierung, jedoch wurde die Reduktion der ALDH1A3-Expression nicht so deutlich, wie bei den anderen drei Zelllinien. Mit einer ALDH1A3-Expression von 75% bei niedriger Standardabweichung erkennt man eine erfolgreiche Expressionsminderung um 25% im Vergleich zur siRNA CoA.

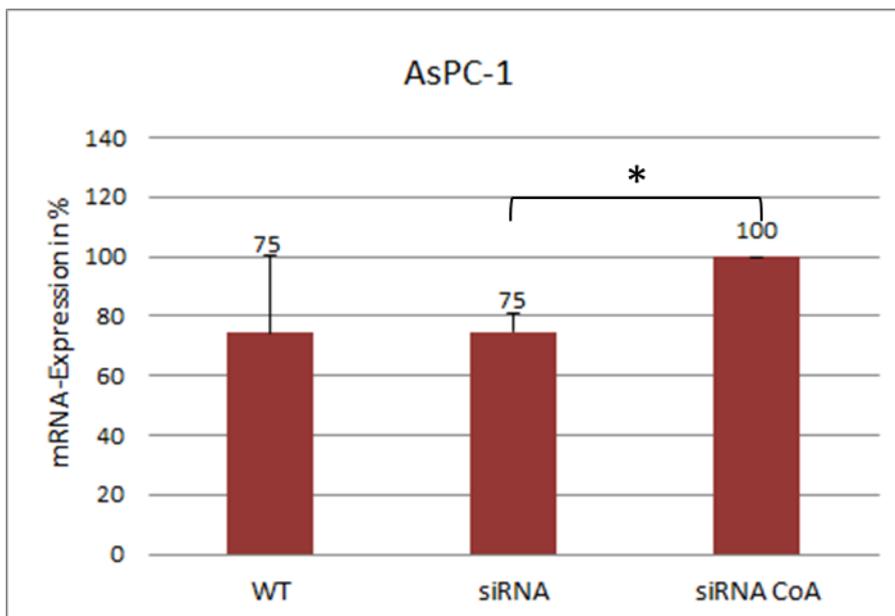


Abbildung 12: ALDH1A3-mRNA-Expression nach siRNA Transfektion. *=p-Wert: <0,05.

Auch bei der Zelllinie SU.86.86 konnte eine erkennbare Herunterregulierung induziert werden, wie im nachfolgenden Diagramm dargestellt.

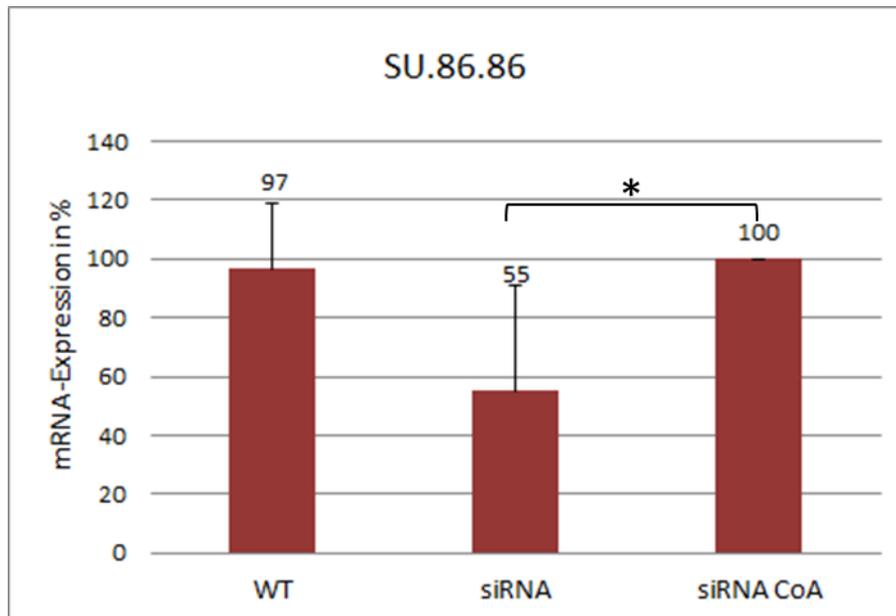


Abbildung 13: ALDH1A3-mRNA-Expression der Zelllinie SU.86.86 nach siRNA Transfektion. *=p- Wert<0,05

Insgesamt zeigt sich nach erfolgter siRNA Transfektion ein Mittelwert der RNA-Expression von 55%, also eine erfolgreiche Herunterregulierung um 45%.

4.3.2 ALDH1A3-Regulation durch transiente siRNA Transfektion auf Proteinebene

Im Anschluss an die erfolgreiche Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression auf RNA-Ebene, wurde ebenfalls der Versuch der siRNA bedingten Regulierung auf Proteinebene unternommen.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der transienten siRNA Transfektion auf Proteinebene in Form von Western-Blots sowie Säulendiagrammen dargestellt. Bei allen Proben wurde jeweils die gleiche Menge an Protein sowie die gleiche Antikörperverdünnung verwendet. Es werden ebenfalls repräsentative Western-Blots dargestellt, zunächst die Daten der Zelllinie BxPC-3.

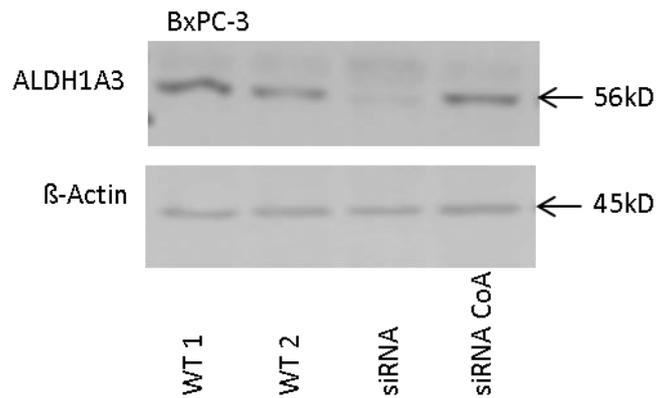


Abbildung 14: Western-Blot, oben: Antikörper ALDH1A3, unten Ladekontrolle β-Actin.

Die ermittelten Werte werden in folgendem Diagramm dargestellt und erörtert.

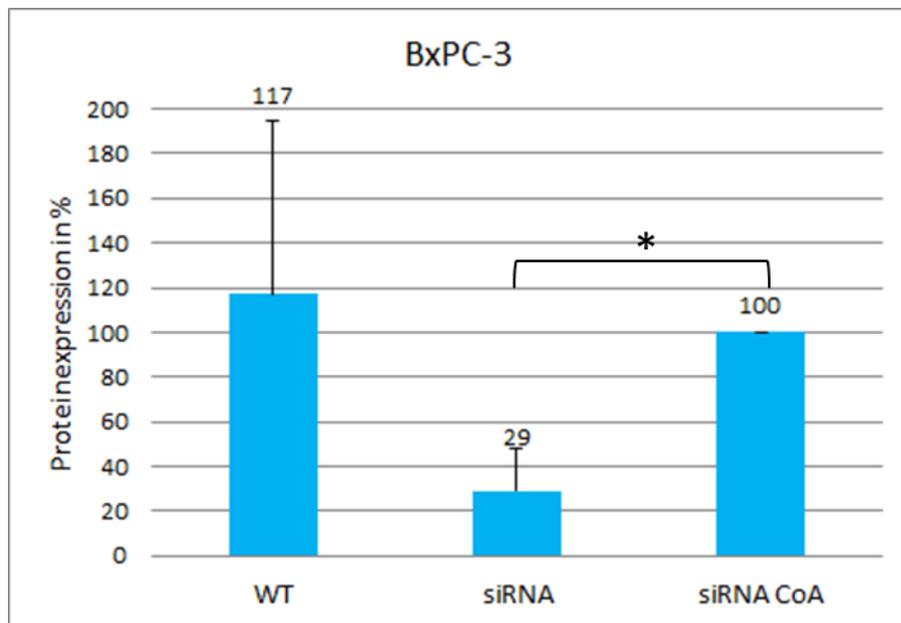


Abbildung 15: ALDH1A3-Proteinexpression nach siRNA Transfektion. *= p-Wert: <0,05.

Im Vergleich zu der spezifischen siRNA-Kontrolle zeigt sich eine deutliche Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression mit Hilfe der siRNA auf etwa 29% bei der Zelllinie BxPC-3. Somit kann eine erfolgreiche Regulation induziert werden. Der Wildtyp zeigt die Zellen, die während des Versuchs nur in reinem Medium inkubiert wurden. Nach insgesamt dreimaliger Durchführung des Versuchs ist zusätzlich die Standardabweichung dargestellt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Zelllinie AsPC-1 hinsichtlich der Wirkungen der siRNA Transfektion auf die ALDH1A3-Proteinexpression dargestellt.

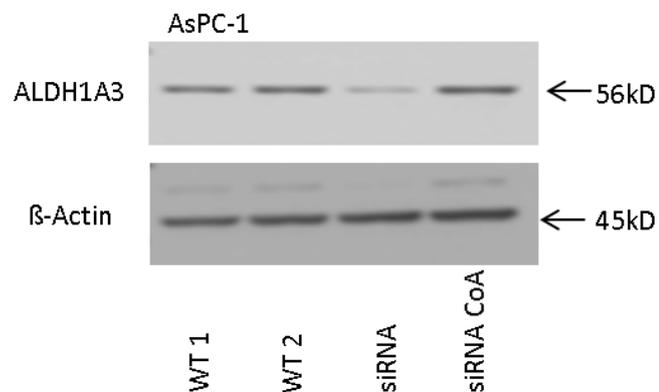


Abbildung 16: Western-Blot, oben: Antikörper ALDH1A3, unten Ladekontrolle β -Actin.

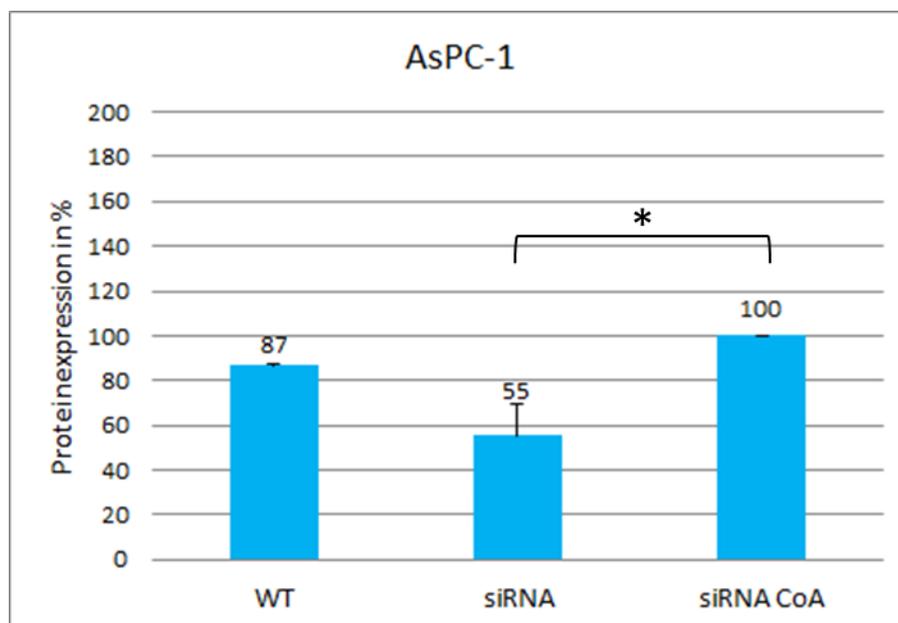


Abbildung 17: ALDH1A3-Proteinexpression der Zelllinie AsPC-1 nach siRNA Transfektion. *= p- Wert: <0,05

Auch hier zeigt sich ein ähnliches Ergebnis. Deutlich erkennbar wird eine Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression mittels siRNA auf 55% im Vergleich zur Kontrolle siRNA CoA, die als 100% angesetzt wurde. Ebenfalls abgebildet ist die Standardabweichung, die sich durch die Mittelwertbildung bei insgesamt drei Versuchsdurchführungen ergibt.

