

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-,
Transplantations-, Gefäß- und Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Univ. Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer

Molekulare Onkoimmunologie

Leiterin: Frau Univ. Professor Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser

**Über das Expressionsverhalten von Reparatur- und
ABC Transporter-Genen sowie
inflammatorischen Signalwegen im Kolon- und Pankreaskarzinom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johannes Christian Schmitt

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2019



Referent/Referentin: Prof. Dr. med. Martin Gasser

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. med. Volker Kunzmann

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2021

Der Promovend ist Arzt

Meiner Frau Ina Andrea Schmitt

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Tumorerkrankungen	1
1.1.1	Das Kolonkarzinom	1
1.1.2	Das exokrine Pankreaskarzinom.....	5
1.2	Therapieansätze	8
1.3	Aufbau und Lokalisation der ABC-Transporter und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom	9
1.3.1	Struktur und Funktion der ABC-Transporter.....	9
1.3.2	Chemotherapieresistenz und die Rolle der ABC-Transporter im Kolon- und Pankreaskarzinom.....	12
1.4	Aufbau und Lokalisation der Hitzeschockproteine und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom.....	13
1.4.1	Struktur und Funktion der Hitzeschockproteine	13
1.4.2	Hitzeschockproteine und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom	14
1.5	Aufbau und Lokalisation der <i>Toll-Like</i> Rezeptoren und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom.....	15
1.5.1	Struktur und Funktion der <i>Toll-like</i> Rezeptoren	15
1.5.2	<i>Toll-like</i> Rezeptoren und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom	19
1.6	Chemotherapieresistenz in Krebszellen und die Theorie der Krebsstammzellen.....	21
1.7	Nährstoffmangelbedingungen in soliden Tumoren	22
2	Fragestellungen.....	25

3	Material und Methoden	26
3.1	Material.....	26
3.1.1	Geräte.....	26
3.1.2	Verbrauchsmaterial	28
3.1.3	Chemikalien	30
3.1.4	Fertigansätze	34
3.1.5	Primer.....	35
3.1.6	Antikörper	36
3.1.7	Zelllinien	37
3.1.8	Kulturmedien und Zusätze.....	38
3.2	Methoden	39
3.2.1	Zellkultur und Versuchsaufbau.....	39
3.2.2	Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR).....	42
3.2.3	Western Blot	48
3.2.4	Immunhistochemie und Zytospins.....	53
3.2.5	Proliferationsassay	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Real-Time-PCR.....	55
4.1.1	Auswertung der Referenzgene.....	55
4.1.2	Expressionsanalysen im Kolon- und Pankreaskarzinom nach Nährstoffentzug	59
4.2	Western Blot.....	80
4.3	Immunhistochemie.....	81
4.4	MTS Proliferationsassay	81

5	Beantwortung der Fragestellungen.....	83
6	Diskussion.....	87
7	Zusammenfassung und Ausblick	95
8	Abkürzungsverzeichnis.....	98
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	106
9.1	Abbildungen	106
9.2	Tabellen.....	108
10	Literaturverzeichnis.....	110

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Krebserkrankungen sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Eine von dem Altersfaktor bereinigte altersstandardisierte Sterbeziffer (ASR = altersstandardisierte Rate nach dem Europastandard pro 100.000 Einwohner) der über 65-jährigen zeigt bei Neubildungen eine sinkende Sterblichkeit seit 1980. Bei Männern sank die Sterblichkeit seit 1980 um 24 %, bei Frauen um 21 %. Im Vergleich dazu sank die Sterblichkeit durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen im selben Zeitraum bei Männern um 41 % und bei Frauen um 44 %. Somit könnten Tumorerkrankungen in Zukunft die häufigste Todesursache in Deutschland werden. [1, 2] Diese Tendenz wird durch aktuelle Zahlen des Gesundheitsberichts des Bundes bestätigt [3]. Die sinkende Sterblichkeit bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist eine Erfolgsgeschichte der modernen Medizin. Für ähnliche Fortschritte in der Therapie von Krebserkrankungen sind weiterhin Anstrengungen in der Grundlagenforschung und Prävention notwendig.

1.1.1 Das Kolonkarzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt bundesweit für beide Geschlechter die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Im Jahr 2009 lag für Männer eine altersbereinigte Sterberate (ASR) von 61,6 und eine bundesweite Fallzahl von 35.219 vor. Für Frauen lag im gleichen Jahr eine altersbereinigte Sterberate (ASR) von 38,8 und eine bundesweite Fallzahl von 29.279 vor. Damit ist das KRK mit rund 14 % aller Krebsneuerkrankungen die zweithäufigste Krebstodesursache in Deutschland [4]. Dabei steigt das Erkrankungsrisiko mit zunehmendem Alter an. Über 90 % der kolorektalen Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahr auf. Neben hohem Alter sind Ernährungsfaktoren (wie ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung), Zigaretten- und Alkoholkonsum,

chronisch entzündliche Darmerkrankungen und in 10 % der Fälle genetische Einflüsse weitere Risikofaktoren.

Lokalisiert ist das KRK zu 45 % im Colon sigmoideum, zu 5,1 % im Colon descendens, zu 5,4 % in der linken Flexur, zu 8,6 % im Colon transversum, zu 5,4 % in der rechten Flexur, zu 17 % im Colon ascendens und zu 12,5 % im Zäkum. Das Rektumkarzinom verteilt sich auf das obere Drittel zu 17,5 %, auf das mittlere Drittel zu 35,6 % und auf das untere Drittel zu 46,9 %. Zu beachten ist dabei, dass das KRK auch multipel auftreten kann. [5]

Pathogenetisch beschreiben die Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz und das Tumorprogressionsmodell nach Vogelstein und Fearon das KRK genauer [6]. Die gute Zugänglichkeit für histopathologische Untersuchungen und die hohen Fallzahlen haben zu einer genaueren Beschreibung der Entstehungsmechanismen des KRK aus Adenomen und über Dysplasien aus normalem Epithel beigetragen. Dabei haben Analysen von Gewebeproben eine Vielzahl unterschiedlicher Grade der Entartung offengelegt. Diese reichen von benignen Hyperplasien über die verschiedenen Adenome und einem *carcinoma in situ* (CIS) bis hin zum Adenokarzinom, welches histopathologisch von G1 (gut differenziert) bis G4 (undifferenziert) eingeteilt wird. Die Entwicklung eines Karzinoms aus seinen Vorstufen kann dabei bis zu 10 Jahren dauern. [5, 7]

Analog zu den histopathologischen Veränderungen werden auch charakteristische genetische Veränderungen beobachtet, die auf sequentieller Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen beruhen. Für das KRK konnte eine charakteristische Sequenz solcher Mutationen definiert und in einem Tumorprogressionsmodell festgehalten werden [6, 8]. In diesem Modell entsteht ein Adenom durch den Verlust des APC-Tumorsuppressorgens (5q21). In diesem Adenom kann die Dysplasie durch weitere Mutationen, wie die Aktivierung des K-RAS-Onkogens und den Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens auf Chromosom 18, weiter fortschreiten. Der Übergang zum Adenokarzinom kann sich schließlich durch den Verlust des Tumorsuppressorgens p53 (17p13) vollziehen [7]. (siehe Abbildung 1)

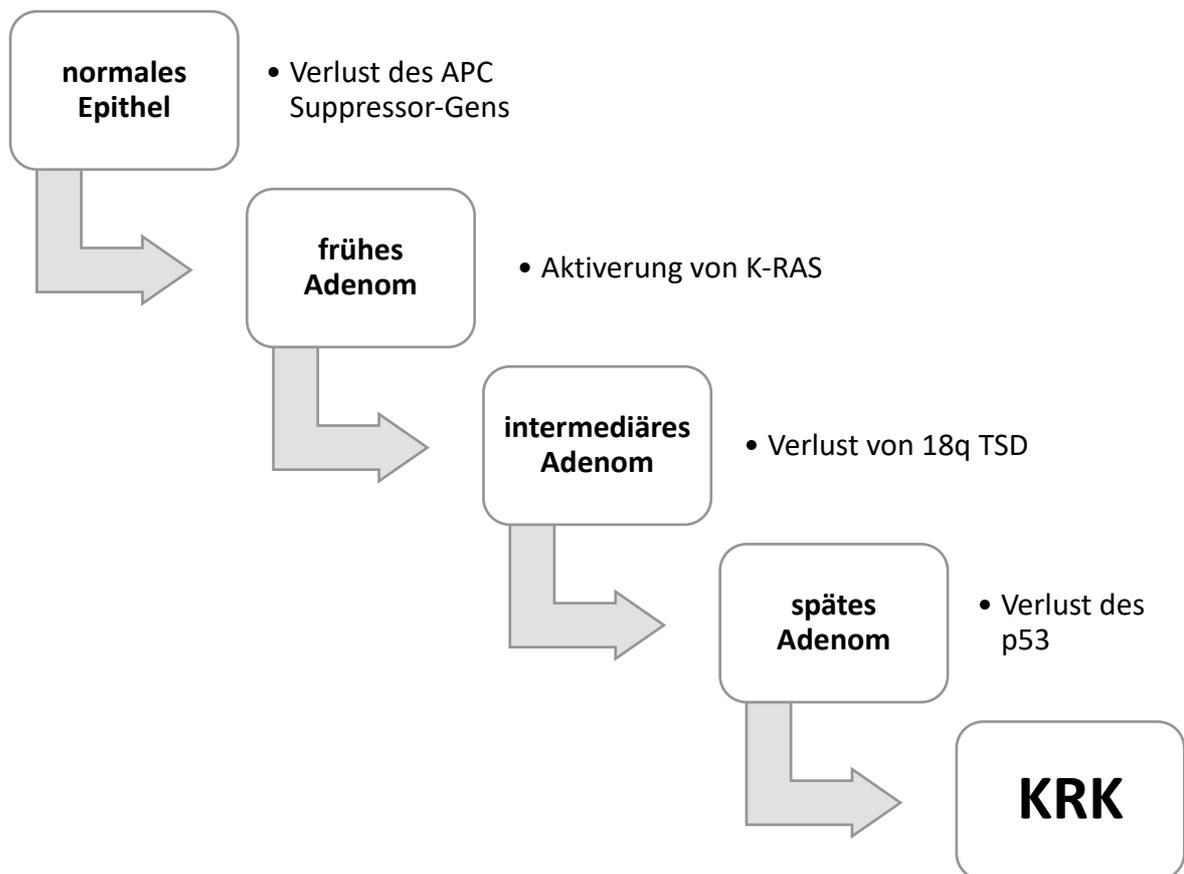


Abbildung 1: Genetisches Tumorprogressionsmodell für das kolorektale Karzinom (Abb. modifiziert nach Weinberg R.A. et al. 2007 [7])

Nach Übergang zum Karzinom können Krebszellen die Fähigkeit zur Invasion oder Metastasierung erlangen, so in fremdes Gewebe einwandern und über Lymph- und Blutgefäße in andere Organe gelangen. Je nach Grad der Entartung, Gewebeinvasion und Metastasierung wird das KRK nach verschiedenen Klassifikationen eingeteilt. (siehe Tabelle 1).