Als dritte und letzte Zelllinie dient SU.86.86, die im unbehandelten Zustand den stärksten Wert der ALDH1A3-Proteinexpression zeigte. Der Einfluss der Transfektion wird in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

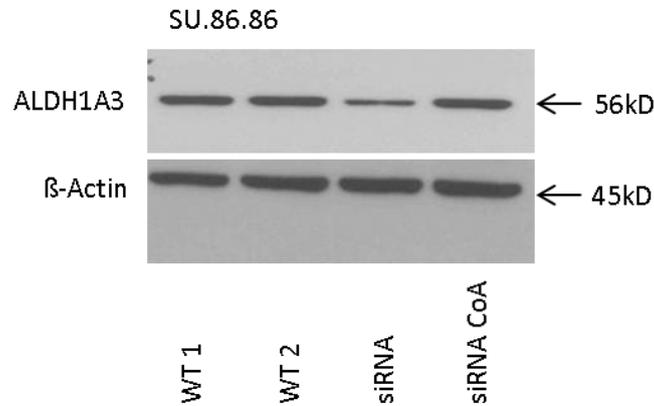


Abbildung 18: Western-Blot, Zelllinie SU86.86, oben: ALDH1A3, unten Ladekontrolle β-Actin.

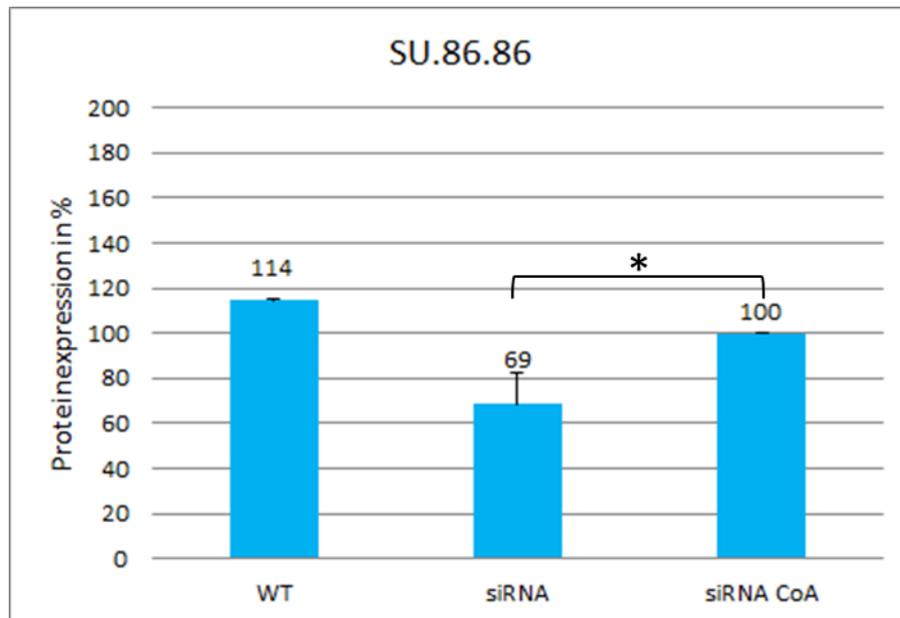


Abbildung 19: ALDH1A3-Proteinexpression in % nach siRNA Transfektion. *= p-Wert <0,05.

Deutlich wird ebenfalls eine erfolgreiche Herunterregulierung der ALDH1A3-Proteinexpression mittels transienter siRNA Transfektion, allerdings zeigt sich im Vergleich der drei Zelllinien die geringste Reduktion der Proteinexpression. Nach dreimaliger Durchführung lässt sich ein Mittelwert von 69% bilden, sodass ebenfalls eine erfolgreiche Herunterregulation um 31% dargestellt werden kann im Vergleich zu der mit 100% angesetzten Kontrolle.

4.3.3 Einfluss der transienten ALDH1A3-Herunterregulierung mittels siRNA auf die Zellproliferation

Der Einfluss der transienten Transfektion mittels siRNA auf die Proliferation und Lebensfähigkeit der drei o.g. Pankreaskarzinomzelllinien wurde mittels eines MTT Assays bestimmt. Dabei konnte innerhalb eines Zeitraums von 72h ein insgesamt proliferationshemmender Effekt der siRNA-vermittelten ALDH1A3-Herunterregulierung auf alle drei Zelllinien, BxPC-3, AsPC-1 und SU.86.86, festgestellt werden, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung. Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse der jeweiligen Zelllinie grafisch mittels Säulendiagramm dargestellt, um die Unterschiede zwischen siRNA Transfektanten und spezifischer Kontrolle zu verdeutlichen.

Bei der Zelllinie BxPC-3 zeigt sich zwar ein Unterschied und damit eine geringere Proliferation nach siRNA Transfektion, allerdings ist dieser im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Zelllinien am geringsten. Bei insgesamt drei Versuchsdurchführungen ergab sich ein OD- Mittelwert von 1,019 (88% bezogen auf die spezifische Kontrolle) an proliferierenden Zellen nach transienter siRNA Transfektion und von 1,163 (als 100% angesetzt) bei der spezifischen Kontrolle. Damit konnte eine messbar geringere Proliferation um etwa 12% nach siRNA Transfektion verdeutlicht werden.

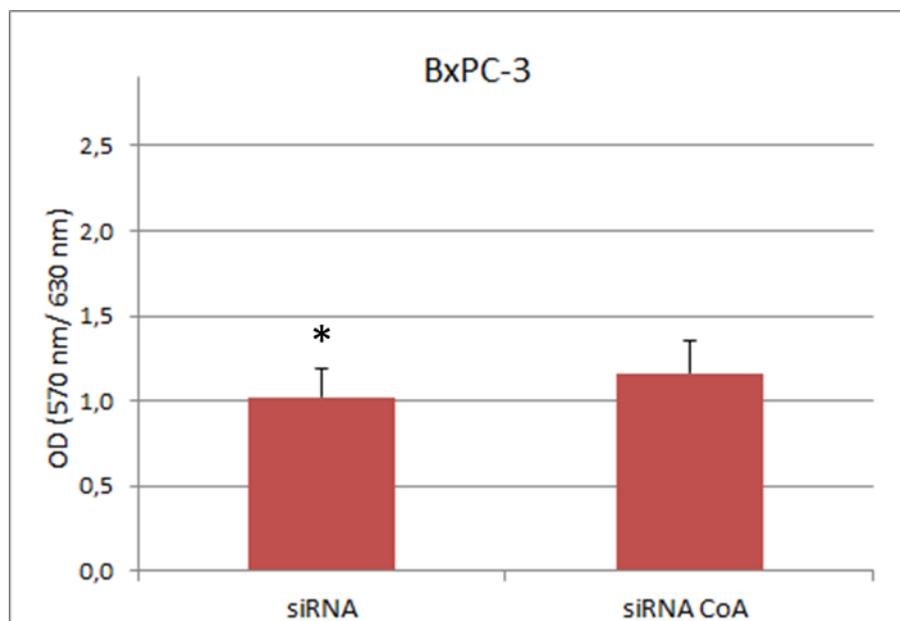


Abbildung 20: MTT Assay: Proliferation der Zelllinie BxPC-3 nach siRNA-induzierter Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression. *= p-Wert <0,05.

Ein deutlicheres Ergebnis wird bei der Zelllinie AsPC-1 erkennbar. Hier lässt sich nach transienter Transfektion ein OD-Wert von 0,404 an proliferierenden Zellen messen, bei der spezifischen Kontrolle zeigt sich ein OD-Wert von 0,808 und damit eine um 50% höhere Proliferation als bei den siRNA Transfektanten.

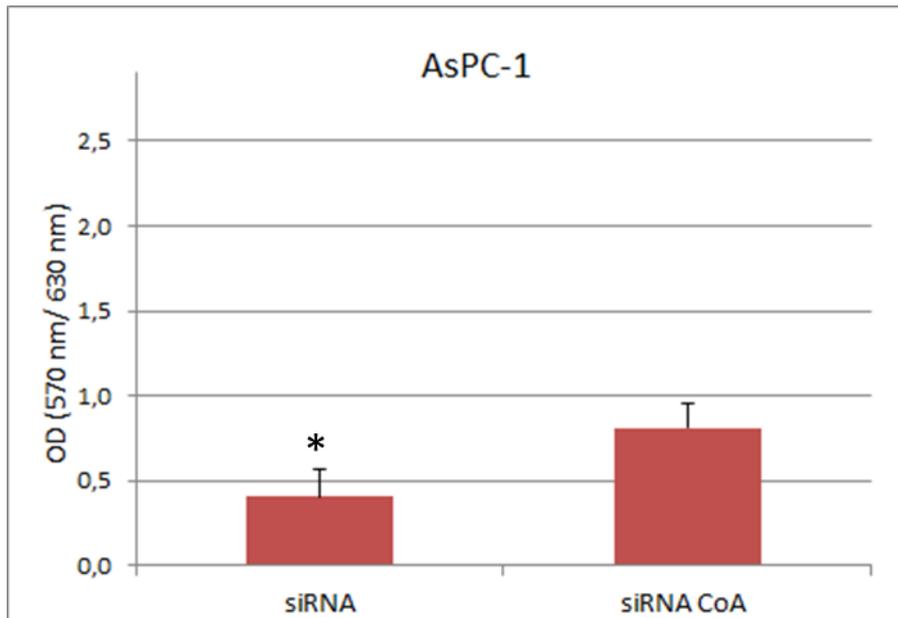


Abbildung 21: MTT Assay: Proliferation der Zelllinie AsPC-1 nach siRNA-induzierter Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression. *= p-Wert <0,05.

Bei der dritten und letzten Zelllinie SU.86.86 zeigt sich ebenfalls ein proliferationshemmender Effekt des ALDH1A3 Knock Downs. So ergab die Behandlung der Zellen mit der spezifischen siRNA einen OD-Wert von 0,5622 (58% bezogen auf die spezifische Kontrolle) an proliferierenden Zellen, während der OD-Wert der spezifischen Kontrolle bei etwa 0,9669 (als 100% angesetzt) lag und damit eine um 42% höhere Proliferation anzeigt.