UICC-Stadium	Definition	TNM-System	Dukes
0	carcinoma in situ (CIS)	Tis N0 M0	
I	<u>Ia</u> : beschränkt auf Mucosa und Submucosa	T1 N0 M0	A
	<u>Ib</u> : Muscularis propria infiltriert	T2 N0 M0	
II	<u>IIa</u> : Infiltration aller Wandschichten	T3 N0 M0	B
	<u>IIb</u> : Überschreitung der Darmwand	T4 N0 M0	
III	Lymphknotenmetastasen oder Infiltration der Umgebung	Tx N1-2 M0	C
IV	Fernmetastasen	Tx Nx M1	D

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms [5]

Entsprechend des Stadiums der Erkrankung wird eine kurative oder palliative Therapie gewählt. Diese besteht aus chirurgischer Entfernung, Strahlentherapie beim Rektumkarzinom, Polychemotherapien und aus der Verwendung neuerer Substanzen. Dabei gibt es adjuvante und neoadjuvante Therapiekonzepte, die monoklonale Antikörper gegen VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) und EGF (engl. *epidermal growth factor*) als auch Chemotherapeutika wie Oxaliplatin, 5-Fluorouracil und Folinsäure beinhalten. Durch diese Konzepte können 5-Jahresüberlebensraten von 90-100 % bei UICC-Stadium I, 60-80 % beim UICC-Stadium II, 30-80 % beim UICC-Stadium III und nur 15-20 % bei einem UICC-Stadium IV erreicht werden.

Um das Entstehen eines Kolonkarzinoms aus Adenomen zu vermeiden, werden regelmäßige Vorsorgekoloskopien mit Polypektomien ab einem Lebensalter von 50 Jahren (Männer) oder 55 Jahren (Frauen) sowie bei Risikopatienten empfohlen [5].

1.1.2 Das exokrine Pankreaskarzinom

Das exokrine Pankreaskarzinom stellt bei einer ASR von 12,7 bei Männern die neunthäufigste (ca. 3 % aller Tumorerkrankungen) und mit einer ASR von 9,4 bei Frauen die siebthäufigste (ca. 2,4 % aller Tumorerkrankungen) Tumorerkrankung in der Bundesrepublik dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 68 Jahren und bei Frauen bei 70 Jahren. Nach dem Kolon- und Magenkarzinom ist das Pankreaskarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes. Es liegt mit 6,3 % aller Krebstodesfälle bei Männern und 7,5 % bei Frauen an vierter Stelle aller Krebstodesursachen. Dies lässt sich durch die schlechte Prognose und ungünstige 5-Jahresüberlebensrate von nur 6 % erklären. Damit weist das Pankreaskarzinom unter allen Krebserkrankungen die schlechteste Überlebensrate auf [4].

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Allerdings spielen Alkoholkonsum, Nikotinabusus und einige Tumorprädispositionssyndrome wie das Peutz-Jeghers-Syndrom und die hereditäre Pankreatitis eine wichtige Rolle. Bei den beiden zuletzt genannten Syndromen konnten Genmutationen identifiziert werden.

Histologisch liegt in 80 % ein duktales Adenokarzinom vor. Azinuszellkarzinome und Zystadenokarzinome liegen in 5-10 % der Fälle vor. Dabei findet sich der Tumor in 80 % der Fälle im Pankreaskopf [5]. Auch beim Pankreaskarzinom wurde ein Tumorprogressionsmodell beschrieben. Das duktales Adenokarzinom entwickelt sich über präneoplastische Gangläsionen. Hierbei werden wie beim KRK sequentiell verschiedene Tumorsuppressorgene wie p53, p16 und DPC4 inaktiviert und Onkogene aktiviert.

Bemerkenswert ist, dass in 90 % der Fälle eine Mutation des K-RAS-Onkogens nachgewiesen werden kann [9]. Genauso können histopathologisch verschiedene Stadien der Entdifferenzierung definiert werden. Die zunehmende histologische Entdifferenzierung dieser sogenannten präneoplastischen Gangläsionen wird in Abbildung 2 gezeigt. [5]

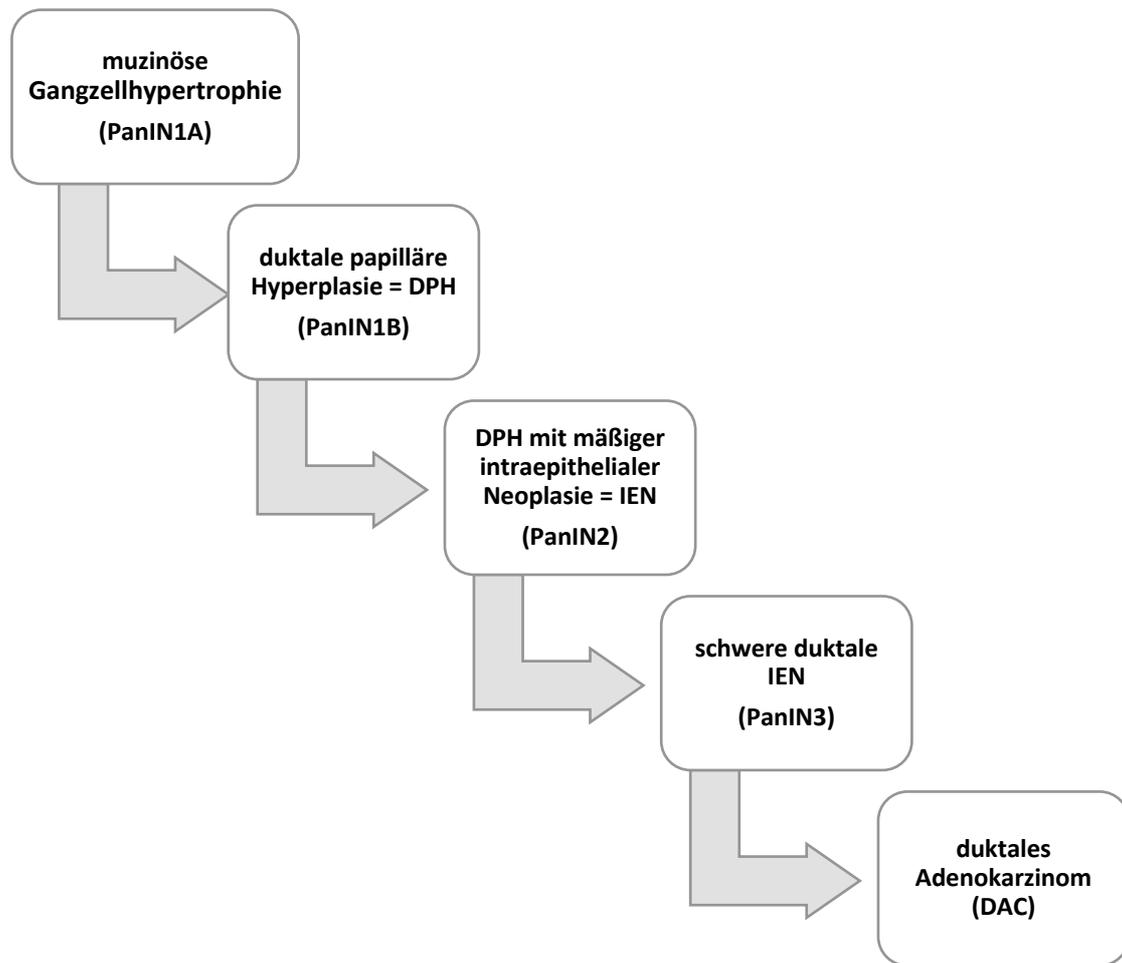


Abbildung 2: Entwicklung zum Pankreaskarzinom über präneoplastische Gangläsionen [10, 11] (Abb. wurde selbst erstellt)

Die gebräuchlichste Stadieneinteilung des exokrinen Pankreaskarzinoms ist das Tumor-Node-Metastasen-System des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) und wird in Tabelle 2: Stadieneinteilung des exokrinen Pankreaskarzinoms abgebildet. Nach der Einordnung in die TNM-Klassifikation kann eine Gruppierung in UICC-Stadien erfolgen [9].

UICC-Stadium	Definition	TNM-System		
		T	N	M
0	Carcinoma in situ	Tis	N0	M0
I	<u>Ia</u> : Tumor auf das Pankreas begrenzt, < 2cm	T1	N0	M0
	<u>Ib</u> : Tumor auf das Pankreas begrenzt, > 2cm	T2	N0	M0
II	<u>IIa</u> : Infiltration der Umgebung aber nicht in größere Gefäße oder Nerven	T3	N0	M0
	<u>IIb</u> : Stadium Ia bis IIb jedoch mit lokaler Lymphknotenmetastasierung	T1-3	N1	M0
III	Invasion größerer Blutgefäße oder Nerven	T4	N1-3	M0
IV	Fernmetastasen	T1-4	N1-3	M1

Tabelle 2: Stadieneinteilung des exokrinen Pankreaskarzinoms [5]

In 80 % der Fälle befindet sich die Erkrankung bei Diagnose schon in fortgeschrittenen Stadien, sodass die einzige kurative Therapie, die R0-Resektion, nicht mehr durchgeführt werden kann. Dies ist der Fall bei Infiltration zentraler Arterien wie dem *Truncus coeliacus* oder der *A. mesenterica superior* (T4-Tumore). Die späte Diagnose wird hauptsächlich für die hohe Sterblichkeit verantwortlich gemacht. Wenn eine primäre Operation möglich ist, folgt eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin oder 5-Fluorouracil. Ist die primäre Operation nicht möglich, kann eine Tumorreduktion mittels einer Gemcitabin-basierten Radiochemotherapie und anschließender Reevaluation versucht werden. Eine sekundäre Resektabilität wird in bis zu 25 % der Fälle erreicht. Es folgt die gleiche adjuvante Chemotherapie. Nach Operation und erreichter vollständiger Tumorfreiheit (R0 Resektion) überleben bis zu 25 % der Patienten die darauf folgenden 5-Jahre [12].

Palliative Therapiekonzepte umfassen die Einlage von Duodenal- und transpapillären Stents, Chemotherapien und palliative Schmerztherapien bis hin zur Blockade des

Ganglion coeliacum. Bemerkenswert ist, dass derzeit weiterhin keine Früherkennungsuntersuchungen etabliert sind.

1.2 Therapieansätze

Bis zum Durchbruch der Molekularbiologie und den daraus entstandenen neuen Therapiemöglichkeiten beruhte die Therapie von Krebserkrankungen auf drei großen Säulen. Die erste Säule stellt die chirurgische Entfernung des Tumors dar. Sie wurde schon im Altertum von dem römischen Arzt Aulus Celsus (50 v. Chr. – 24 n. Chr.) beschrieben. Die Strahlentherapie gilt als zweite Säule der modernen Krebstherapie. Es konnten nun inoperable Tumore oder die Operationsfelder nach der Tumorresektion bestrahlt werden, um eine Tumorreduktion zu erreichen oder die Rezidivbildung im Operationsfeld zu reduzieren.

Chemotherapeutika gelten nach ihrer Entdeckung Anfang des 20. Jahrhunderts als dritte Säule der Krebstherapie. Nun konnten auch nicht-solide Tumore und mikroskopische Absiedelungen von soliden Tumoren bekämpft werden.

Nach den Erfolgen der Molekularbiologie und Genetik gilt aktuell die sogenannte gezielte Krebstherapie (engl. *targeted therapie*) als die neueste Entwicklung. Chemotherapeutika greifen in Mechanismen der Zellteilung ein und machen sich damit das schnelle Wachstum der meisten Krebszellen zu Nutze. Sie greifen damit aber auch schnell teilendes Normalgewebe wie z.B. die Schleimhäute und das Knochenmark an. Dies limitiert die Dosis und damit auch den Erfolg der Therapie.

Über moderne molekularbiologische Methoden können nun spezifische Eigenschaften von Krebszellen analysiert werden. Aus diesen Eigenschaften lassen sich gezielte Therapieoptionen konstruieren, die im Organismus zu weniger Kollateralschäden und zur effektiveren Bekämpfung der Krebszellen führen. Heute ist es bei vielen Krebsarten ein Standardvorgehen, dass die entnommenen Gewebeprobe auf ihre molekularen Eigenschaften und Genexpressionen geprüft werden. Somit können in interdisziplinären Tumorkonferenzen für viele Krebspatienten individuelle Therapiepläne entwickelt werden.