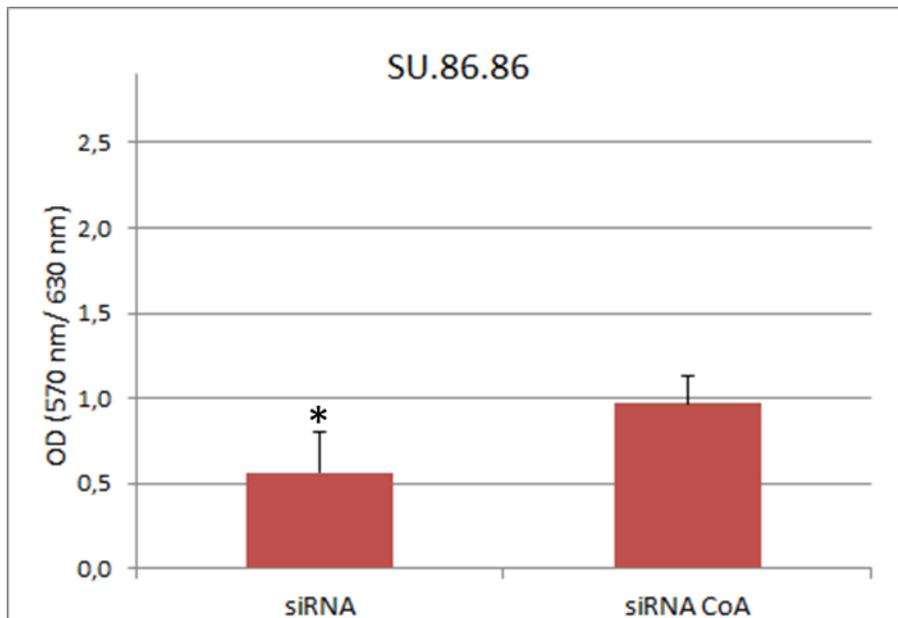


Abbildung 22: MTT Assay: Proliferation der Zelllinie SU.86.86 nach siRNA-induzierter Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression. *= p-Wert <0,05.

4.3.4 ALDH1A3-Regulation durch Behandlung mittels Chemotherapie auf RNA-Ebene

Nach der erfolgreichen Herunterregulierung der ALDH1A3-mRNA-Expression mittels siRNA Transfektion wurde nachfolgend ermittelt, inwiefern sich die Behandlung mit leitliniengerechter Chemotherapie auf die Expression auswirkt. Auch hier wurden die drei o.g. Zelllinien untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Zelllinien, abgebildet werden jeweils die Mittelwerte nach dreimaliger Durchführung sowie die jeweilige Standardabweichung, in grafischer Form dargestellt. Die RNA wurde jeweils nach 24h isoliert und nach entsprechender Vermessung und cDNA-Synthese wurde die Auswirkung der Chemotherapie auf die ALDH1A3-Expression mittels Real-Time-PCR überprüft.

Bei der Zelllinie BxPC-3 zeigt sich nach 24 Stunden eine signifikant erniedrigte ALDH1A3- Expression bei den mit Chemotherapie behandelten Zellen. Im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrolle, also Zellen, die mit reinem Leermedium behandelt wurden und als 100% angerechnet wurden, zeigt sich eine Expression von 69%, eine um etwa 31% geringere Expression.

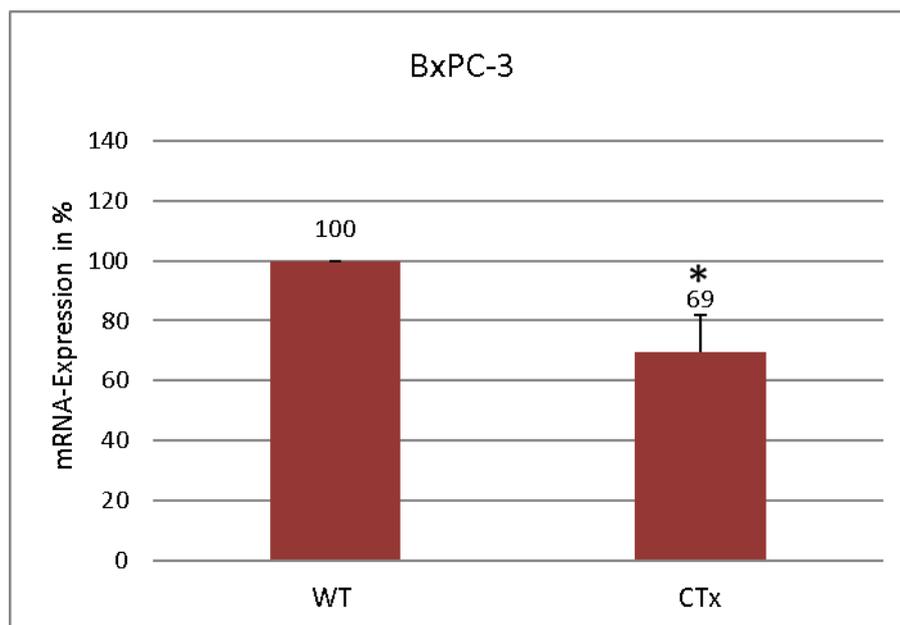


Abbildung 23: ALDH1A3-mRNA-Expression der Zelllinie BxPC-3 nach Applikation der Chemotherapie. *= p- Wert <0,05.

Auch bei der zweiten Zelllinie, AsPC-1, zeigt sich eine Herunterregulierung durch die Behandlung mit der Chemotherapie, diese fällt aber im Vergleich zu den zwei anderen Zelllinien, deutlich geringer aus. So liegt die ALDH1A3-Expression nach Chemotherapie-Behandlung bei etwa 82%.

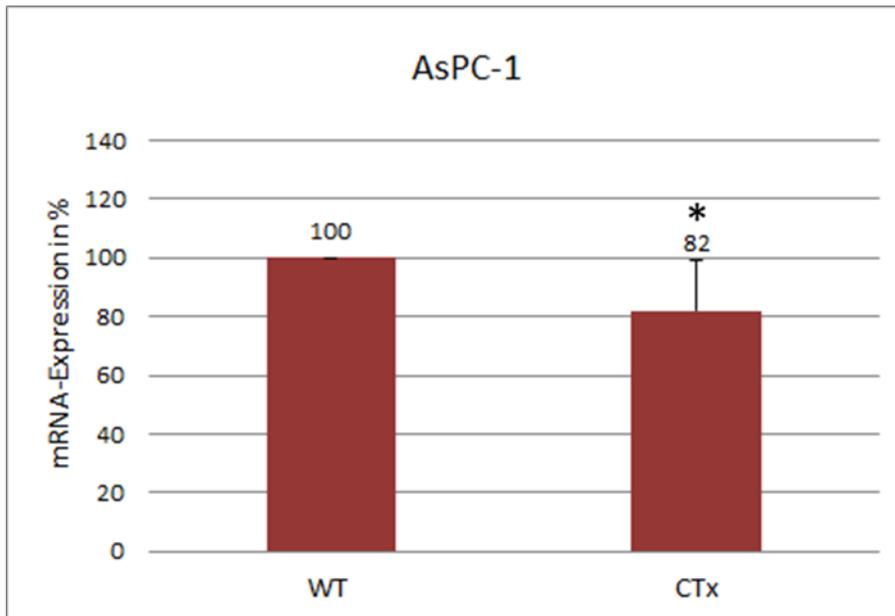


Abbildung 24: ALDH1A3-mRNA-Expression der Zelllinie AsPC-1 nach Applikation der Chemotherapie. *= p- Wert <0,05.

Ein ähnliches Ergebnis wie das bei den BxPC-3-Zellen, konnte mit der Zelllinie SU.86.86 erzeugt werden. Hier zeigt sich eine Expressionsminderung um 37% im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle, also ein Wert von 63%, die Wildtyp-Kontrolle wurde ebenfalls auf 100% gesetzt.

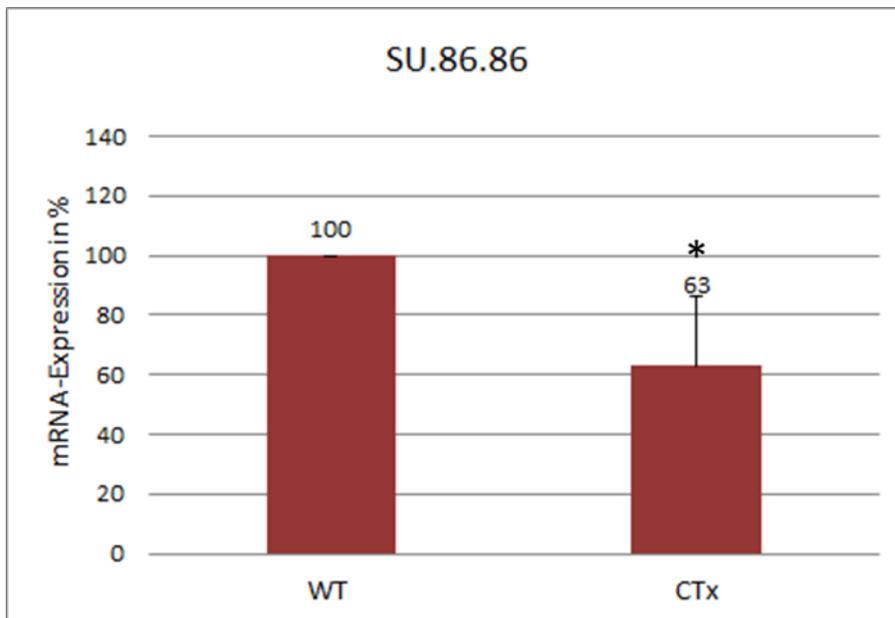


Abbildung 25: ALDH1A3-mRNA-Expression der Zelllinie SU.86.86 nach Applikation der Chemotherapie. *= p- Wert <0,05.

4.3.5 Einfluss der Chemotherapie auf die Zellproliferation

Im Anschluss an die Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression durch die Behandlung mit leitliniengerechter Chemotherapie (in den folgenden Dosierungen: Abraxane 125 mg/ 10.000 cm²; Gemcitabin 1000 mg/ 10.000 cm²) wurde ebenfalls noch der Einfluss dieser Medikamente auf die Zellproliferation untersucht. Gemessen wurde erneut nach 24h, entsprechend des Versuchs der Auswirkungen auf die ALDH1A3-Expression. Untersucht wurde, ob eine Chemotherapie induzierte ALDH1A3-Herunterregulierung mit erniedrigten Proliferationsraten der drei untersuchten Zelllinien korreliert. Im Folgenden werden die jeweiligen grafischen Darstellungen der Mittelwerte (Behandlung sowie Positivkontrolle) nach insgesamt dreimaliger Versuchsdurchführung gezeigt.

Bei der Zelllinie BxPC-3 zeigt sich ein eindeutiges Ergebnis, welches den Erwartungen entspricht und eine deutlich geringere Proliferation nach einer Behandlung mit der Chemotherapie nachweist. So liegt der OD-Wert der Kontrolle bei 2,026 (als 100% angesetzt), der der behandelten Probe nur bei 1,515 (75% bezogen auf die spezifische Kontrolle) und damit entspricht dies etwa einer 25% geringeren Proliferation.

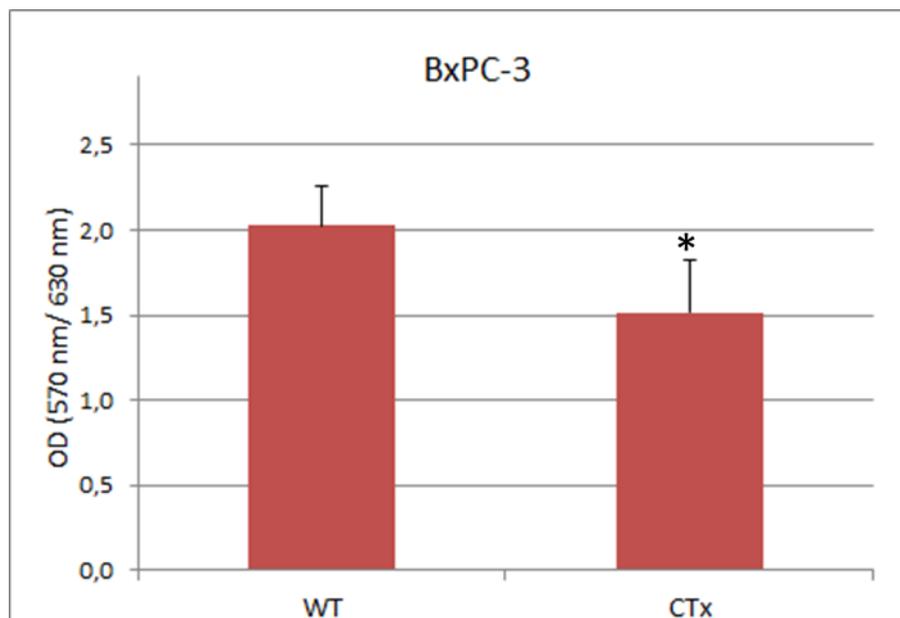


Abbildung 26: MTT Assay: Proliferation der Zelllinie BxPC-3 nach Applikation der Chemotherapie. *= p-Wert <0,05.