Durch die Erforschung der genetischen Besonderheiten des kolorektalen Karzinoms und Pankreaskarzinoms haben sich in den letzten Jahren mehrere potenzielle Angriffspunkte für eine gezielte Krebstherapie ergeben. In den folgenden Kapiteln werden die für diese Arbeit relevanten Gene und zugehörigen Proteine vorgestellt.

1.3 Aufbau und Lokalisation der ABC-Transporter und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom

1.3.1 Struktur und Funktion der ABC-Transporter

In jüngerer Vergangenheit wurde beschrieben, dass Tumorzellen resistent gegen bestimmte Chemotherapeutika und biologische Substanzen werden können. Dieser Mechanismus wurde erstmals von Juliano und Ling im Jahre 1976 mit einem Protein in Verbindung gebracht [13]. Sie konnten nachweisen, dass ein zelluläres Oberflächenprotein die Durchlässigkeit der Plasmamembran gegenüber zytotoxischen Substanzen herabsetzt. Dieses Protein wurde P-gp (P-Glykoprotein) genannt, wobei „P“ für „Permeabilität“ steht. Heute ist P-gp auch unter dem Namen MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) oder ABCB1 (*ATP-binding cassette sub-family B member 1*) bekannt und stellt nur ein Mitglied aus der Superfamilie der ATP-binding cassette (ABC)-Transporter dar. Dabei handelt es sich um eine Gruppe von 49 Proteinen, die wiederum in 7 Subfamilien eingeteilt werden (vgl. Tabelle 4).

Subfamilien	Namen	Gewebe	Funktion
A (A1-A12)	ABCA2 (ABC2)	Gehirn	multidrug resistance
B (B1-B11)	ABCB1 (PGY1, MDR)	Niere, Nebenniere, Gehirn	multidrug resistance
	ABCB5	Ubiquitär	multidrug resistance
	ABCB11 (SPGP)	Leber	Gallensalz-Transport
C (C1-C12)	ABCC1 (MRP1)	Lunge, Hoden, PBMC	multidrug resistance
	ABCC2 (MRP2)	Leber	Organischer Anionen Transport
	CFTR	exokrine Gewebe	Chlorid-Kanal
D (D1-D4)	ABCD1 (ALD)	Peroxisomen	VLCFA Transport Regulation
E (E1)	ABCE1 (OABP, RNS41)	Ovarien, Hoden, Milz	Oligoadenylate binding protein
F (F1-F3)	ABCF1	ubiquitär	
G (G1-G5, G8)	ABCG2 (ABCP, MXR, BCRP)	Placenta, Intestinaltrakt	Toxin efflux, multidrug resistance

Tabelle 3: Subfamilien der ABC-Transporter mit ausgewählten Vertretern ihrer Expression und Funktion [14]

Die ABC-Transporter sind membranständige Proteine, die in der Lage sind, verschiedenste Stoffe aktiv aus der Zelle über die Zellmembran hinaus in den extrazellulären Raum zu transportieren. Die notwendige Energie für diesen Transport wird durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) gewonnen. ABC-Transporter stellen eine der größten Proteinfamilien dar und sind im Tierreich sowohl unter Pro- als auch unter Eukaryonten weit verbreitet. In maligne entarteten Zellen können diese Pumpen dazu beitragen, dass die Konzentration von Chemotherapeutika und anderen toxischen Substanzen in der Zelle so niedrig wie möglich gehalten wird. Dies stellt einen unmittelbaren Überlebensvorteil für Zellen dar, die mit diesen Transportern reichlich ausgestattet sind. Natürlicherweise kommen diese Transporter vornehmlich in Organen oder Geweben vor, die für die Ausscheidung von Giftstoffen oder als Barriere fungieren. Beispiele sind Leber, Niere, Darm aber auch die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta.

Die Struktur eines ABC-Transporters umfasst zwei homologe transmembranäre Domänen (TMD), die jeweils aus mehreren α -Helices bestehen und für die Bindung der Zielsubstanzen verantwortlich sind. Neben den zwei TMDs liegen regelmäßig auch zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) vor, die für die Hydrolyse des ATP zuständig sind und im Zytoplasma liegen. Die TMDs sind am wenigsten konserviert und variieren deutlich in ihrer Struktur. Im Gegensatz zu den TMDs sind die NBDs hoch konserviert und beinhalten meistens sieben charakteristische Motive, wie das Walker A und das Walker B Motiv, die Q-Schleife und die ABC-Signatur. Diese Strukturen werden unmittelbar mit der ATP-Bindung in Verbindung gebracht. Die Einteilung der ABC-Transporter in die sieben Subfamilien richtet sich nach der Beschaffenheit der NBDs. [15] Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Transporter, ihre Familien, ihr Vorkommen und ihre Substrate.

1.3.2 Chemotherapieresistenz und die Rolle der ABC-Transporter im Kolon- und Pankreaskarzinom

Die Chemotherapieresistenz wird neben den Effluxpumpen auch über andere Mechanismen vermittelt. Zu diesen zählen unter anderem die Zellzyklus-Kontrolle, verschiedene DNA-Reparatur-Mechanismen, der Abbau von Chemotherapeutika, die Veränderung der Zielstrukturen, die Vermeidung einer Apoptoseinduktion und eine Resistenz gegenüber den durch die Chemotherapeutika verursachten Schäden. [16-18] Im Folgenden soll auf die Rolle der ABC-Transporter eingegangen werden.

Im Kolonkarzinom konnten neuere Inhibitoren von ABC-Transportern unter *in-vitro* Bedingungen Chemotherapieresistenz vermindern und die resistenten Zelllinien angreifbar für klassische Chemotherapeutika machen. [19] Umgekehrt konnte für ABCB5 (*ATP binding cassette subfamily B member 5*) im humanen HT29 Kolonkarzinom gezeigt werden, dass eine Überexpression zur gesteigerten Resistenz gegen 5-Fluorouracil (5-FU) führt. Darüber hinaus konnten Wilson *et al.* darlegen, dass ABCB5 im kolorektalen Karzinom überexprimiert wird und dass eine ABCB5-Expression eventuell auch Tumorstammzellen markiert. Obwohl die Ansprechrate im Kolonkarzinom bei ca. 50 % liegt, wird in fast allen Fällen eine Chemotherapieresistenz festgestellt, welche die Effizienz der Therapie einschränkt. Hier ist also möglicherweise eine Verbesserung der Therapieeffizienz zu erwarten. Somit kann die Behandlung einer Chemotherapieresistenz einen großen Beitrag zur erfolgreichen Krebstherapie leisten und muss weiter untersucht werden.

Auch im Pankreaskarzinom konnten ABC-Transporter nachgewiesen werden. Hier sind sie ebenfalls für die Entwicklung von Chemotherapieresistenzen verantwortlich. Zudem scheinen bestimmte Genpolymorphismen das Risiko zu erhöhen, an Pankreaskrebs zu erkranken und eine Chemoresistenz zu entwickeln [20, 21]. Auch hier besteht die Hoffnung, ein besseres Therapieansprechen über die gezielte Therapie der Chemoresistenz im Pankreaskarzinom zu erreichen.

1.4 Aufbau und Lokalisation der Hitzeschockproteine und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom

1.4.1 Struktur und Funktion der Hitzeschockproteine

Ein Organismus ist den verschiedensten schädlichen Einflüssen aus seiner Umwelt aber auch aus seinem eigenen Zellstoffwechsel ausgesetzt. Das können Temperaturunterschiede und Strahlung sowie oxidativer Stress aus dem Zellmetabolismus sein. Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist für den geregelten Ablauf physiologischer Prozesse und damit auch für das Überleben des Organismus unentbehrlich. Für diesen Zweck ist die Hitzeschockprotein-Antwort (engl. *heat shock response*) einer der ältesten und evolutionär hoch konserviertesten Mechanismen in der Natur. Sie legt damit ihre essentielle Bedeutung für den geregelten Zellstoffwechsel dar [22].

Ritossa beobachtete 1962 erstmals eine neu aufgetretene RNA-Synthese in Speicheldrüsenzellen von *Drosophila*, nachdem ein Mitarbeiter versehentlich die Temperatur des Inkubators erhöht hatte [23]. Dies gilt als die Entdeckung der *heat shock response*. Mittlerweile konnte dieser Effekt für die verschiedensten Stressoren nachgewiesen werden. Darunter zählen UV-Strahlung, oxidativer Stress, Schwermetalle und Hitze [22]. Die hochregulierten Proteine sind als Hitzeschockproteine (engl. *heat shock protein*; HSP) bekannt. Die Mitglieder der HSP-Familie haben ein molekulares Gewicht von 10 bis 100 kDa und werden anhand von diesem eingeteilt: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und kleine HSPs [24, 25]. HSPs kommen in allen Zellorganellen vor und nehmen dort spezifische Aufgaben wahr [26]. Wichtige Aufgaben dieser molekularen *chaperone* (engl. Anstandsdamen) sind die korrekte Proteinfaltung bei der Synthese, der Proteintransport und die Erhaltung ihrer Sekundärstruktur unter diversen Extrembedingungen [27, 28]. Darüber hinaus können HSP auch eine Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau verhindern und scheinen die von ihnen versorgten Substrate (auch bekannt als *client proteins*) damit zu stabilisieren. Ihre Substrate sind vielfach Kinasen und andere regulatorische Proteine, die in der gesunden Zelle für physiologische Prozesse, in der Krebszelle aber auch für maligne Signalkaskaden verantwortlich sind [29-32]. Eine erhöhte Expression von HSPs konnte in diversen malignen Zelllinien nachgewiesen werden [22, 33, 34]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass HSPs mehrere Onkogene und Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel BCR-ABL, TP53, BRAF und Her-2/neu

stabilisieren. Damit liegt die Vermutung nahe, dass maligne Zellen die *heat shock response* auf verschiedenen Ebenen benötigen, um dem endogenen Stress, der durch die maligne Entartung verursacht wird, zu entgehen. Dazu zählen die Stabilisierung von Onkogenen und der Schutz vor Denaturierung durch oxidativen Stress. Dabei wird die maligne Zelle in großem Maße von diesem System abhängig und integriert es in ihren Zellstoffwechsel. [22, 32]

1.4.2 Hitzeschockproteine und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreas-karzinom

Bis heute haben 17 HSP90 Antagonisten klinische Studien erreicht und damit konnten sowohl *in vitro* als auch in klinischen Studien Erfolge verzeichnet werden [32]. Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen weisen auf eine T-Zell vermittelte anti-Tumor Wirkung durch HSP90-Inhibition an *ephrin-Rezeptor-A2* (ephA2) positiven Tumorzellen hin. Die EhpA2-Tyrosinkinase ist ein HSP90-Client und wird von vielen Tumorentitäten exprimiert. Sie gilt als ein die Metastasierungstendenz steigerndes Onkogen. *In vitro* konnte unter HSP90-Blockade eine erhöhte Aktivität von CD8⁺ T-Zellen gegen EhpA2 positive Tumorzellen beobachtet werden. Dabei wurde über die HSP90-Blockade eine Steigerung des proteasomalen Abbaus von ephA2 und damit eine erhöhte Präsentation von ehpA2-Fragmenten auf MHC-1 erreicht. So wurden die Tumorzellen öfter als „fremd“ erkannt und vernichtet. [35] Ein weiteres Substrat der *heat shock response* ist die Rezeptortyrosinkinase Her2/neu [32]. Hier konnte in Brustkrebs-Xenograft-Studien gezeigt werden, dass die HSP90-Blockade bei Her2/neu-positiven Zellen sogar bei Patienten die unter Trastuzumab eine Tumorprogression erlebt haben, Wirkung zeigt [32, 36].

Da im Pankreas- und im Kolonkarzinom oft ähnliche onkogene Signalkaskaden aktiv sind, ist eine Übertragung dieser Prinzipien auch auf diese Entitäten naheliegend. In Bezug auf das kolorektale Karzinom konnte gezeigt werden, dass ein hoch reguliertes HSP90 für die Chemotherapieresistenz gegen 5-Fluorouracil mitverantwortlich ist. Darüber hinaus konnte bei 5-FU resistenten Zellen über die Blockade von HSP90 eine verminderte Migrationsneigung, Viabilität, Invasion und sogar eine erhöhte Apoptose

festgestellt werden. Keine Zunahme dieser Effekte zeigte sich durch gleichzeitige Behandlung mit 5-Fluorouracil. In Xenograft-Versuchen konnte durch die Behandlung mit HSP-Inhibitoren ein Rückgang von Migration und Metastasenbildung beobachtet werden. [37]

Auch im Pankreaskarzinom konnte eine erhöhte Expression von HSPs nachgewiesen werden [38, 39]. Im Pankreaskarzinommodell konnte über einen Gen-Knockdown von HSP70 oder die Anwendung eines HSP70-Inhibitors die Apoptose eingeleitet werden. Auch aus dieser Untersuchung konnten die *in-vitro* Ergebnisse erfolgreich in lebende Modelle (*in vivo*) übertragen werden. Es zeigte sich eine Abnahme der Tumorgröße nach Behandlung mit einem HSP-Inhibitor [40].

Somit scheinen die Hitzeschockproteine sowohl im Kolon- als auch im Pankreaskarzinom mitverantwortlich für die Ausbildung von Chemotherapieresistenz und die Sicherung von onkogenen Signalkaskaden zu sein. Damit bietet sich die Familie der HSPs als ein weiterer Ansatzpunkt für eine gezielte Krebstherapie an.

1.5 Stellen Aufbau und Lokalisation der *Toll-Like* Rezeptoren und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreaskarzinom

1.5.1 Struktur und Funktion der *Toll-like* Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) stellen eine der ersten Abwehrmechanismen unseres angeborenen Immunsystems dar. Sobald ein pathogener Mikroorganismus die Epithelbarriere überwunden hat, muss dieser durch unser Immunsystem erkannt werden. Diese Aufgabe wird unter anderem durch die *Toll-like* Rezeptoren vermittelt.

In Säugetieren sind heute dreizehn strukturell verschiedene *Toll-like* Rezeptoren bekannt, die pathogene Mikroorganismen anhand von Oberflächenstrukturen erkennen können [41]. Pathogene Mikroorganismen tragen genetisch hoch konservierte Strukturen. Diese nennen sich *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und besitzen wichtige Eigenschaften, die sie als optimale Ziele zur Erkennung durch das angeborene Immunsystem auszeichnen. PAMPs innerhalb einer Klasse von Mikroorganismen unterscheiden sich kaum voneinander. Dies ermöglicht es dem Wirt über eine geringe Anzahl von

Rezeptoren möglichst viele Mikroorganismen zu erkennen. So kann zum Beispiel ein Rezeptor, der auf den Lipid A-Teil des Lipopolysaccharids (LPS) reagiert, fast alle gram-negativen Bakterien identifizieren. [42] PAMPs können von speziellen *pattern recognition receptors* (PRR) des Wirts erkannt werden. Diese finden sich sowohl auf professionellen Immunzellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC), als auch auf Epithelzellen. PRRs können grob in drei Klassen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bilden sezernierte PRRs wie *Ficolins* und *Pentraxins*. Sie aktivieren das Komplementsystem sowohl über den klassischen Weg als auch über den Lektin-Weg. Die zweite Gruppe bilden die transmembranösen PRRs. Dazu zählen die *Toll-like* Rezeptoren und die Familie der C-type Lectins. Die dritte Gruppe bilden die frei im Zytosol vorkommenden PRRs. Zu ihnen zählen die *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG I)-like receptors* (RLRs) und die *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat-containing receptors* (NLRs) [43].

Nach dem Erkennen eines pathogenen Organismus werden immunologische Funktionen eingeleitet. Wichtig erscheint, dass sie eine Brücke zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem schlagen und die adaptive Immunantwort einleiten. TLRs sind auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und DCs exprimiert. Oft exprimieren die ortsständigen DCs ein individuelles Repertoire an TLRs, welches genau auf die Bedürfnisse des Organs zugeschnitten ist. In DCs des Magen-Darm-Traktes findet sich beispielsweise eine erhöhte Expression von TLR5. TLR5 erkennt das Flagellin bestimmter darm-pathogener Keime [44]. Allerdings findet man TLRs auch auf Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten, die primär nichts mit dem Immunsystem zu tun haben [45]. Somit muss den TLRs eine weitere Aufgabe zukommen. Es gibt Hinweise darauf, dass *Toll-like* Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Gewebemöostase sowie in der Wiederherstellung und dem Erhalt der Epithelbarriere spielen. Dazu nehmen sie Einfluss auf Migration und Proliferation der beteiligten Epithelzellen und Fibroblasten [46]. Möglich wird dies dadurch, dass TLRs ebenfalls körpereigene Moleküle erkennen können, die normalerweise nicht frei vorkommen und nur bei Verletzungen, Gewebeuntergang und bei sterilen Entzündungsprozessen freigesetzt werden. Diese körpereigenen Aktivatoren der PRRs werden analog zu den PAMPs, *damage associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet.

Beispiele dieser DAMPs sind HSPs [47-53], *high mobility group box-1* (HMGB1) [54, 55], Harnsäure Kristalle [56, 57], *surfactant protein A* [58] und Proteine der

Extrazellulären Matrix wie Fibronectin [59], Heparansulfate [60] und Hyaluron [61, 62]. [63]

So kann eine Entzündungsreaktion, TLR-vermittelt, zu Proliferation und Migration in Epithelzellen führen, um den Epithelschaden schnell zu schließen.

Aufgebaut ist der *Toll-like* Rezeptor aus einem Typ-1-Transmembranprotein mit einer extrazellulären, *N-terminal leucin-rich repeat* (LRR) Domäne und einer intrazellulären Toll/IL-1R (TIR) Domäne [64]. Nach Aktivierung der TLRs durch PAMPs oder DAMPs setzt eine Signalkaskade ein, die über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) zur Bildung proinflammatorischer Zytokine führt. Dabei kann man einen MyD88-abhängigen Signalweg, der zur Bildung proinflammatorischer Zytokine und einen TRIF-abhängigen Signalweg, der sowohl zur Bildung proinflammatorischer Zytokine als auch zur Bildung von Typ-1 Interferon führt, unterscheiden. TLR3 wählt einen TRIF-abhängigen Signalweg. TLR4 kann beide Wege beschreiten. Die übrigen TLRs wählen den MyD88-abhängigen Signalweg. [65-67] Als Übersicht über die verschiedenen TLRs und ihre Adaptermoleküle dient Tabelle 3.

Somit sind die TLRs neben den anderen PRRs die erste Verteidigungslinie unseres Immunsystems und nehmen die wichtige Aufgabe wahr, Infektionen zu erkennen, erste Immunreaktionen einzuleiten und die Brücke zur adaptiven Immunantwort zu schlagen. [68] Nachdem hohe Expressionsraten verschiedener TLRs auch in verschiedenen Malignomen nachgewiesen werden konnten, ist es naheliegend, ihre Bedeutung im Zusammenhang mit Proliferation und Migration genauer zu untersuchen. [69]

	Ligand (PAMP)	Lokalisation	Adaptermolekül
TLR1	Triacyl-Lipoproteine	Zelloberfläche	MAL/MyD88
TLR2	Peptidoglykane, Pilze, virale Glykoproteine, Lipoproteine	Zelloberfläche	MAL/MyD88
TLR3	dsRNA	Endosom	TRIF
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS), RS-Virus	Zelloberfläche	MAL/MyD88 and TRAM/TRIF
TLR5	Flagellin	Zelloberfläche	MyD88
TLR6	Diacyllipoproteine	Zelloberfläche	MAL/MyD88
TLR7	ssRNA	Endosom	MAL/MyD88
TLR8	ssRNA	Endosom	MAL/MyD88
TLR9	DNA (viral oder bakteriell)	Endosom	MAL/MyD88
TLR10	Unklar	unklar	unklar
TLR11	<i>Toxoplasma gondii</i> (Profilin)	PBMC	MAL/MyD88
TLR12	<i>Toxoplasma gondii</i> (Profilin)	DCs	MAL/MyD88
TLR13	<i>bacterial ribosomal</i> RNA, Viren [70, 71]	Endosom	MyD88/TAK1

Tabelle 3: TLR-Rezeptoren mit zugehörigen PAMPs, ihrer Lokalisation und ihren Adaptermolekülen [72, 73]

1.5.2 Toll-like Rezeptoren und ihre Bedeutung im Kolon- und Pankreas-karzinom

Die positive Korrelation von Inflammation und Remission einer malignen Erkrankung wurde erstmals durch Coley beschrieben [63, 74]. Heute ist diese Beziehung gut bekannt und wird seit längerem schon erfolgreich in der Krebstherapie angewandt. Ein gutes Beispiel für diese Beziehung ist die Verwendung von *Mykobakterium Bovis Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) in der Therapie des Blasenkarzinoms [75].

Im Gegensatz dazu stellte Rudolf Virchow eine positive Korrelation zwischen chronischer Entzündung und der Entstehung einer Neoplasie her [76]. An Beispielen wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Leberzirrhose, humanen Papillomviren, Hepatitis-C-Viren und *Helicobacter pylori* wurde dieser Zusammenhang mittlerweile deutlich. So entwickeln sich Tumore beispielsweise aus chronisch bakteriellen und viralen Entzündungsgeschehen im Magen-Darm-Trakt und der Leber. Inflammationsantworten üben somit pro- und auch anti-tumorigene Wirkungen auf ein Tumorgeschehen aus. [77, 78]

Neben der Bedeutung der *Toll-like* Rezeptoren bei der Abwehr von Infektionen wurden ihnen wichtige Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und der Regulierung von Reparatur- und Entzündungsprozessen zugewiesen [79-81]. Durch diesen Einfluss der TLRs wird der beschriebene Zusammenhang zwischen maligner Entartung und Entzündung deutlich. Dabei gibt es Hinweise auf anti-Tumor Effekte als auch auf eine Förderung von Karzinogenese und Tumorprogression durch die TLRs.

1.5.2.1 Anti-Tumor Effekte der TLRs

Die anti-Tumor Effekte der TLRs konnten an vielen Studien nachgewiesen werden. Dabei spielen verschiedene TLR-Agonisten eine entscheidende Rolle. Als Agonisten mit anti-Tumor Effekt wurden für TLR2/4 zum Beispiel OM-174 [82-84] und BCG identifiziert. Die Wirkung von BCG wird erfolgreich bei der Therapie des Blasenkarzinoms angewandt. Imiquimod ist ein TLR7 Agonist und wird in der Therapie des Basalzellkarzinoms eingesetzt [85]. Die genauen molekularen Ereignisse, die zu diesem Erfolg führen, sind noch nicht alle aufgeklärt. Jedoch scheint der TLR2/4-Signalweg über die Produktion von

TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) die Einwanderung, Reifung und Antigenpräsentation von DCs zu fördern und auch die Gefäßstruktur des Tumors zu zerstören [82]. So ist es möglich, die etablierte Toleranz zwischen Karzinom und Immunsystem des Wirts zu beenden, die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zu unterbrechen und den Tumor zugänglicher für eine Chemotherapie zu machen. [63, 82] Auch wurde die unmittelbare Einleitung von Apoptose in TLR3-positiven humanen Brustkrebszellen mit einem TLR3-Agonist (synthetische dsDNA) nachgewiesen [86].