Auch bei der Zelllinie AsPC-1 zeigt sich ein ähnliches Bild mit nahezu gleichen Zahlenwerten. So ergibt sich erneut ein hemmender Effekt auf die Zellproliferation bei einem OD-Wert von 1,524, während die unbehandelten Zellen einen OD-Wert von 2,039 aufweisen.

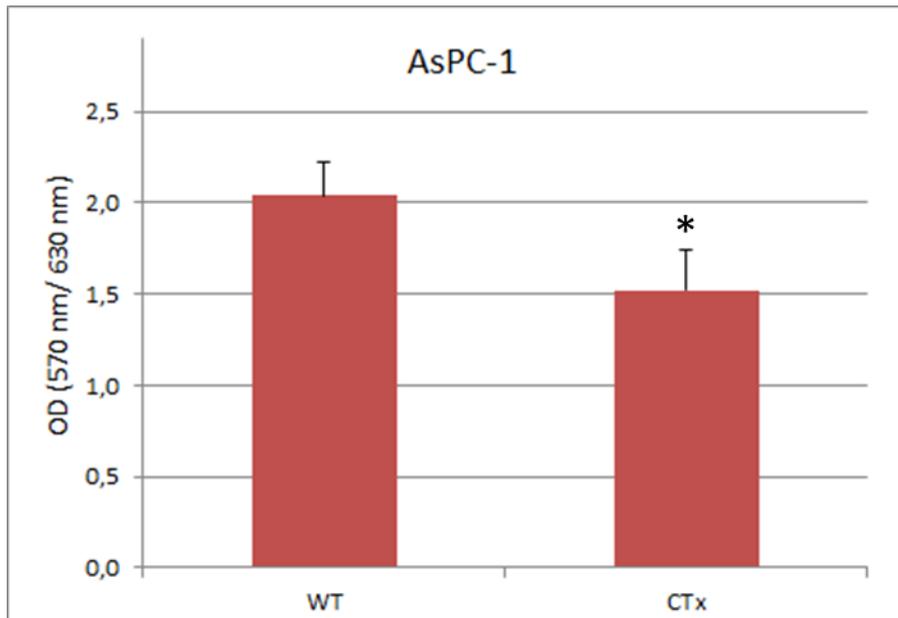


Abbildung 27: MTT Assay: Proliferation der Zelllinie AsPC-1 nach Applikation der Chemotherapie. *= p- Wert < 0,05.

Ein anderes Ergebnis liegt nach dreimaliger Versuchsdurchführung bei der Zelllinie SU.86.86 vor. Hier zeigt sich nach einer Zeit von 24h eine höhere Proliferation nach Behandlung mit der Chemotherapie im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. So liegt der OD-Wert der behandelten Zellen bei 1,304 und damit um fast 20% höher als der OD-Wert der unbehandelten Zellen, der bei 1,091 liegt. Interessant wäre hier zu prüfen, wie sich die Werte zu einem späteren Zeitpunkt entwickeln.

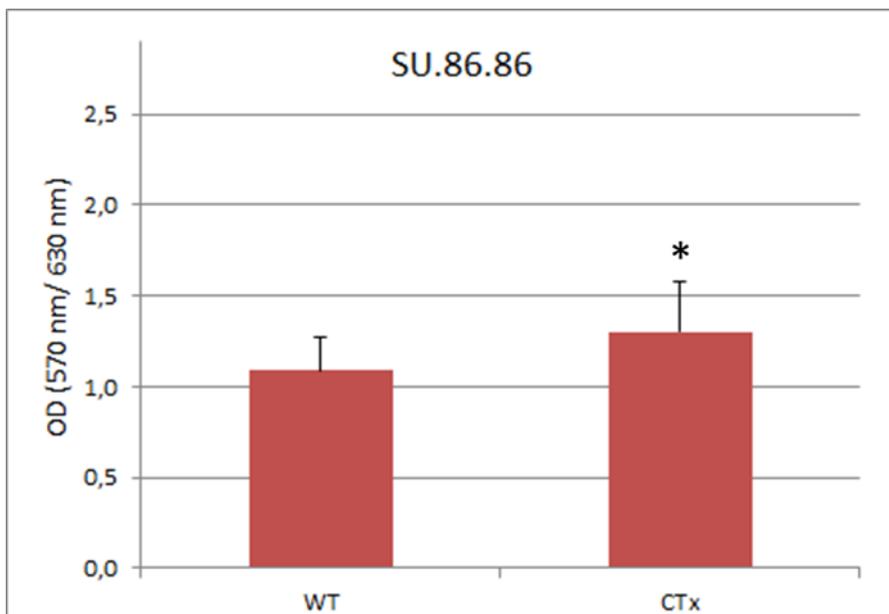


Abbildung 28: MTT Assay: Proliferation der Zelllinie SU.86.86 nach Applikation der Chemotherapie. *= p-Wert < 0,05.

5. Diskussion

5.1 ALDH1A3-Expression in humanem Pankreasgewebe

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die ALDH1A3-Expression in malignen Pankreasgewebeproben im Vergleich zu chronischer Pankreatitis sowie dem nicht pathologisch veränderten Gewebe signifikant erhöht ist (Abbildung 2). Unsere Ergebnisse bestätigen die Daten, die Jia et al. (2013) generiert haben. Dabei wurden die ALDH1A3- Expressionslevel von insgesamt 20 Gewebeproben via RT-qPCR untersucht, wovon 10 Proben aus Normalgewebe und 10 Proben aus Tumorgewebe etabliert wurden. Auch da zeigte sich, dass die ALDH1A3-mRNA-Expression durchschnittlich 1,9-fach höher war in dem vom Pankreaskarzinom abgeleiteten Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Drei der insgesamt 10 untersuchten Tumorgewebeproben hatten sogar 3-fach erhöhte Expressionslevel im Vergleich zu dem Durchschnittswert der ALDH1A3-mRNA-Expression in dem von ihnen untersuchten Normalgewebe (Jia et al. 2013).

Auch bei Karzinomen anderer Organe fielen bereits erhöhte ALDH1A3-Expressionen auf. So konnten u.a. bei Gewebeproben des Mammakarzinoms (Ali et al. 2011; Marcato et al. 2011b) erhöhte ALDH1A3-Expressionslevel gemessen werden wie auch bei Proben des Ovarialkarzinoms, während das entsprechende Normal- bzw. nicht pathologisch veränderte Gewebe eine geringere Ausprägung der Expression vermuten ließ (Saw et al. 2012). Andererseits zeigten sich jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse, da u.a. bei Untersuchungen an nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinomgewebe das im Vergleich mit untersuchte Normalgewebe hohe ALDH1A3-Expressionslevel aufwies, während im Karzinomgewebe ALDH1A3 nur gering exprimiert war (Kim et al. 2013).

Aufgrund der Aufteilung der einzelnen Pankreaskarzinom-Gewebeproben in die entsprechenden TNM-Stadien, lassen sich anhand unserer Daten Aussagen bezüglich der Korrelation zwischen der Stärke der ALDH1A3-Expression sowie der Ausprägung des TNM- Stadiums treffen. Wie in Abb. 3 dargestellt, konnten erhöhte ALDH1A3-Expressionswerte bei Pankreaskarzinom-Proben, die einem T3/T4-Stadium zugeordnet wurden, gemessen werden im Vergleich zu Proben, die einem T1/T2-Stadium entsprechen, auch wenn der Unterschied gering ist. Während sich diese Aussage nicht auf das N-Stadium übertragen lässt, da die ALDH1A3-Expression durchschnittlich etwas stärker ausgeprägt war, bei Proben, die einem N0- Stadium entsprechen als bei Proben, die einem N1-Stadium zugeordnet wurden (Abb. 4), so lässt sich wiederum ein interessantes Ergebnis hinsichtlich der Korrelation zwischen dem M1- Stadium sowie der ALDH1A3-Expression erkennen (Abbildung 5). Zeigten die Proben, die

einem M0-Stadium entsprechen eine durchschnittliche ALDH1A3-Expression von 7,8%, so ergab sich bei den Proben, die einem M1-Stadium zugeordnet wurden, eine durchschnittliche ALDH1A3-Expression von 11,3%. Somit lässt sich anhand dieser Ergebnisse vermuten, dass die Höhe der ALDH1A3-Expression positiv mit einem höheren M-Stadium assoziiert ist.

Unsere Ergebnisse decken sich mit Daten, die Rasheed et al. (2010) generierten, die u.a. die ALDH-Expressionen in Adenokarzinomen des Pankreas mittels Immunhistochemie in operativ entfernten Primärtumoren von insgesamt 269 Patienten untersuchten, um Unterschiede zwischen ALDH-positiven und ALDH-negativen Proben zu untersuchen. Insgesamt konnte anhand einer Kaplan-Meier-Analyse dargestellt werden, dass die Patienten, die einen ALDH-positiven Pankreastumor hatten, lediglich ein mittleres Überleben von 14 Monaten erreichten, im Vergleich zu 18 Monaten bei Patienten, deren Primärtumor ALDH-negativ war. Weiterführend überprüft wurden daraufhin mögliche Assoziationen zwischen ALDH-positiven Tumoren sowie Prädiktoren einer schlechten Prognose von Pankreaskarzinomen bzgl. des Gesamtüberlebens. Dabei wurde entdeckt, dass die Tumoren, die eine positive ALDH-Expression aufwiesen, statistisch signifikant mit einer Tumorgroße von >3 cm korrelieren, ähnlich unserem Ergebnis, der Korrelation einer erhöhten ALDH1A3-Expression mit einem erhöhten T-Stadium (Abbildung 3).

Da Rasheed et al. (2010) davon ausgingen, dass u.a. die Entwicklung von Fernmetastasen eine Ursache einer schlechteren Prognose darstellt und daher den möglichen Einfluss der ALDH-Expression darauf überprüfen wollten, analysierten sie weiterführend die Expressionslevel mittels Immunhistochemie in Primärtumoren des Pankreas von insgesamt acht Patienten sowie in den von diesen abgeleiteten Fernmetastasen. Dabei stellte sich heraus, dass in den Primärtumoren von sechs dieser insgesamt acht Patienten keine ALDH-Expression gemessen werden konnte, jedoch bei vier dieser sechs Primärtumoren in den zugehörigen Fernmetastasen, die in Lunge und Leber lokalisiert waren, ALDH-positive Zellen vorhanden waren. Bei den zwei Primärtumoren, die ALDH-positiv waren, waren alle davon abgeleiteten Metastasen ALDH-positiv (lokalisiert in periaortalen Lymphknoten, Leber, Niere) (Rasheed et al. 2010). Diese Arbeit bestätigt die Ergebnisse, da auch in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der ALDH1A3-Expressionsstärke und einem M1-Stadium festgestellt werden konnte (Abb. 5), wodurch vermutet werden kann, dass die ALDH1A3 an der Entwicklung von Fernmetastasen beteiligt sein kann.