1.5.2.2 Einfluss der TLRs auf Karzinogenese und Tumorprogression

Tumorwachstum, verminderte Apoptose und erhöhte Metastasierungsneigung wurde in verschiedenen Tiermodellen mit dem TLR-Signalweg in Zusammenhang gebracht. Die Injektion von LPS in tumortragenden Mäusen führte zu erhöhten Raten an Lungenmetastasen [87, 88]. Ähnliche Effekte von LPS beobachtete man an Mäusen, denen das CT26-Kolonkarzinom injiziert wurde [89]. Auch an einem zweiten Mausmodell wurde die Beziehung zwischen chronischer Entzündung und Karzinogenese mit dem TLR4-Signalweg in Verbindung gebracht. Es wurde gezeigt, dass im Vergleich zum Wildtyp TLR4-negative Mäuse nach Induktion eines CED-assoziierten Karzinoms mit Azoxmethane kleinere und eine geringere Anzahl von Tumoren aufwiesen. Im Anschluss wurde eine Überexpression von TLR4 in den Tumorgewebeproben aus CED-Patienten nachgewiesen [90].

Auch im Pankreaskarzinom besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von TLR7 und TLR8 und Tumorwachstum. Dies wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* festgestellt. Darüber hinaus waren Pankreaskarzinomzellen, die mit TLR7 und TLR8 Agonisten behandelt wurden, deutlich chemotherapieresistenter als unbehandelte Zellen. [91] Heute sind TLRs in den verschiedensten Tumorzelllinien und Normalgeweben nachgewiesen [92]. Denkbar ist in diesem Zusammenhang, dass Tumorzellen die TLRs dazu nutzen, um in ihrem Tumormikromilieu verschiedene DAMPs zu erkennen, und sich damit, wie auch schon bei der Wundheilung beschrieben, mit Wachstumsfaktoren und zytoprotektiven Signalen zu versorgen. Ebenso ist es denkbar, dass sich die TLR-positive Karzinomzellen über immunsuppressive Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und dem

transforming growth factor- β (TGF- β) der Vernichtung durch das Immunsystem entziehen [92, 93].

Damit kann auch die Familie der *Toll-like* Rezeptoren als eine mögliche Zielstruktur einer individualisierten Tumorthherapie definiert werden, um Karzinome erfolgreicher bekämpfen zu können.

1.6 Chemotherapieresistenz in Krebszellen und die Theorie der Krebsstammzellen

Die Theorie der Krebsstammzellen kann zusammen mit der MDR (engl. *multiple drug resistance*; MDR) eine Erklärung für das Phänomen der Chemotherapieresistenz geben und steht in den letzten Jahren immer mehr im Fokus des Interesses. Es erfolgte der Nachweis von verschiedensten Formen der Chemotherapieresistenz bei Krebsstammzellen. Hierzu zählen unter anderem die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH)-Aktivität, der *B-cell lymphoma-2* (BCL2)-Mechanismus und die ABC-Transporter [94]. Die Theorie der Krebsstammzellen besagt, dass die Zell-Population innerhalb einer Malignität bezüglich ihrer tumorinitiierenden und wachstumsfördernden Potenz nicht einheitlich ist und es Subpopulationen gibt, die hauptsächlich für diese Eigenschaften verantwortlich erscheinen. Diese Subpopulationen werden als Krebsstammzellen (engl. *cancer stem cells*; CSC) bezeichnet und bringen weitere Subpopulationen hervor, die zwar verschiedene Eigenschaften aufweisen können, jedoch nicht im gleichen Maße über die extensive Proliferations-Potenz verfügen [95, 96].

In soliden Tumoren zeigten Hamburger und Salomon schon 1977, dass nur ein kleiner Teil der Zellpopulation in der Lage war, neue Kolonien zu bilden [97]. Al-Hajj *et al.* identifizierten $ESA^+CD44^+CD24^{-/low}$ -Brustkrebszellen, die deutlich besser als andere Brustkrebszellen in der Lage waren, in NOD/SCID-Mäusen neue Tumoren zu initiieren [98]. Es folgte die Identifizierung weiterer CSC in soliden Tumoren aus Lunge, Leber, Pankreas, Kolon, Ovar, Prostata und Gehirn. Wichtige Oberflächenmarker wie CD133 [16], EpCAM und CD90 wurden neben phänotypischen Eigenschaften wie die Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität und *side population* (SP) beschrieben [94].

Hermann *et al.* wiesen nach, dass CD133 im Pankreaskarzinom als ein Marker für erhöhte Metastasierungsneigung und Tumorwachstum gilt. Auch für das kolorektale Karzinom wurde CD133 als Marker für Tumorstammzellen etabliert [99, 100]. Frank *et al.* konnten am malignen Melanom zeigen, dass ABCB5 CD133⁺ Krebsstammzellen markiert [16]. Die Koexpression von ABC-Transportern und Stammzellmarkern beschrieben auch Chaudhary *et al.* [101] und Zhou *et al.* [102]. Dies erhärtet die Vermutung, dass Krebsstammzellen über ihre Eigenschaft zur Tumorigenese und Tumorwachstum hinaus auch Systeme besitzen, die sie für bisherige Tumorthérapien unzugänglich machen und somit auch für Rezidive und Therapieversagen verantwortlich sind.

Krebsstammzellen sind heute zunehmend Objekt mannigfaltiger Forschungs- und Therapieansätze. Sie eröffnen ein neues Feld im Kampf gegen Krebs und erwecken Hoffnung auf neue Therapieprinzipien.

1.7 Nährstoffmangelbedingungen in soliden Tumoren

Ein veränderter Zellmetabolismus ist, wie Hanahan und Weinberg im Jahr 2011 diskutierten, ein wichtiges Kennzeichen in der Biologie der Tumorzelle (*hallmarks of cancer*) [103]. Die Autoren ergänzten somit im Jahr 2011 die ursprünglichen sechs Charakteristika um zwei weitere potenzielle Merkmale. Eines davon war der veränderte Zellmetabolismus. Das andere Merkmal war die Fähigkeit von Tumorzellen sich der Immunantwort zu entziehen.

Der veränderte Zellmetabolismus der Krebszellen führt zu einem deutlich gesteigerten Verbrauch von Glukose. Somit ist eine ausreichende Nährstoffzufuhr für Wachstum und Proliferation der Krebszelle essenziell. Schon 1927 wurde der gesteigerte Glukoseverbrauch von Krebszellen durch Otto Warburg beschrieben. Er ist unter dem Warburg-Effekt bekannt [104]. Die Milchsäuregärung findet sich neben den stark proliferierenden Krebszellen auch in embryonalen Geweben, obwohl durch die Milchsäuregärung viel weniger ATP gewonnen werden kann. Potter vermutete bereits 1958, dass die bei der Milchsäuregärung anfallenden Stoffwechselprodukte wieder in die Synthese verschiedener, für den anabolen Stoffwechsel notwendigen Stoffgruppen eingeschleust werden [105, 106].

So können proliferierende Zellen ihren Bedarf an Nucleinsäuren, Aminosäuren und anderen Substanzen decken und die Ausgangssubstanzen (z.B. Fette) werden dabei nicht wie bei dem vollständigen Abbau im Citratzyklus in Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser (H₂O) abgebaut. Krebszellen sind also eher durch einen anabolen Stoffwechsel geprägt. Sie befinden sich ständig in unkontrollierter Proliferation und haben ihren Stoffwechsel an diese Bedürfnisse angepasst [107]. Dieser exzessive Stoffwechsel bedarf einer stetigen und ausreichenden Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff. In soliden Tumoren ist dies jedoch nicht immer gegeben. Dies führt regelmäßig zu Hypoxie, Nährstoffentzug, Azidose, oxidativem Stress, Nekrose und schließlich auch zu chronischer Entzündung. Dazu kommt die Akkumulation von Toxinen und irregulär gefalteten Proteinen. Weiterhin besteht einen Mangel an Wachstumsfaktoren und nicht zuletzt die Exposition durch Chemotherapeutika. Nährstoffentzug und andere Stressoren sind somit in Tumorzellen allgegenwärtig. Ein unkontrollierter Nährstoffentzug triggert die Expression hoch konservierter Mechanismen in einer Vielzahl von Lebewesen und Zellen. Diese Mechanismen betreffen verschiedene Signalkaskaden, insbesondere aber den IGF-1-Rezeptor und seine untergeordneten Kaskaden. Dies konnte an Bakterien, Hefen, Mäusen und auch an humanen Krebszellen nachgewiesen werden [108]. In *Escherichia coli* führt eine Unterversorgung an Kohlehydraten zu einer Expressionssteigerung von *heat shock* Proteinen (HSPs), welche das Bakterium resistenter gegen Hitze macht [109]. In Mäusen wurde eine Abhängigkeit zwischen Nährstoffentzug, IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) Aktivierung und Chemotherapieresistenz dargestellt. Lee *et al.* zeigten, dass Mäuse nach einer Fastenzeit deutlich resistenter gegen Chemotherapie waren. Diese Resistenz ist durch eine hohe Expression von ILGFBP-1 (*Insulin-like growth factor-binding Protein 1*) und eine niedrige Expression von IGF-1 charakterisiert [110]. Daraus stellt sich die Frage, ob durch einen Nährstoffentzug solche Anpassungsmechanismen gefördert werden können oder ob angepasste Zellen selektioniert werden.

Es gibt mehrere Hinweise, dass CD133⁺ Krebsstammzellen resistenter gegenüber einem Nährstoffentzug sind. Flavahan *et al.* wies an Glioblastom-Zellen nach, dass eine Minderversorgung mit Glukose zu einem erhöhten Nachweis des Stammzellmarkers CD133 führt [111]. Über ähnliche Ergebnisse berichteten andere Arbeitsgruppen [112]. Sie untersuchten den Einfluss von Nährstoffentzug und milder Hypoxie auf Pankreaskarzinomzellen. Darunter befand sich auch das im Weiteren untersuchte MIA PaCa-2-

Pankreaskarzinom. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften eine Hypoxie deutlich besser überleben und dass die Tumorzellmigration gefördert wird. Nährstoffentzug zusammen mit anderen Begleitfaktoren wie ein Sauerstoffmangel scheint ein häufiges Merkmal im Mikromilieu eines wachsenden Tumors zu sein. Dieser kann auslösend für Veränderungen im Zellmetabolismus sein und einen Selektionsvorteil für Tumorzellen und insbesondere für solche mit Stammzeleigenschaften innerhalb eines proliferierenden Tumors darstellen.

Zusammenfassend untersucht die vorliegende Arbeit den Einfluss von Nährstoffentzug auf das Expressionsmuster von *Toll-like* Rezeptoren, *heat shock* Proteinen und ABC-Transporter Proteinen im Kolon- und Pankreaskarzinom. Veränderungen des Expressionsverhaltens wurden sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene analysiert. Zudem wurden die antiproliferativen Effekte des Nährstoffentzuges auf die Tumorzellen, das heißt die Wachstumsinhibition von Kolon- und Pankreaskarzinomzellen durch Nährstoffentzug, mittels Proliferationsassay betrachtet. Daraus leiten sich nachfolgende Fragestellungen ab.