Insgesamt werden diese Vermutungen durch weitere Ergebnisse von Untersuchungen, bei denen die ALDH1A3-Expression ebenfalls in Bezug auf die Prognose einer Krebserkrankung

überprüft wurde, bestärkt. Kong et al. (2016) zeigten, dass das mittlere Überleben von Patienten mit einem Pankreaskarzinom, welches eine hohe ALDH1A3-Expression aufwies, nur 14,0 Monate betrug, während das von jenen Patienten mit einem Karzinom mit einer geringgradigen oder gar keiner ALDH1A3-Expression bei 22,8 Monaten lag. Auch sei die Inzidenz der Lymphknoten-Metastasen in der Gruppe mit starken ALDH1A3-Expressionslevel deutlich erhöht im Vergleich zu der geringgradig exprimierten ALDH1A3-Gruppe (Kong et al. 2016). Letzteres konnte anhand unserer Untersuchungen nicht bestätigt werden, da unsere Ergebnisse keine positive Korrelation zwischen der Stärke der ALDH1A3-mRNA-Expression und dem Ausmaß einer Lymphknotenmetastasierung (s. Abbildung 4) zeigen, jedoch wurde wie oben bereits beschrieben, durch unsere Untersuchungen bestätigt, dass möglicherweise eine Fernmetastasierung (Abbildung 5) mit der Ausprägung der ALDH1A3-Expression assoziiert ist.

Ähnliches ließ sich auch bei Untersuchungen an Mammakarzinomen erkennen. Marcato et al. (2011b) untersuchten mittels Immunhistochemie die Expression mehrerer ALDH-Isoformen, darunter ebenfalls ALDH1A3. Dabei zeigte sich, dass die ALDH1A3-Expression im Mammakarzinom der beste Prädiktor einer aggressiveren Erkrankung war, da die Höhe der Expression positiv mit dem Tumorgrad, der Fernmetastasierung sowie einem fortgeschrittenen Stadium korreliert (Marcato et al. 2015). Es gibt jedoch auch Untersuchungen bzw. Ergebnisse, die diesen Aussagen nicht entsprechen und sogar das Gegenteil ergaben. So wurde anhand von Untersuchungen an NSCLC-Gewebe herausgefunden, dass eine hohe ALDH1A3-Expression zwar mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert ist, allerdings nicht mit rezidivfreiem Überleben (Shao et al. 2014). Somit könnten hier organspezifische Unterschiede ursächlich sein, dennoch scheint mehrheitlich, eine erhöhte ALDH1A3-Expression bei malignen Entitäten vorzuliegen bzw. mit einer schlechteren Prognose zu korrelieren, welches somit auf einen möglichen direkten Zusammenhang zwischen der Stärke der ALDH1A3-Expression und des Malignitätsgrades hinweisen könnte.

Das Streudiagramm, das unsere Ergebnisse der ALDH1A3-mRNA-Expressionslevel aller drei Entitäten darstellt, zeigt eindeutig, dass die ALDH1A3-Expression am stärksten in den Pankreaskarzinomproben ausgeprägt ist. Trotz des eher geringen Probenumfangs von insgesamt 40 untersuchten Gewebeproben, lässt sich dennoch dieses klare Ergebnis erkennen. Es bestätigt einerseits bisherige Untersuchungen am Pankreaskarzinom bzw. an Karzinomen anderen Organursprungs und zeigt andererseits auf, wie bedeutend es sein kann, in weiteren zukünftigen Studien detaillierte Untersuchungen bezüglich der Funktion und Bedeutung der ALDH1A3 vorzunehmen.

5.2 ALDH1A3-Expression in pankreatischen Karzinomzelllinien

Von den insgesamt sechs untersuchten pankreatischen Karzinomzelllinien, zeigten vier Zelllinien, AsPC-1, BxPC-3, Capan-1 und SU.86.86, eine starke ALDH1A3-Expression, während die anderen beiden, MIA-PaCa-2 sowie PANC-1, nur geringe Expressionslevel aufwiesen. Drei der vier Zelllinien, bei denen eine starke ALDH1A3-Expression nachgewiesen wurde, wurden aus Metastasen eines Pankreaskarzinoms etabliert, während die Zellen, die nur geringe Expressionen aufzeigten, aus Primärtumoren etabliert wurden. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass Zellen mit einem hohen metastasierenden Potential, stärkere ALDH1A3-Expressionswerte aufweisen im Vergleich zu Zellen, die aus Primärtumoren des Pankreas entstammen. Obwohl bei der Zelllinie BxPC-3 starke ALDH1A3-Expressionswerte nachgewiesen werden konnten, entstammt diese keiner Metastase, sondern einem Primärtumor. Möglicherweise deutet dieses daraufhin, dass auch diese Zellen trotz des Ursprungs aus einem duktalem Adenokarzinom ein starkes metastasierendes Potential aufweisen.

Unsere Ergebnisse sind mit Daten vereinbar, die Jia et al. (2013) veröffentlichten, die insgesamt 13 Zelllinien hinsichtlich ihrer ALDH1A3-mRNA-Expression untersuchten, wobei 12 von ihnen pankreatische Karzinomzelllinien darstellten und eine Zelllinie aus nicht pathologisch verändertem Pankreasgewebe abgeleitet wurde. Auch da zeigten sich starke ALDH1A3-Expressionswerte bei den vier oben genannten Zelllinien, während die MIA-PaCa-2- und PANC-1-Zellen nur geringere Expressionslevel aufwiesen. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die ALDH1A3-Expression durchschnittlich 1,3fach höher ist bei den pankreatischen Karzinomzelllinien im Vergleich zu der aus normalem Pankreasgewebe etablierten Zelllinie (Jia et al. 2013).

Allerdings gibt es auch widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der ALDH1A3-Expression. Konnte im Rahmen dieser Arbeit eine starke ALDH1A3-Expression der Zelllinie Capan-1 nachgewiesen werden (s. Abbildungen 8 und 10), so ergaben andere Untersuchungen an dieser Zelllinie geringe ALDH1A3-Expressionslevel (Kong et al. 2016). U.a. könnte dieses auf untersucherabhängige Einflussfaktoren hindeuten, bzw. auf möglicherweise herstellerabhängige Unterschiede der benutzten Materialien und Antikörpern zurückzuführen sein.

Dass auch in Karzinomzelllinien anderer Organe erhöhte ALDH1A3-Expressionslevel auffallen, zeigen bisherige Ergebnisse. So wurde in früheren Untersuchungen entdeckt, dass Unterschiede zwischen einigen Zelllinien, u.a. von Kolon- (Golubovskaya et al. 2015; Vasiliou et al. 2004), Mamma- (Marcato et al. 2011b) und Schilddrüsenkarzinomen (Golubovskaya et al. 2015)

hinsichtlich ihrer ALDH1A3-Expressionstärke existieren. Golubovskaya et al. (2015) zeigten, dass in der Kolonkarzinomzelllinie LoVo-1 eine Hochregulierung der ALDH1A3-mRNA-Expression nachgewiesen wurde, im Vergleich zur der Zelllinie SW620, die ebenfalls aus einem Kolonkarzinom etabliert wurde. Auch bei Schilddrüsenkarzinomzellen konnten Unterschiede festgestellt werden. So ließ sich bei der Zelllinie K1 eine erhöhte ALDH1A3-Expression, sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene darstellen, im Gegensatz zu den Zelllinien BCPAP und TPC1, die deutlich geringere Expressionslevel aufweisen (Golubovskaya et al. 2015). Vermutet man hier zunächst ebenfalls Zusammenhänge der Expressionsstärke und dem Ursprung der Zellen, Primärtumor oder Metastase, wie bei unseren Ergebnissen an pankreatischen Karzinomzelllinien, so zeigen sich keine eindeutigen Hinweise darauf. So wurden die LoVo-Zellen aus dem Gewebe einer Tumormetastase in der linken supraklavikulären Region eines Adenokarzinom des Kolons abgeleitet (lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-229.aspx?geo_country=de), während die SW620-Zellen aus einer Lymphknotenmetastase eines kolorektalen Adenokarzinoms etabliert wurden (lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=de). Beide Zelllinien weisen demnach ein hohes metastasierendes Potential auf, trotz der deutlichen Unterschiede hinsichtlich ihrer ALDH1A3-Expressionsstärke.

Betrachtet man die Schilddrüsenzellen, so ergeben sich nochmals unterschiedliche Aspekte. Denn sowohl die Zelllinie K1 wurde aus einem primären papillären Schilddrüsenkarzinom (sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_92030501?lang=de®ion=DE) etabliert, wie auch die TPC-1-Zellen (sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scc147?lang=de®ion=DE).

Auch bei Mammakarzinomzellen zeigen sich keine eindeutigen Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Stärke der ALDH1A3-mRNA-Expression und dem Ursprung der Zellen. Marcato et al. (2011b) untersuchten u.a. die ALDH1A3-mRNA-Expression in sieben unterschiedlichen Mammakarzinom-Zelllinien, wobei v.a. die Zelllinie MDA-MB-468 eine besonders starke ALDH1A3-Expression zeigte, während z.B. die Zelllinien MCF7 sowie MDA-MB-231 nur geringe Expressionslevel aufwiesen. Dabei wurden alle drei Zelllinien aus dem malignen Pleuraerguss eines Adenokarzinoms der Mamma etabliert (lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-132.aspx?geo_country=de; lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=de; lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=de).

Möglicherweise gilt die Korrelation zwischen hoher ALDH1A3-Expression und erhöhtem metastasierenden Potential nur für pankreatische Karzinomzelllinien, auch wenn der Umfang der überprüften Karzinomzellen zu gering ist, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

Die Erkenntnis, dass die Aldehyd-Dehydrogenasen einen bedeutenden Stellenwert in sämtlichen metabolischen Vorgängen einnehmen und bei vielen Differenzierungsschritten mitwirken (Duan et al. 2016) sowie der Nachweis der erhöhten Expression sowohl im Pankreaskarzinomgewebe wie auch in einigen pankreatischen Karzinomzelllinien, kann jedenfalls die Bedeutsamkeit dieser Enzymgruppe bei malignen Prozessen vermuten lassen.

5.3 Auswirkung der Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression auf die Zellproliferation

Wie beschrieben, sind bereits mehrere Mechanismen bekannt, die auf die Regulation der ALDH1A3-Expression Einfluss nehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Versuch der Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression mittels spezifischer siRNA unternommen. Im Anschluss wurde untersucht, ob die erfolgreiche Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression Auswirkungen auf die Proliferation der untersuchten Zellen hat. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expressionsminderung in allen drei Zelllinien einen signifikant proliferationshemmenden Effekt zeigte. Somit lassen unsere Untersuchungen vermuten, dass die ALDH1A3 Einfluss auf den Zellzyklus sowie Zellmetabolismus bzw. das Wachstum nimmt, welches vereinbar ist mit bisherigen Daten, die ebenfalls darüber berichteten, dass die ALDH1A3 möglicherweise sowohl mit Apoptose sowie Zellzyklus assoziiert ist (Duan et al. 2016; Vassalli 2019).

Unsere Ergebnisse decken sich mit den Daten, die Mao et al. (2013) generierten, die insgesamt 40 operativ entnommene Proben hochgradiger Gliome von Patienten sammelten und daraufhin 19 Tumorkulturen etablierten, die von hochgradigen Gliomen abgeleitet wurden. Identifiziert und charakterisiert wurden dabei zwei unterschiedliche Subtypen neuronaler Stammzellen: proneuronale (PN) und mesenchymale (Mes) Glioma Stem Cells (GSCs). Unter anderem wurden die ALDH-mRNA-Expressionslevel mittels qRT-PCR in PN GSCs sowie Mes GSCs untersucht, wobei herausgefunden wurde, dass die ALDH1A3-Expression in Mes GSCs etwa 150-fach erhöht ist im Vergleich zu den PN GSCs. Interessanterweise konnte in einer nachfolgenden Analyse, in der alle 19 Subtypen der ALDH-Familie bzgl. ihrer Expressionswerte in PN GSCs sowie Mes GSCs untersucht wurden, festgestellt werden, dass die ALDH1A3 als einziger Subtyp der ALDH-Familie in Mes GSCs überexprimiert war im Vergleich zu PN GSCs, was die besondere Stellung der ALDH1A3 hervorhebt. Weiterführend wurde u.a. zusätzlich untersucht, inwiefern sich ein ALDH1A3 Knockdown auf die in-vitro Proliferation von drei PN GSCs sowie drei Mes GSCs auswirkte. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum der Mes GSCs durch shRNA vermittelten ALDH1A3 Knockdown signifikant reduziert werden konnte im Vergleich zu dem der PN GSCs,

wodurch die Vermutung generiert wurde, dass die ALDH1A3 für das Wachstum der Mes GSCs erforderlich ist, allerdings nicht für das Wachstum der PN GSCs (Mao et al. 2013).

Dieses Ergebnis, das reduzierte Wachstum der Mes GSCs nach einem ALDH1A3 Knockdown, zeigt demnach deutliche Parallelen zu unseren Ergebnissen auf, die ebenfalls einen signifikant proliferationshemmenden Effekt der siRNA vermittelten ALDH1A3-Herunterregulierung auf die pankreatischen Karzinomzelllinien AsPC-1, BxPC-3 und SU.86.86 zeigten und bekräftigt die besondere Stellung der ALDH1A3 bezüglich ihrer essenziellen Funktion in Zellzyklus und Metabolismus der Zellen. Interessant wäre, in weiteren Untersuchungen näher zu prüfen, wodurch die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen bedingt sind, wie bspw. das reduzierte Wachstum nach ALDH1A3 Knockdown bei Mes GSCs, jedoch nicht bei PN GSCs

Ergänzend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls Ähnlichkeiten mit anderen Untersuchungen auf, die an Kolonkarzinomzellen durchgeführt wurden. Kozovska et al. (2018) untersuchten zunächst in mehreren Zelllinien die Expression verschiedener ALDH-Isoformen mittels Western-Blot sowie qPCR, wobei eine hohe ALDH1A3-Expression in der Zelllinie HCT-116 festgestellt wurde. Im Anschluss wurde mittels siRNA der Versuch der ALDH1A3-Herunterregulierung unternommen und anschließend der Effekt dieser auf eine mögliche Änderung der Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Chemotherapie getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine ALDH1A3-Herunterregulierung der Zelllinie HCT-116 zu einer erhöhten Sensitivität (1,3fach höher) der Zellen gegenüber einer Therapie mit 5-FU führte. Zudem zeigte sich nach Herunterregulierung der ALDH1A3 mittels spezifischer siRNA anhand eines Apoptose-Nachweises via Annexin V, eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen bei der Behandlung mit 5-FU (Kozovska et al. 2018). Diese Daten sind demnach unseren Ergebnissen bzgl. pankreatischer Karzinomzellen ähnlich, da sich auch bei unseren Zellen nach der Herunterregulierung der ALDH1A3-Expression ein proliferationshemmender Effekt via MTT Assay nachweisen ließ. Weitere Untersuchungen an pankreatischen Karzinomzellen bzgl. der Fragestellung, ob auch dort eine ALDH1A3-Expressionsminderung zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie führe bzw. sich die Anzahl der Apoptosen erhöht, könnten Bestandteil zukünftiger Forschung sein und interessante Aspekte liefern.

Auch die Behandlung der Zellen mit leitliniengerechter Chemotherapie zeigte Auswirkungen auf die ALDH1A3-Expression und führte zu einer Verminderung der Expression (Abb.23-25). Dieses könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, dass die Chemotherapie Einfluss auf sämtliche zelluläre physiologische Prozesse wie Zellproliferation (Abb.26/27) und Apoptose nimmt und daher indirekt Auswirkungen auf die ALDH1A3-Expressionslevel hat.

Wie bereits beschrieben, zeigten sich Unterschiede bei den Ergebnissen der MTT Assays zwischen der Behandlung der Zellen mit leitliniengerechter Chemo sowie der Transfektion mittels spezifischer siRNA. So zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Auswirkungen beider auf die Proliferation (s. S. 48, 52). Unter anderem könnten zunächst die unterschiedlichen Inkubationszeiten ursächlich sein. So wurde der MTT Assay nach der siRNA Transfektion nach einem Zeitraum von 72h angefertigt, während der nach der Behandlung mit Chemotherapie nach nur 24h erfolgte.

Zudem könnten ebenfalls die unterschiedlichen Ursprünge der Zelllinien, Primärtumor oder Metastase, die Ursache darstellen.

5.4 ALDH1A3-Stellenwert als möglicher Tumormarker

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die ALDH1A3 im Pankreaskarzinom überexprimiert ist und sind daher vereinbar mit bisherigen Untersuchungsergebnissen, die ebenfalls eine ALDH1A3-Überexpression in Karzinomen zeigten (Marcato et al. 2011b; Jia et al. 2013; Saw et al. 2012). Diese Überexpression sowie die Tatsache, dass die ALDH1A3 wesentliche Funktionen in Zellzyklus sowie Zellregulierung von sowohl normalen wie auch Krebsstammzellen einnimmt, könnten auf die Bedeutsamkeit dieses Enzyms in malignen Prozessen hinweisen (Marcato et al. 2011a; Vassalli 2019). Auch die erfolgreiche ALDH1A3-Herunterregulierung und den daraus entstehenden proliferationshemmenden Effekt auf pankreatische Karzinomzelllinien, wie es in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bekräftigen diese Vermutung.

Um die Frage zu klären, ob die ALDH1A3 aufgrund dieser Eigenschaften auch als möglicher Tumormarker des Pankreaskarzinoms in Frage kommt, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Zum einen müsste zunächst überprüft werden, ob der Nachweis des Enzyms neben dem im Gewebe ebenfalls im Blut erfolgreich wäre. Weiterhin müsste geprüft werden, ob der Wert im Blut bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom erhöht ist im Vergleich zum gesunden Patienten. Um als möglicher Tumormarker zu bestehen, sollte ebenfalls getestet werden, inwiefern sich die ALDH1A3-Werte vor und nach einer Operation entwickeln. Interessant wäre es auch, eine mögliche Korrelation zwischen der ALDH1A3-Expression sowie der Ausprägung der Werte von CA 19-9 zu untersuchen, der bisher als der spezifischste Tumormarker des Pankreaskarzinoms gilt.

Die Tatsache, dass die Aldehyd-Dehydrogenase 1A3 nicht nur im Pankreaskarzinom überexprimiert ist, sondern auch in weiteren Malignomen, zeigt auf, dass sie nicht spezifisch für das Pankreaskarzinom ist, wodurch die Bedeutung als Tumormarker für eben jenes deutlich abnehmen könnte. Zusätzlich hätte die Hemmung dieses Enzyms auch Auswirkungen auf eben

jene anderen Organe, die dieses Enzym stark exprimieren, wodurch eine selektive und pankreasspezifische Krebstherapie möglicherweise begrenzt wird. Ebenso zeigt sich auch in manchen der untersuchten Pankreatitis-Gewebeproben eine starke Expression, wodurch sich vermuten lässt, dass möglicherweise nicht immer eine klare Abgrenzung zwischen maligner und benigner Entität erfolgen kann.

6. Zusammenfassung

ALDH1A3 ist eine Unterform aus der Familie der ALDH, die in einigen Stoffwechselfvorgängen relevante Funktionen einnimmt. Es hat sich gezeigt, dass die ALDH1A3-Expression sowohl in humanem Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zu chronischer Pankreatitis- sowie nicht pathologisch verändertem Gewebe erhöht ist als auch in drei spezifischen pankreatischen Karzinomzelllinien, die ein hohes metastasierendes Potential aufweisen.

Mittels spezifischer siRNA sowie leitliniengerechter Chemotherapie ließ sich bei den drei untersuchten pankreatischen Karzinomzelllinien die ALDH1A3-Expression herunterregulieren. Zudem konnte anhand eines Proliferations-Assays (MTT) eine Korrelation zwischen siRNA bzw. Chemotherapie induzierter ALDH1A3-Herunterregulierung und erniedrigten Proliferationsraten der pankreatischen Karzinomzellen festgestellt werden, wodurch die Vermutung bestärkt wird, dass die ALDH1A3-Expression eine essentielle Rolle für Metabolismus, Zellzyklus und das Überleben einer Zelle spielt.

Literaturverzeichnis

- Alexandre, Martine; Pandol, Stephen J.; Gorelick, Fred S.; Thrower, Edwin C. (2011): The emerging role of smoking in the development of pancreatitis. In: *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 11 (5), S. 469–474. DOI: 10.1159/000332196.
- Ali, H. Raza; Dawson, Sarah-Jane; Blows, Fiona M.; Provenzano, Elena; Pharoah, Paul D.; Caldas, Carlos (2011): Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. In: *Breast cancer research : BCR* 13 (6), R118. DOI: 10.1186/bcr3061.
- Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Bracci, P. M.; Negri, E.; Neale, R. E.; Risch, H. A. et al. (2013): Ulcer, gastric surgery and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (11), S. 2903–2910. DOI: 10.1093/annonc/mdt336.
- Bosetti, C.; Lucenteforte, E.; Silverman, D. T.; Petersen, G.; Bracci, P. M.; Ji, B. T. et al. (2012): Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (7), S. 1880–1888. DOI: 10.1093/annonc/mdr541.
- Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.
- Brugge William R.; Lauwers Gregory Y.; Sahani Dushyant; Fernandez-del Castillo Carlos; Warshaw Andrew L. (2004): Cystic Neoplasms of the Pancreas.
- Coté, Gregory A.; Yadav, Dhiraj; Slivka, Adam; Hawes, Robert H.; Anderson, Michelle A.; Burton, Frank R. et al. (2011): Alcohol and smoking as risk factors in an epidemiology study of patients with chronic pancreatitis. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 9 (3), 266–73; quiz e27. DOI: 10.1016/j.cgh.2010.10.015.
- Diener, Markus K.; Fitzmaurice, Christina; Schwarzer, Guido; Seiler, Christoph M.; Hüttner, Felix J.; Antes, Gerd et al. (2014): Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (11), CD006053. DOI: 10.1002/14651858.CD006053.pub5.
- Duan, Jiang-Jie; Cai, Jiao; Guo, Yu-Feng; Bian, Xiu-Wu; Yu, Shi-Cang (2016): ALDH1A3, a metabolic target for cancer diagnosis and therapy. In: *International journal of cancer* 139 (5), S. 965–975. DOI: 10.1002/ijc.30091.
- Dunne, Richard F.; Hezel, Aram F. (2015): Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 29 (4), S. 595–608. DOI: 10.1016/j.hoc.2015.04.003.
- Dupe´, Vale´rie; Matt, Nicolas; Garnier, Jean-Marie; Chambon, Pierre; Mark, Manuel; Ghyselinck, Norbert B. (2003): A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment.
- Elbashir, Sayda M.; Lendeckel, Winfried; Tuschl, Thomas (2000): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *GENES & DEVELOPMENT* 15, S. 188–200.
- Erkan, Mert; Reiser-Erkan, Carolin; Michalski, Christoph W.; Deucker, Stefanie; Sauliunaite, Danguole; Streit, Sylvia et al. (2009): Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 11 (5), S. 497–508. DOI: 10.1593/neo.81618.