2 Fragestellungen

1. Hemmt Nährstoffentzug die Proliferation von Kolonkarzinomzellen *in vitro*?
2. Ist in Kolonkarzinomzellen unter Nährstoffentzug ein verändertes Expressionsverhalten von kodierenden Reparaturgenen für die *heat shock* Proteine nachweisbar?
3. Zeigt sich nach zellulärem Stress von Kolonkarzinomzellen durch Nährstoffentzug ein verändertes Genexpressionsmuster auch für andere charakteristische Signalvorgänge wie den *multiple drug resistance* (ABC) Genen sowie für inflammatorische Signalprozesse wie die *Toll-like* Rezeptoren?
4. Ist ein verändertes Genexpressionsverhalten der untersuchten Reparaturgene, Gene für den Substrattransport aus der Tumorzelle und für inflammatorische Signalprozesse auch in anderen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom vergleichbar nachweisbar?
5. Welche Bedeutung können die nachgewiesenen Veränderungen in Kolon- und Pankreaskarzinomzellen unter Nährstoffentzug für die Klinik haben und welche Schlussfolgerungen wären daraus für den Tumorpatienten zu ziehen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Dynatech Eliser-reader MRX	DYNEX Technologies (Chantilly, USA)
Akku- Pipette „accu-jet“	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, Deutschland)
CO ₂ -Brutschrank „Hera-Cell“	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Elektrophoresesystem “X-Cell SureLock Mini-Cell”	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
Röntgenkassette	Dr. Goos-Suprema GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Laborgefrierschrank (-20 °C)	Phillip-Kirsch GmbH (Offenburg, Deutschland)
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG (Schwabach, Deutschland)
Kühlschrank „Profi Line“	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riss, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Mikroskop „BX51“	Olympus Europa GmbH (Hamburg, Deutschland)
Hämozytometer nach Neubauer	HBG Henneberg-Sander GmbH (Giessen-Lützellinden, Deutschland)
PCR Arbeitsplatz	C.B.S. Scientific Company (San Diego, USA)
Pipetten “Eppendorf research”	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Real-time Cyler “DNA Engine Opticon 2”	GMI Inc. (Ramsey, USA)
Spectrophotometer “NanoDrop2000c”	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Sterilwerkbank „Hera-Save“	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Thermocycler “Mastercycler gradient”	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Tischkühlzentrifuge “Biofuge fresco”	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Vortexer „L46“	GLW mbh (Würzburg, Deutschland)
CytoSpin® 4 Zytocentrifuge	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Ultratiefemperaturkühlschrank TKS (-80 °C)	Thalheimer Kühlung GmbH+Co (Ellwangen, Deutschland)

Tabelle 4: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
PCR TW 8-tube strip, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
flat optical 8-cap strip, farblos	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
save seal tube 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Röntgenfilm „Super RX“ 18x24	FUJIFILM Europe GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseigel „NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gel“ 10 well, 1,5 mm, 4-12 %	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwich, 0,2 µm pore size, 8,5 x 13.5 cm	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen „SaveSael-Tips professional“ 1 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Gewebekulturflasche, 250 ml, 75 mm ² , mit Filter	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Amplitude PCR reaction strips, 8 x 0,2 ml	Simport Scientific (Beloeil, Canada)

Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Herstellerangaben

3.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Wasserstoffperoxid	Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland)
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Antibody Diluent, Background Reducing	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tablette	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
SIGMAFAST™ 3,3-Diaminobenzidin tablets	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DNA/RNA/Protein Isolierung „TRIzol®“	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Enzyme free cell dissociation solution	Merck Millipore (Billerica, MA)

Bezeichnung	Hersteller
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
HiMark Prestained High Molecular Weight Protein Standard	Life Technologies (Carlsbad, CA)
Glycergel®, Mounting Medium, Aqueous	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Glycogen	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Magermilchpulver	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
Hämalaun nach Mayer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Nonident P-40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
NuPAGE Antioxidant	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
NuPage LDS Sample Buffer	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
NuPAGE LDS Sample Buffer	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
NuPAGE Sample Reducing Agent	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
NuPAGE Transfer Buffer	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
OptiMEM	Life Technologies GmbH, Invitrogen™ (Darmstadt, Deutschland)
phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> ; PBS)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Peroxidase aus Meerrettich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Ponceau S 0,1 % (w/v) in 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Bradford-Reagenz Roti®-Quant	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trisaminomethane hydrochloride (Tris-HCL)	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Trypsin/EDTA	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Tween 20	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Wasser für Molekularbiologie	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben

3.1.4 Fertigansätze

Bezeichnung	Hersteller
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega GmbH (Mannheim, Germany)
Chemolumineszenz-Kit „SuperSignal“ (=ECL-Reagenz)	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
ImProm-II Reverse Transcription System	Promega GmbH (Mannheim, Germany)
MESA Green qPCR™ Mastermix plus for SYBR®	EUROGENTEC S.A. (Seraing, Belgium)
DUALXtract Total Membrane Protein Extraction Kit	Dualsystems Biotech AG (Schlieren, Germany)

Tabelle 7: Verwendete Fertigansätze mit Herstellerangaben

3.1.5 Primer

Primer	Bezeichnung	Hersteller
ABCB5	Hs_ABCB5_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH, (Düsseldorf, Deutschland)
Beta-Aktin	Hs_ACTB_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
CD133	Hs_PROM1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
GapDH	Hs_GAPDH_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
HSP70	Hs_HSPBP1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
HSP90	Hs_HSP90AA1_3_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
MDR1	Hs_ABCB1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR1	Hs_TLR1_2_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR2	Hs_TLR2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR3	Hs_TLR3_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR4	Hs_TLR4_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR5	Hs_TLR5_2_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR6	Hs_TLR6_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Primer	Bezeichnung	Hersteller
TLR7	Hs_TLR7_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR8	Hs_TLR8_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR9	Hs_TLR9_1_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
TLR10	Hs_TLR10_10_SG QuantiTect Primer Assay	QUIAGEN GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Tabelle 8: Verwendete Primer mit Herstellerangaben

3.1.6 Antikörper

Antigen	Art	Wirt	Produktnummer	Hersteller
GapDH	mAK	Maus	ab8245	abcam® plc (Cambridge, UK)
HSP90	mAK	Maus	ab1429	abcam® plc (Cambridge, UK)
TLR6	pAK	Ratte	ab62569	abcam® plc (Cambridge, UK)

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper mit Herstellerangaben

Antigen	Art	Wirt	Kopplung	Hersteller
Maus	pAK	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ratte	mAK	Maus	HRP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper mit Herstellerangaben

3.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe und Erstbeschreibung
HT29 (ATCC-HTB-38)	humanes kolorektales Adenokarzinom [113]
PANC-1 (ATCC-CRL-1469)	humanes duktales Pankreaskarzinom [114]
MIA PaCa-2 (ATCC-CRL-1420)	humanes undifferenziertes Pankreas-karzinom [115]

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien mit Ursprungsgewebe und Erstbeschreibung

3.1.8 Kulturmedien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
DMEM-Dulbecco's Modified Eagle Medium	ATCC-LGC (Wesel, Deutschland)
McCoy 5A Medium	ATCC-LGC (Wesel, Deutschland)
PFHM-II Protein-free Hybridoma Medium (liquid)	Life Technologies GmbH, Gibco® (Darmstadt, Deutschland)
Fetal bovine serum (FBS)	Live Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Horse Serum	ATCC-LGC (Wesel, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies GmbH, Gibco® (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 12: Verwendete Kulturmedien und Zusätze mit Herstellerangaben

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur und Versuchsaufbau

Jede Zelllinie wurde einem Nährstoffmangel unterzogen. Dazu wurden die Zelllinien in zwei verschiedenen zusammengesetzten Nährstoffmangelmedien (Proben) und einem Standardmedium (Kontrolle) kultiviert. Als Proben wurden serumfreies Medium und ein Hybridoma Medium gewählt. Das gewählte Hybridoma Medium (PFHM II) gilt als serumfreies und proteinfreies Medium. Beide Nährstoffmangelmedien enthalten die gleiche Menge an Glucose (3000 mg/l). Als Kontrolle (Standardmedium) wurde für jede Zelllinie das nach Herstellerangaben empfohlene Medium mit allen Zusätzen verwandt.

Dieses Standardmedium wird mit fetalem Kälberserum (engl. *fetal bovine serum*; FBS) und im Falle der MIA PaCa-2-Zelllinie auch mit Pferdeserum versetzt. Einem Medium ohne Serum (serumfreies Medium) fehlt dieser Zusatz und gilt als Nährstoffmangelmedium. Dabei wurde für jede Zelllinie das nach Herstellerangaben empfohlene Medium mit allen Zusätzen verwendet und lediglich das oben genannte Serum nicht zugegeben. Als zweites Mangelmedium wurde für alle Zelllinien ein Hybridoma Medium (PFHM-II) gewählt. Tabelle 15 veranschaulicht die Wahl und Zusammensetzung der Medien.

	HT29	PANC-1	MIA PaCa-2
Standard Medium	McCoy Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin 10 % Kälberserum	McCoy Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin 10 % Kälberserum	McCoy Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin 10 % Kälberserum 2,5 % Pferdeserum
Serumfreies Medium	McCoy Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin	McCoy Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin	McCoy Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin
Hybridoma Medium	PFHM-II Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin	PFHM-II Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin	PFHM-II Medium 1 % Penicillin/ Streptomycin

Tabelle 13: Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien nach Zelllinie

Um die Reaktion der Gene auch im zeitlichen Verlauf auflösen zu können, wurde eine Zeitkinetik eingeführt. Die Zellen wurden in den oben beschriebenen Medien (Kontrolle und Proben) für 24 h, 48 h oder 72 h kultiviert und anschließend geerntet, um sie weiteren Analysen zuzuführen.

Jede Zelllinie wurden in vier 75 ml Zellkulturflaschen mit entsprechendem Standardmedium ausgesät und bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid im Brutschrank kultiviert. Beim Erreichen einer Konfluenz von 60 % bis 70 % wurden die Zellen aus den vier Zellkulturflaschen auf zehn neue 75 ml Kulturflaschen gesplittet und weitere 24 h im Brutschrank kultiviert. Danach wurde der Wechsel auf die verschiedenen Nährstoffbedingungen vollzogen. Dazu wurde in drei von zehn Kulturflaschen auf PFHM-II-Medium und in weiteren drei Flaschen auf das zelllinienspezifische serumfreie Medium gewechselt. Bei den letzten vier Flaschen wurde zelllinienspezifisches Standardmedium eingesetzt. Mit der verbleibenden Kulturflasche (die vierte Flasche des Standardmediums) wurde die Zellkultur fortgeführt. Nun lagen für jede Zelllinie und jede Nährstoffkonzentration jeweils drei 75 ml Zellkulturflaschen vor.

Eine dieser drei Kulturflaschen wurde nach 24 h, eine nach 48 h und die letzte nach 72 h zur RNA-Isolierung und zur Isolierung von Proteinen verwendet. Abbildung 2 veranschaulicht die Zellkultur beispielhaft an einem Arbeitsprozess.

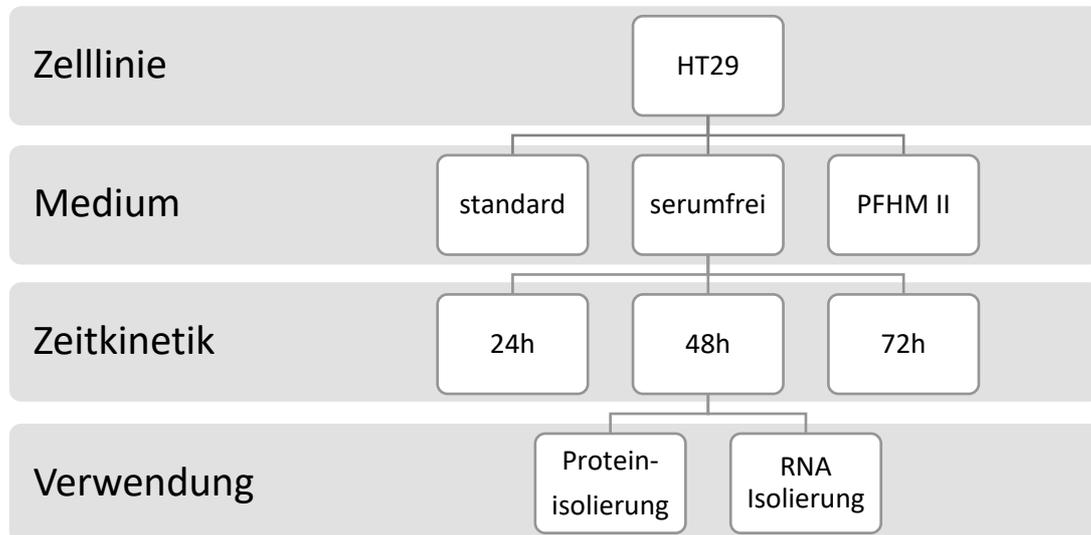


Abbildung 3: Flussdiagramm der Zellkulturen

Die Abbildung zeigt ein Flussdiagramm zur Organisation der Zellkulturen. Dabei wurde am Beispiel der HT29-Zellkultur ein Arbeitsablauf vollständig gezeigt.