- Everts, Helen B.; Sundberg, John P.; Ong, David E. (2005): Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat. In: *Experimental cell research* 308 (2), S. 309–319. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.04.026.
- Fares-Taie, Lucas; Gerber, Sylvie; Chassaing, Nicolas; Clayton-Smith, Jill; Hanein, Sylvain; Silva, Eduardo et al. (2013): ALDH1A3 mutations cause recessive anophthalmia and microphthalmia. In: *American journal of human genetics* 92 (2), S. 265–270. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.12.003.
- Frulloni, L.; Gabbrielli, A.; Pezzilli, R.; Zerbi, A.; Cavestro, G. M.; Marotta, F. et al. (2009): Chronic pancreatitis: report from a multicenter Italian survey (PanCroInfAISP) on 893 patients. In: *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 41 (4), S. 311–317. DOI: 10.1016/j.dld.2008.07.316.
- Ginestier, Christophe; Hur, Min Hee; Charafe-Jauffret, Emmanuelle; Monville, Florence; Dutcher, Julie; Brown, Marty et al. (2007): ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.
- Girman, C. J.; Kou, T. D.; Cai, B.; Alexander, C. M.; O'Neill, E. A.; Williams-Herman, D. E.; Katz, L. (2010): Patients with type 2 diabetes mellitus have higher risk for acute pancreatitis compared with those without diabetes. In: *Diabetes, obesity & metabolism* 12 (9), S. 766–771. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2010.01231.x.
- Goldstein Alisa M.; Fraser Mary C.; Struewing Jeffery P.; Hussussian Christopher J.; Ranade Koustubh; Zametkin Deborah P. et al. (1995): Increased Risk of Pancreatic Cancer in Melanoma-Prone Kindreds with p16 INK4 Mutations.
- Golubovskaya, Vita; O'Brien, Shalana; Ho, Baotran; Heffler, Melissa; Conroy, Jeffrey; Hu, Quang et al. (2015): Down-regulation of ALDH1A3, CD44 or MDR1 sensitizes resistant cancer cells to FAK autophosphorylation inhibitor Y15. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 141 (9), S. 1613–1631. DOI: 10.1007/s00432-015-1924-3.
- Grün, F.; Hirose, Y.; Kawachi, S.; Ogura, T.; Umesono, K. (2000): Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (52), S. 41210–41218. DOI: 10.1074/jbc.M007376200.
- Hall, Claire; Clarke, Louise; Pal, Atanu; Buchwald, Pamela; Eglinton, Tim; Wakeman, Chris; Frizelle, Frank (2019): A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice. In: *Annals of coloproctology* 35 (6), S. 294–305. DOI: 10.3393/ac.2019.11.13.
- Halm, U.; Schumann, T.; Schiefke, I.; Witzigmann, H.; Mössner, J.; Keim, V. (2000): Decrease of CA 19-9 during chemotherapy with gemcitabine predicts survival time in patients with advanced pancreatic cancer.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- He, Jin; Ahuja, Nita; Makary, Martin A.; Cameron, John L.; Eckhauser, Frederic E.; Choti, Michael A. et al. (2014): 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 16 (1), S. 83–90. DOI: 10.1111/hpb.12078.
- Herman, Joseph M.; Swartz, Michael J.; Hsu, Charles C.; Winter, Jordan; Pawlik, Timothy M.; Sugar, Elizabeth et al. (2008): Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (21), S. 3503–3510. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.8469.
- Herold, Gerd (2020): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2020 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, S.506-512.

- Hezel, Aram F.; Kimmelman, Alec C.; Stanger, Ben Z.; Bardeesy, Nabeel; DePinho, Ronald A. (2006): Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.
- Hong, Shen; Qiwen, Ben; Ying, Jiang; Wei, An; Chaoyang, Tong (2011): Body mass index and the risk and prognosis of acute pancreatitis: a meta-analysis. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 23 (12), S. 1136–1143. DOI: 10.1097/MEG.0b013e32834b0e0e.
- Iqbal, J.; Ragone, A.; Lubinski, J.; Lynch, H. T.; Moller, P.; Ghadirian, P. et al. (2012): The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. In: *British journal of cancer* 107 (12), S. 2005–2009. DOI: 10.1038/bjc.2012.483.
- Jacobs, Eric J.; Newton, Christina C.; Gapstur, Susan M.; Thun, Michael J. (2012): Daily aspirin use and cancer mortality in a large US cohort. In: *Journal of the National Cancer Institute* 104 (16), S. 1208–1217. DOI: 10.1093/jnci/djs318.
- Jia, Jinping; Parikh, Hemang; Xiao, Wenming; Hoskins, Jason W.; Pflücke, Holger; Liu, Xuelu et al. (2013): An integrated transcriptome and epigenome analysis identifies a novel candidate gene for pancreatic cancer. In: *BMC medical genomics* 6, S. 33. DOI: 10.1186/1755-8794-6-33.
- Jones, Siân; Zhang, Xiaosong; Parsons, D. Williams; Lin, Jimmy Cheng-Ho; Leary, Rebecca J.; Angenendt, Philipp et al. (2008): Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. In: *Science (New York, N.Y.)* 321 (5897), S. 1801–1806. DOI: 10.1126/science.1164368.
- Kastrinos, Fay; Mukherjee, Bhramar; Tayob, Nabihah; Wang, Fei; Sparr, Jennifer; Raymond, Victoria M. et al. (2009): Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. In: *JAMA* 302 (16), S. 1790–1795. DOI: 10.1001/jama.2009.1529.
- Khatua, Biswajit; El-Kurdi, Bara; Singh, Vijay P. (2017): Obesity and pancreatitis. In: *Current opinion in gastroenterology* 33 (5), S. 374–382. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000386.
- Kim, Yong-June; Yoon, Hyung-Yoon; Kim, Ji Sang; Kang, Ho Won; Min, Byung-Dal; Kim, Seon-Kyu et al. (2013): HOXA9, ISL1 and ALDH1A3 methylation patterns as prognostic markers for nonmuscle invasive bladder cancer: array-based DNA methylation and expression profiling. In: *International journal of cancer* 133 (5), S. 1135–1142. DOI: 10.1002/ijc.28121.
- Klaiber, Ulla; Hackert, Thilo; Neoptolemos, John P. (2019): Adjuvant treatment for pancreatic cancer. In: *Translational gastroenterology and hepatology* 4, S. 27. DOI: 10.21037/tgh.2019.04.04.
- Kleeff, Jorg; Korc, Murray; Apte, Minoti; La Vecchia, Carlo; Johnson, Colin D.; Biankin, Andrew V. et al. (2016): Pancreatic cancer. In: *Nature reviews. Disease primers* 2, S. 16022. DOI: 10.1038/nrdp.2016.22.
- Koch, Joanna G.; Gu, Xiangjun; Han, Younghun; El-Naggar, Adel K.; Olson, Melissa V.; Medina, Daniel et al. (2007): Mammary tumor modifiers in BALB/cJ mice heterozygous for p53. In: *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 18 (5), S. 300–309. DOI: 10.1007/s00335-007-9028-2.
- Kondo, Naru; Murakami, Yoshiaki; Uemura, Kenichiro; Hayashidani, Yasuo; Sudo, Takeshi; Hashimoto, Yasushi et al. (2010): Prognostic impact of perioperative serum CA 19-9 levels in patients with resectable pancreatic cancer. In: *Annals of surgical oncology* 17 (9), S. 2321–2329. DOI: 10.1245/s10434-010-1033-0.
- Kong, Bo; Cheng, Tao; Wu, Weiwei; Regel, Ivonne; Rauflefs, Susanne; Friess, Helmut et al. (2015): Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer.
- Kong, Bo; Wu, Weiwei; Cheng, Tao; Schlitter, Anna Melissa; Qian, Chengjia; Bruns, Philipp et al. (2016): A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling. In: *Gut* 65 (4), S. 647–657. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-307616.

- Koprowski, H.; Herlyn, M.; Steplewski, Z.; Sears, H. F. (1981): Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 212 (4490), S. 53–55. DOI: 10.1126/science.6163212.
- Kozovska, Z.; Patsalias, A.; Bajzik, V.; Durinikova, E.; Demkova, L.; Jargasova, S. et al. (2018): ALDH1A inhibition sensitizes colon cancer cells to chemotherapy. In: *BMC cancer* 18 (1), S. 656. DOI: 10.1186/s12885-018-4572-6.
- Lennon, Anne Marie; Wolfgang, Christopher L.; Canto, Marcia Irene; Klein, Alison P.; Herman, Joseph M.; Goggins, Michael et al. (2014): The early detection of pancreatic cancer: what will it take to diagnose and treat curable pancreatic neoplasia? In: *Cancer research* 74 (13), S. 3381–3389. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0734.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=de. Datum: 05.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-229.aspx?geo_country=de. Datum: 05.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1420.aspx?geo_country=de#generalinformation. Datum: 03.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1469.aspx?geo_country=de#generalinformation. Datum: 03.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx?&p=1&rel=generalinformation. Datum: 06.11.2019.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1682.aspx?geo_country=de#characteristics. Datum: 29.01.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1687.aspx?&p=1&rel=generalinformation. Datum: 06.11.2019.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1687.aspx?geo_country=de#characteristics. Datum: 29.01.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1837.aspx?geo_country=de#characteristics. Datum: 29.01.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-132.aspx?geo_country=de. Datum: 11.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-22.aspx?geo_country=de. Datum: 11.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=de. Datum: 11.03.2021.
- lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-79.aspx?geo_country=de#generalinformation. Datum 03.03.2021.
- Li, Donghui; Yeung, Sai-Ching J.; Hassan, Manal M.; Konopleva, Marina; Abbruzzese, James L. (2009): Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. In: *Gastroenterology* 137 (2), S. 482–488. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.04.013.
- Lochan, R.; Daly, A. K.; Reeves, H. L.; Charnley, R. M. (2008): Genetic susceptibility in pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *The British journal of surgery* 95 (1), S. 22–32. DOI: 10.1002/bjs.6049.
- Locker, Gershon Y.; Hamilton, Stanley; Harris, Jules; Jessup, John M.; Kemeny, Nancy; Macdonald, John S. et al. (2006): ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (33), S. 5313–5327. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.2644.
- Maithel, Shishir K.; Maloney, Stephen; Winston, Corrine; Gönen, Mithat; D'Angelica, Michael I.; Dematteo, Ronald P. et al. (2008): Preoperative CA 19-9 and the yield of staging laparoscopy in patients with radiographically resectable pancreatic adenocarcinoma. In: *Annals of surgical oncology* 15 (12), S. 3512–3520. DOI: 10.1245/s10434-008-0134-5.
- Mao, Ping; Joshi, Kaushal; Li, Jianfeng; Kim, Sung-Hak; Li, Peipei; Santana-Santos, Lucas et al. (2013): Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21), S. 8644–8649. DOI: 10.1073/pnas.1221478110.

- Marcato, Paola; Dean, Cheryl A.; Giacomantonio, Carman A.; Lee, Patrick W. K. (2011a): Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (9), S. 1378–1384. DOI: 10.4161/cc.10.9.15486.
- Marcato, Paola; Dean, Cheryl A.; Liu, Rong-Zong; Coyle, Krysta M.; Bydoun, Moamen; Wallace, Melissa et al. (2015): Aldehyde dehydrogenase 1A3 influences breast cancer progression via differential retinoic acid signaling. In: *Molecular oncology* 9 (1), S. 17–31. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.07.010.
- Marcato, Paola; Dean, Cheryl A.; Pan, Da; Araslanova, Rakhna; Gillis, Megan; Joshi, Madalsa et al. (2011b): Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis.
- Meister, Gunter; Tuschl, Thomas (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. In: *Nature, Volume 431*, S. 343–349.
- Mosmann, Tim (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65, S. 55–63.
- O'Brien, Peter J.; Siraki, Arno G.; Shangari, Nandita (2005): Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. In: *Critical reviews in toxicology* 35 (7), S. 609–662. DOI: 10.1080/10408440591002183.
- Parkin, D. M. (2011): 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. In: *British journal of cancer* 105 Suppl 2, S6-S13. DOI: 10.1038/bjc.2011.475.
- Peery, Anne F.; Dellon, Evan S.; Lund, Jennifer; Crockett, Seth D.; McGowan, Christopher E.; Bulsiewicz, William J. et al. (2012): Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. In: *Gastroenterology* 143 (5), 1179-1187.e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.08.002.
- Poruk, Katherine E.; Firpo, Matthew A.; Adler, Douglas G.; Mulvihill, Sean J. (2013a): Screening for pancreatic cancer: why, how, and who? In: *Annals of surgery* 257 (1), S. 17–26. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31825ffbf.
- Poruk, Katherine E.; Gay, David Z.; Brown, Kurt; Mulvihill, Jeffrey D.; Boucher, Kenneth M.; Scaife, Courtney L. et al. (2013b): The clinical utility of CA 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: diagnostic and prognostic updates.
- Rasheed, Zeshaan A.; Yang, Jie; Wang, Qiuju; Kowalski, Jeanne; Freed, Irwin; Murter, Christopher et al. (2010): Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. In: *Journal of the National Cancer Institute* 102 (5), S. 340–351. DOI: 10.1093/jnci/djp535.
- Regine, William F.; Winter, Kathryn A.; Abrams, Ross; Safran, Howard; Hoffman, John P.; Konski, Andre et al. (2011): Fluorouracil-based chemoradiation with either gemcitabine or fluorouracil chemotherapy after resection of pancreatic adenocarcinoma: 5-year analysis of the U.S. Intergroup/RTOG 9704 phase III trial. In: *Annals of surgical oncology* 18 (5), S. 1319–1326. DOI: 10.1245/s10434-011-1630-6.
- Reni, Michele; Cereda, Stefano; Balzano, Gianpaolo; Passoni, Paolo; Rognone, Alessia; Fugazza, Clara et al. (2009): Carbohydrate antigen 19-9 change during chemotherapy for advanced pancreatic adenocarcinoma. In: *Cancer* 115 (12), S. 2630–2639. DOI: 10.1002/cncr.24302.
- Rothwell, Peter M.; Fowkes, F. Gerald R.; Belch, Jill F. F.; Ogawa, Hisao; Warlow, Charles P.; Meade, Tom W. (2011): Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. In: *The Lancet* 377 (9759), S. 31–41. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62110-1.
- Sadr-Azodi, Omid; Sanders, David S.; Murray, Joseph A.; Ludvigsson, Jonas F. (2012): Patients with celiac disease have an increased risk for pancreatitis. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (10), 1136-1142.e3. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.06.023.
- Sankaran, Sharanya J.; Xiao, Amy Y.; Wu, Landy M.; Windsor, John A.; Forsmark, Christopher E.; Petrov, Maxim S. (2015): Frequency of progression from acute to chronic pancreatitis and

- risk factors: a meta-analysis. In: *Gastroenterology* 149 (6), 1490-1500.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.07.066.
- Saw, Yu-Ting; Yang, Junzheng; Ng, Shu-Kay; Liu, Shubai; Singh, Surendra; Singh, Margit et al. (2012): Characterization of aldehyde dehydrogenase isozymes in ovarian cancer tissues and sphere cultures.
- Shao, Chunli; Sullivan, James P.; Girard, Luc; Augustyn, Alexander; Yenerall, Paul; Rodriguez-Canales, Jaime et al. (2014): Essential role of aldehyde dehydrogenase 1A3 for the maintenance of non-small cell lung cancer stem cells is associated with the STAT3 pathway. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (15), S. 4154–4166. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3292.
- Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly D.; Jemal, Ahmedin (2018): Cancer statistics, 2018. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (1), S. 7–30. DOI: 10.3322/caac.21442.
- sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scc147?lang=de®ion=DE. Datum: 05.03.2021.
sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_92030501?lang=de®ion=DE. Datum: 05.03.2021.
- Sima, Aurelia; Parisotto, Maxime; Mader, Sylvie; Bhat, Pangala V. (2009): Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates. In: *Biochimica et biophysica acta* 1790 (12), S. 1660–1664. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.09.004.
- Singh, S.; Arcaroli, J.; Thompson, D. C.; Messersmith, W.; Vasiliou, V. (2015): Acetaldehyde and retinaldehyde-metabolizing enzymes in colon and pancreatic cancers. In: *Advances in experimental medicine and biology* 815, S. 281–294. DOI: 10.1007/978-3-319-09614-8_16.
- Siomi, Haruhiko; Siomi, Mikiko C. (2009): On the road to reading the RNA-interference code.
- Tanaka, Masao (2014): Thirty years of experience with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: from discovery to international consensus. In: *Digestion* 90 (4), S. 265–272. DOI: 10.1159/000370111.
- Tempero, Margaret A.; Uchida, Eiji; Takasaki, Hideaki; Burnett, David A.; Stepkowski, Zenon; Pour, Parviz M. (1987): Relationship of Carbohydrate Antigen 19-9 and Lewis Antigens in Pancreatic Cancer.
- Vaca, Carlos E.; Fang, Jia-Long; Schweda, Elke K.H. (1995): Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides.
- van den Hoogen, Christel; van der Horst, Geertje; Cheung, Henry; Buijs, Jeroen T.; Lippitt, Jenny M.; Guzmán-Ramírez, Natalia et al. (2010): High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. In: *Cancer research* 70 (12), S. 5163–5173. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3806.
- Vasiliou, Vasilis; Nebert, Daniel W. (2005): Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family.
- Vasiliou, Vasilis; Pappa, Aglaia; Estey, Tia (2004): Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism. In: *Drug metabolism reviews* 36 (2), S. 279–299. DOI: 10.1081/dmr-120034001.
- Vassalli, Giuseppe (2019): Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. In: *Stem cells international* 2019, S. 3904645. DOI: 10.1155/2019/3904645.
- Waddell, Nicola; Pajic, Marina; Patch, Ann-Marie; Chang, David K.; Kassahn, Karin S.; Bailey, Peter et al. (2015): Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. In: *Nature* 518 (7540), S. 495–501. DOI: 10.1038/nature14169.
- Ward, Ryan J.; Dirks, Peter B. (2007): Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. In: *Annual review of pathology* 2, S. 175–189. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091847.
- Whiteman, David C.; Webb, Penelope M.; Green, Adele C.; Neale, Rachel E.; Fritschi, Lin; Bain, Christopher J. et al. (2015): Cancers in Australia in 2010 attributable to modifiable factors:

- introduction and overview. In: *Australian and New Zealand journal of public health* 39 (5), S. 403–407. DOI: 10.1111/1753-6405.12468.
- Wolfgang, Christopher L.; Herman, Joseph M.; Laheru, Daniel A.; Klein, Alison P.; Erdek, Michael A.; Fishman, Elliot K.; Hruban, Ralph H. (2013): Recent progress in pancreatic cancer. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 63 (5), S. 318–348. DOI: 10.3322/caac.21190.
- Wolpin, Brian M.; Chan, Andrew T.; Hartge, Patricia; Chanock, Stephen J.; Kraft, Peter; Hunter, David J. et al. (2009): ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 101 (6), S. 424–431. DOI: 10.1093/jnci/djp020.
- Yadav, Dhiraj; Eigenbrodt, Marsha L.; Briggs, Margaret J.; Williams, D.Keith; Wiseman, Eve J. (2007): Pancreatitis prevalence and risk factors among male veterans in a detoxification program.
- Yadav, Dhiraj; Hawes, Robert H.; Brand, Randall E.; Anderson, Michelle A.; Money, Mary E.; Banks, Peter A. et al. (2009): Alcohol consumption, cigarette smoking, and the risk of recurrent acute and chronic pancreatitis. In: *Archives of internal medicine* 169 (11), S. 1035–1045. DOI: 10.1001/archinternmed.2009.125.
- Yadav, Dhiraj; Lowenfels, Albert B. (2006): Trends in the epidemiology of the first attack.
- Yadav, Dhiraj; Lowenfels, Albert B. (2013): The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. In: *Gastroenterology* 144 (6), S. 1252–1261. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.068.
- Yoon, Kyong-Ah; Nakamura, Yusuke; Arakawa, Hirofumi (2004): Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. In: *Journal of human genetics* 49 (3), S. 134–140. DOI: 10.1007/s10038-003-0122-3.

Thesen

- 1.) ALDH1A3 ist in humanem Pankreaskarzinomgewebe im Vergleich zu chronischem Pankreatitis- sowie nicht pathologisch verändertem Gewebe überexprimiert.
- 2.) ALDH1A3 ist in drei repräsentativen Pankreaskrebszelllinien (AsPC-1, BxPC-3, SU.86.86), die ein hohes metastasierendes Potenzial aufweisen, überexprimiert.
- 3.) Die ALDH1A3-Expression lässt sich in diesen drei Pankreaskrebszelllinien erfolgreich mittels spezifischer siRNA und leitliniengerechter Chemotherapie herunterregulieren.
- 4.) Eine mittels siRNA und Chemotherapie induzierte ALDH1A3-Herunterregulierung korreliert mit erniedrigten Proliferationsraten.
- 5.) Eine erhöhte ALDH1A3-Expression im Pankreaskarzinomgewebe und die Beeinflussung der Regulation der ALDH1A3 könnten als diagnostische und therapeutische Ansätze für die zukünftige Krebstherapie dienen.

Selbstständigkeitserklärung mit Unterschrift

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.

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

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

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätsklinik und Poliklinik für Viszerale, Gefäß- und Endokrine Chirurgie der Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg erstellt.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Kleeff danken für die Möglichkeit, eine experimentelle Doktorarbeit in seiner Klinik erstellen zu dürfen, sowie für die individuelle, wissenschaftliche Betreuung und jederzeitige Bereitschaft für Anregung und Diskussionen.

Mein nächster Dank gilt Dr. Bogusz Trojanowicz, der mich stets hilfsbereit mit wissenschaftlichen Fakten unterstützt hat und sich für all meine Fragen geduldig Zeit genommen hat.

Zudem möchte ich herzlich Kathrin Hammje danken für die hervorragende sowie geduldige Anleitung und tatkräftige, auch emotionale Unterstützung.

Ebenso möchte ich den anderen DoktorandInnen danken für die anregenden Diskussionen, wie auch Dr. Yoshiaki Sunami.

Ein weiter Dank gilt Carsten Sekulla, für die Hilfe bei Computer- sowie Statistikfragen.

Auch bei meiner Familie sowie meinen Freunden, die sich immer die Zeit genommen haben, mir zuzuhören und mich moralisch zu unterstützen, möchte ich mich herzlich bedanken.