Zur weiteren Verarbeitung wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate-buffered saline*; PBS) gewaschen. Nach Zugabe von weiteren 10 ml PBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit 40 ml PBS aufgefüllt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Davon waren 1 ml für die RNA-Isolierung und 4 ml für die Proteinisolierung bestimmt. Das Material wurde dazu auf zwei 15 ml Röhrchen aufgeteilt, mit PBS gelöst und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet für die RNA-Isolierung wurde mit 500 μ l Trizol gelöst, in ein 1,5 ml-UV-cap überführt und auf Eis kalt gehalten. Das zweite Pellet wurde mit dem DUALXtract Total Membrane Protein Extraction Kit aufgearbeitet.

3.2.2 Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR)

Zur Untersuchung der Gene auf RNA-Ebene wurden RTq-PCRs an allen Zelllinien unter jeder Nährstoffkonzentration durchgeführt. Dabei wurden die TLRs eins bis zehn, das Glykoprotein CD133, die *heat shock* Proteine HSP70 und HSP90 und die ABC-Transporter MDR1 und ABCB5 untersucht. Es war notwendig, die mRNA aus den Zellen zu isolieren, diese in cDNA umzuschreiben, um zum Schluss die Menge der entstandenen cDNA zu vermessen.

3.2.2.1 Isolierung von mRNA mit TRIzol

Das von Chomczynski P. und Sacchi N. im Jahr 1987 vorgestellte Verfahren der RNA-Isolierung mittels Trizol ermöglicht in kurzer Zeit aus kleinen Probenmengen RNA zu isolieren [116]. Nach Auflösen der Zellen mit 500 μ l Trizol wurde sofort 200 μ l Chloroform zugegeben, die Probe gevortext und bei +4 °C über 16 min bei 14800 x g zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde zum Ausfällen der RNA in ein zweites UV-cap mit 500 μ l vorgelegtem Isopropanol überführt. Um auch bei geringeren RNA-Mengen ein gut sichtbares Pellet zur Verfügung zu haben, wurden dem Isopropanol zuvor 4 μ g Glykogen beigefügt. Die Probe wurde gevortext und bei +4 °C über 16 min bei 14800 x g zentrifugiert. Isopropanol wurde abgenommen, das Pellet in 70 % Ethanol gelöst und weitere 10 min bei +4 °C und 14800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 50 μ l molekularbiologisch reinem Wasser bei 56 °C gelöst. Die RNA wurde spektrometrisch mit dem NanoDrop2000c vermessen.

3.2.2.2 *Synthese der cDNA*

Um mit der isolierten mRNA einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren, wurden RNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet. Diese Systeme finden sich auch in viralen Genomen. 1970 entdeckten David Baltimore, Renato Dulbecco und Howard Martin Temin unabhängig voneinander die virale reverse Transkriptase (RT) und erhielten 1975 dafür den Nobelpreis für Physiologie. Für diese Versuche wurde das ImProm-II™-Revers Transkription System von Promega benutzt und folgender Ansatz für die cDNA-Herstellung herangezogen:

- 4 μl ImProm-II™ 5X Reaction Buffer
- 1,2 μl MgCl_2
- 1 μl Random Primer
- 1 μl ImProm-II™ Reverse Transkriptase
- 1 μl dNTP Mix
- 0,2 μl Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor
- 1 μg RNA in 11.6 μl molekularbiologisch reines Wasser

Der *Master-Mix* wurde in einem PCR-*cap* angesetzt. Nach Zufügen der entsprechenden RNA-Menge wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die cDNA wurde in dem Mastercycler® Gradient der Firma Eppendorf synthetisiert. Dabei wurden die in Tabelle 14 angegebenen Parameter verwendet.

Temperatur	Dauer
25 °C	5 min
42 °C	60 min
70 °C	15 min

Tabelle 14: Zyklusparameter der cDNA-Synthese

Die synthetisierte cDNA wurde spektrometrisch mit dem NanoDrop2000c vermessen und es wurde anschließend eine Arbeitsverdünnung von 50 ng cDNA auf 1 µl hergestellt.

3.2.2.3 Real Time quantitative PCR (RTq-PCR)

Die RTq-PCR ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung eines kurzen, definierten DNA-Abschnitts. Über dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*; PCR) hinaus ist zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Die Vervielfältigung der gesuchten Sequenz wird mit Hilfe von spezifischen *Primer*-Paaren für den codogenen und nicht-codogenen Strang ermöglicht. Pro Zyklus verdoppelt sich die Menge an gewonnener DNA, so dass es insgesamt zu einem logarithmischen Anstieg der DNA-Menge kommt. Nach jedem Zyklus wird die DNA-Menge über eine Fluoreszenz-Messung bestimmt, wobei die Fluoreszenz proportional zur DNA-Menge ansteigt. Die Quantifizierung der DNA durch Fluoreszenz gelingt über interkalierende Farbstoffe, die sobald sie sich an doppelsträngige DNA anlagern, ihre Fluoreszenz erhöhen. Ab einem gewissen Zyklus beginnt somit die Fluoreszenz logarithmisch zu steigen. Dieser Zeitpunkt wird im Folgenden als Ct-Wert (engl. *cycle threshold*; Ct) beschrieben. Der Ct-Wert gibt an, ab welchem Zyklus der RT-PCR ein logarithmisches Ansteigen der Fluoreszenz zu beobachten ist.

Je mehr RNA zu Beginn der Vervielfältigung vorliegt, desto früher ist der logarithmische Anstieg der Fluoreszenz zu erwarten und umso kleiner ist der gemessene Ct-Wert. Eine hohe Expression des Gens und somit eine große Menge an isolierter und zu Beginn der Amplifikation vorliegender RNA führt in der RT-PCR-Analyse zu niedrigen Ct-Werten. Zur Durchführung wurde der MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay der Firma Eurogenetic herangezogen. Um die Expression der zu untersuchenden Gene zu bestimmen, wurden *Primer* der *Toll-like* Rezeptoren eins bis zehn, *CD133-Primer*, *MDR1-Primer*, *ABCB5-Primer*, *HSP70-Primer* und *HSP90-Primer* bestellt. Als Referenzgene (engl. *housekeeping genes*) wurden *GapDH* und *Beta-Aktin* geordert.

Folgender Versuchsansatz mit einem totalen Volumen von 25 µl wurde angewandt:

- 12,5 µl MESA GREEN qPCR MasterMix Plus
- 8 µl molekularbiologisch reines Wasser
- 2 µl cDNA (50 ng/µl)
- 2,5 µl 10fach verdünnter Primer

Alle RTq-PCRs wurden mit dem Real-Time Cycler DNA Engine Opticon durchgeführt. Nach einem ersten Zyklus mit einem Denaturierungsschritt über 15 min bei 95 °C, einer Hybridisierungs-Phase von 30 Sekunden bei 65 °C und einer Polymerisationphase von 30 Sekunden bei 72 °C folgten weitere 39 Zyklen. In jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz der Probe gemessen.

39 Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95 °C	15 s
Hybridisierung	65 °C	30 s
Polymerisation	72 °C	30 s

Tabelle 15: Zyklusparameter der RTq-PCR

Um die Spezifität der *Primer* zu bestätigen, wurden die Schmelzkurven aller *Primer* analysiert. Dadurch kann bestimmt werden, ob die benutzten *Primer* nur die Gene ablesen und amplifizierten die untersucht werden sollten. Eine unspezifische *Primer*-Bindung würde bedeuten, dass auch andere Gene als die zu untersuchenden Gene amplifiziert werden und somit ein falsch niedriger Ct-Wert gemessen wird. In allen Fällen konnte eine spezifische *Primer*-Bindung nachgewiesen werden. Um eine hohe Genauigkeit der Versuche zu erreichen, wurde die Expression jedes Gens dreimal analysiert. Aus den drei gewonnenen CT-Werten wurde ein Mittelwert gebildet (MW(Ct)). Eine Signifikanzrechnung war bei drei Messungen nicht sinnvoll.

3.2.2.4 Analyse der Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung

Zur weiteren Analyse der Ergebnisse wurde die Methode der relativen Quantifizierung angewandt. Dazu wurde die mittlere Expression der Zielgene ($MW(Ct)^{ziel}$) in den Proben (serumfreies Medium und Hybridoma Medium) mit der mittleren Expression der Zielgene ($MW(Ct)^{ziel}$) in der Kontrolle (Standardmedium) verglichen. So konnte verfolgt werden, wie sich die Expression der Zielgene in den Proben im Vergleich zu der Expression in der Kontrolle verhält. Für das Verfahren der relativen Quantifizierung ist darüber hinaus eine interne Kontrolle notwendig. Dadurch wird die mittlere Expression des Zielgens ($MW(Ct)^{ziel}$) in Relation zur mittleren Expression eines Referenzgens ($MW(Ct)^{ref}$) gesetzt. Letztere gilt als Vergleichsgröße, die unabhängig von den meisten Versuchsbedingungen ist. So kann die Betrachtung von Expressionsänderungen zwischen dem Zielgen in den behandelten Proben und der Kontrolle von eventuell auftretenden Veränderungen im Rahmen der Probenbehandlung bereinigt werden.

Als Referenzgene wurden GapDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und *Beta*-Aktin ausgewählt. Beide Referenzgene sind in der Literatur bekannt und etabliert. Allerdings muss erwähnt werden, dass auch diese Referenzgene in ihrer Expression gewissen Schwankungen unterliegen. [117-119] GapDH ist ein sehr wichtiges Enzym der Glycolyse. Es katalysiert die Reaktion zwischen Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat und ist damit für einen geregelten Zellstoffwechsel essenziell.

Beta-Aktin (β -Aktin) ist ein hoch konserviertes Strukturprotein des Zytoskeletts und ebenfalls für eine geregelte Zellfunktion notwendig. Beide Gene sind für einen funktionierenden Zellstoffwechsel unabdingbar und werden unter den meisten Versuchsbedingungen konstant exprimiert.

Um für jede Zelllinie das optimale Referenzgen zu bestimmen, wurde die Expression von GapDH und *Beta*-Aktin für jede Versuchsbedingung in drei Einzelmessungen bestimmt. Der Mittelwert der Expression ($MW(Ct)^{ref}$) wurde ermittelt und die Standardabweichung berechnet. Schließlich wurde das Referenzgen mit der geringsten Standardabweichung als am geeignetsten bewertet (vgl. Kapitel 4.1.1). Um die gemessene gemittelte Expression der Zielgene ($MW(Ct)^{ziel}$) von eventuellen Veränderungen im Zellstoffwechsel zu bereinigen, wurde die Menge des zu untersuchenden Zielgens ($MW(Ct)^{ziel}$) ins Verhältnis

zur Menge des zu untersuchenden Referenzgens ($MW(Ct)^{ref}$) gesetzt. Dazu wurde die gemittelte Expression des Referenzgens ($MW(Ct)^{ref}$) von der gemittelten Expression des Zielgens ($MW(Ct)^{ziel}$) subtrahiert. Diese Differenz (ΔCt^{ziel}) gibt an, in welchem Verhältnis die Expression des Zielgens zur Expression des Referenzgens steht.

$$\Delta Ct^{ziel} = MW(Ct)^{ziel} - MW(Ct)^{ref}$$

Es gilt herauszufinden, ob sich das Verhältnis (ΔCt^{ziel}) zwischen Probe (ΔCt^{ziel_probe}) und Kontrolle ($\Delta Ct^{ziel_kontrolle}$) ändert. Eine Änderung würde bedeuten, dass das untersuchte Zielgen in der Probe im Vergleich zum untersuchten Zielgen in der Kontrolle mehr oder weniger exprimiert wurde. Somit werden die Werte der Proben (ΔCt^{ziel_probe}) vom serumfreien Medium ($\Delta Ct^{ziel_serumfrei}$) und Hybridoma Medium ($\Delta Ct^{ziel_hybridoma}$) in das Verhältnis zum Standardmedium ($\Delta Ct^{ziel_kontrolle}$) gesetzt. Dazu werden folgende Differenzen gebildet:

$$\Delta \Delta Ct^{ziel_serumfrei} = \Delta Ct^{ziel_serumfrei} - \Delta Ct^{ziel_kontrolle}$$

$$\Delta \Delta Ct^{ziel_hybridoma} = \Delta Ct^{ziel_hybridoma} - \Delta Ct^{ziel_kontrolle}$$

Aus den $\Delta \Delta Ct$ -Werten kann über folgende Formel die *relative expression ratio* (R) des entsprechenden Untersuchungstages berechnet werden:

$$relative\ expression\ ratio\ (R) = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Dabei können folgende Rückschlüsse aus der *relative expression ratio* (R) geschlossen werden:

$R < 2$	unspezifische Änderung
$2 < R < 4$	interessante Veränderung
$R > 4$	sehr interessante Expressionsänderung

Die errechnete *relative expression ratio* (R) eines Zielgens kann in allen untersuchten Zelllinien und entsprechend der Zeitkinetik nach 24 h, 48 h und 72 h betrachtet werden. Es konnte beobachtet werden, ob eine Expressionsänderung des Zielgens zwischen serumfreien oder Hybridoma Medium im Vergleich zum Standardmedium stattgefunden hat. Somit wird ersichtlich, ob ein Nährstoffentzug mit einer Expressionsänderung korreliert. Zusätzlich kann die untersuchte Expressionsänderung über die Zeitkinetik auch nach 24 h, 48 h und 72 h untersucht werden. In dritter Ebene kann das unterschiedliche Verhalten der drei untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Die im Ergebnissteil gezeigten Diagramme führen für jede Zelllinie die Zielgene auf, in welchen es zu einer Expressionssteigerung gekommen ist.

3.2.3 Western Blot

Um Proteine direkt nachweisen zu können, ist das im Jahr 1979 von George R. Stark entwickelte Verfahren des Western Blots eine gängige und sichere Methode [120]. Dazu ist es notwendig, die Proteine zu isolieren, sie nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, auf einer Folie zu fixieren und sie anschließend durch eine spezifische Färbung sichtbar zu machen.

3.2.3.1 Proteinisolierung

Die zu untersuchenden Proteine liegen innerhalb der Zelle in verschiedenen Kompartimenten vor. Der *multidrug resistance 1* (MDR1)-Transporter, der *ATP-binding cassette sub-family B member 5* (ABCB5)-Transporter, das Glykoprotein CD133 sowie die *Toll-like* Rezeptoren TLR1, TLR 2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 sind integrale Bestandteile der äußeren Zellmembran. Die *Toll-like* Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind integrale Bestandteile endosomaler Membranen, während die *heat shock* Proteine HSP70 und HSP90 im Zytoplasma oder innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums vorliegen.

Um eine effiziente Isolierung der zu untersuchenden Proteine zu gewährleisten, wurde das DUALXtract Total Membrane Protein Extraction Kit, welches zytoplasmatische und membranständige Proteine getrennt isoliert, eingesetzt. Das gewonnene Zellpellet wurde in 3 ml kalter *cell wash solution* resuspendiert, gevortext und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml kaltem *cell permeabilization buffer* aufgenommen, in ein 1,5 ml *cap* überführt und dort für 10 min bei +4 °C auf dem Lyserad inkubiert. Die Probe wurde nun für 15 min bei +4 °C mit 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand entsprach der Cytoplasmafraktion und wurde in ein neues 1,5 ml *cap* überführt. Das zurückgebliebene Pellet wurde mit 500 µl kaltem *membrane protein extraction buffer* aufgenommen, 30 min bei +4 °C auf dem Lyserad inkubiert und anschließend für 15 min bei +4 °C mit 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand entsprach der Membranfraktion und wurde in ein zweites 1,5 ml *cap* überführt.

3.2.3.2 Bradford-Proteinbestimmung

Die Protein-Lösungen wurden mittels eines Bradford-Tests vermessen. Dazu wurde das Bradford-Reagenz Roti®-Quant benutzt und nach Herstellerangaben verwendet. Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode, um Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bindet im sauren Milieu mit Proteinen Komplexe aus.

Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm. Dabei korreliert die Intensität der Färbung direkt mit der zu messenden Proteinkonzentration. Die Extinktion wurde mit dem NanoDrop2000c erfasst. Um genau messen zu können, ist die Erstellung einer Kalibrierungsgerade notwendig. Nach Angaben des Herstellers wurden fünf Verdünnungen der Stammlösung nach Bradford vermessen und eine Kalibrierungsgerade erstellt. Nun wurden die Proteinproben gegen die Referenzlösung vermessen und anhand der Kalibrierungsgerade die Proteinkonzentration bestimmt.

Probe	Blank
160 μ l Bradford Reagenz (1:5)	160 μ l Bradford Reagenz
39 μ l Aquadest	39 μ l Aquadest
1 μ l Probe	1 μ l Lysepuffer

Tabelle 16: Bradford-Reaktionsansatz für Probe und Blank

3.2.3.3 *Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamitgelelektrophorese (SDS-Page)*

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamitgelelektrophorese (SDS-Page) ist eine molekularbiologische Methode, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. SDS überdeckt dabei die unterschiedlichen Proteinladungen durch seine eigene negative Ladung. So gelingt eine ladungsunabhängige Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das XCell SureLock™ Mini-Cell System von Invitrogen™ verwendet. Als Gel-Matrix wurden NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels (10 Taschen, 1,5 mm, 4-12 %) herangezogen. Die Elektrophorese-Kammer wurde nach Herstellerangaben aufgebaut, das Gel eingesetzt und die Kammer mit *MOPS Running Buffer* in einer Verdünnung von 1:20 mit destilliertem Wasser und 500 μ l Antioxidant befüllt. Die Proteinproben wurden nach dem NuPage® Novex® Bis-Tris Mini Gels Protokoll aufgearbeitet (vgl. Tabelle 17: SDS-Page Probenansatz). Es wurde pro Tasche eine Proteinmenge von 8,26 μ g für die zytoplasmatischen Proteine und 2,05 μ g für die membranständigen Proteine eingesetzt.

Reagenz	Menge
Probe	X μ l
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	2,5 μ l
NuPAGE® Reducing Agent (10x)	1 μ l
deionisiertes Wasser	ad 6.5 μ l
totales Volumen	10 μ l

Tabelle 17: SDS-Page Probenansatz

Jede Tasche wurde mit einem totalen Probevolumen von 10 μ l beladen. Als Proteinstandard wurde MagicMark™ XP Western Protein Standard der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet. Über die ersten 50 min wurde eine Spannung von 200 V bei einer Stromstärke von 113 mA und über die letzten 10 min eine Spannung von 200 V bei einer Stromstärke von 70 mA angelegt.

3.2.3.4 *Western Blot*

Um die separierten Proteine weiteren Analysen zugänglich zu machen, wurden sie mit Hilfe des von H. Tobwin entwickelten Verfahrens auf ein Nitrozellulosegel übertragen [121]. Hierfür wurde erneut das XCell SureLock™ Mini-Cell System von Invitrogen™ verwendet. Für den Transfer Buffer wurden 850 ml destilliertes Wasser mit 100 ml Methanol und 50 ml NuPAGE® Transfer Buffer gemischt.

Das Gel wurde aus der Verschaltung entfernt und mit der Nitrozellulose nach Herstellerangaben in die Blot-Kammer geladen. Danach erfolgte die Befüllung der Blott-Kammer mit *transfer buffer*. Die äußere Kammer wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Daran wurde über eine Stunde hinweg eine Spannung von 30 V bei 170 mA angelegt.

Die Nitrozellulose-Membran wurde entnommen und zum Nachweis des erfolgreichen Proteintransfers mit Ponceau Lösung gefärbt. Die Markerbanden wurden markiert, es wurde ein Foto zur Dokumentation erstellt (nicht gezeigt) und die Nitrozellulose wieder mit PBS-Tween entfärbt. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % (m/v) Magermilchpulver in PBST auf dem Schütter inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen.

3.2.3.5 Immundetektion

Um die nach molekularem Gewicht aufgetrennten und auf Nitrozellulose übertragenen Proteine sichtbar zu machen und zu quantifizieren, wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion benutzt. Es kommt dabei zu einer spezifischen Bindung zwischen Primärantikörper und seinem Epitop auf dem Antigen. Das Antigen stellt hier das zu untersuchende Protein da. An die *Fc*-Region des Primärantikörpers wurde der Sekundärantikörper gebunden. Dieser ermöglicht über eine an ihn gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*; HRP) die Detektion und Quantifizierung. Die HRP katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion, die mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann. Die Primär-Antikörper wurden in 5 % (m/v) Magermilchpulver in PBST in folgendem Verhältnis zu einem *Primer*-Ansatz verdünnt.

Antigen	Graft	Konzentration
HSP90	Maus	1:200
GapDH	Maus	1:0000

Tabelle 18: Verwendete Primer mit Verdünnungen

Nun wurde die Nitrozellulose-Membran mit dem entsprechenden *Primer*-Ansatz in Plastikfolien eingeschweißt und entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei +4 °C

auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulose dreimal für 10 min in PBS-Tween gewaschen. Der Sekundär-Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 mit 5 % Magermilch verdünnt. Die Nitrozellulose wurde mit dem Sekundärantikörper-Ansatz entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und danach dreimal für 10 min in PBS gewaschen.

Für die Chemolumineszenzreaktion kam das SuperSignal® West-Pico Chemolumineszenz-Kit der Firma Thermo-Scientific zum Einsatz. Die Nitrozellulose wurde nach Herstellerangabe 5 min in der ECL-Lösung inkubiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm in der Dunkelkammer durch die Nitrozellulose belichtet

3.2.4 Immunhistochemie und Zytospins

Die Methode dient zur Bestätigung der RTq-PCR Ergebnisse auf Proteinebene. Die zu untersuchenden Zellen werden mittels einer Zentrifuge auf einem Objektträger fixiert und die Zielproteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion dargestellt. Dazu wurden die kultivierten Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml *enzyme free cell dissociation solution* 10 min im Brutschrank inkubiert.

Nach Zugabe von 9 ml PBS wurde die Zellsuspension in einem 15 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml PBS resuspendiert, die Zellen wurden in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt und es wurde eine Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen pro Milliliter hergestellt. Jeder Objektträger wurde mit 50 μ l Zellsuspension beladen und in die Halterung der Zytozentrifuge eingespannt. Danach wurde 1 min mit 550 rpm zentrifugiert, die Objektträger beschriftet und anschließend für eine Stunde trocknen gelassen. Dann folgte die immunhistochemische Färbung. Dazu wurden die Präparate 10 min in kaltem Aceton fixiert und danach weitere 10 min trocknen gelassen. Daraufhin wurden sie drei Mal in PBS gewaschen, für 5 min in 0,3 % Wasserstoffperoxid geblockt und erneut drei Mal in PBS gewaschen. Nun wurde der Primärantikörper in dem *antibody dilutend* der Firma Dako verdünnt (1:500) und pro Präparat 50 μ l der Antikörperverdünnung aufgetragen.

Die Zytospins wurden über Nacht bei +4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie wieder drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer

Verdünnung von Sekundärantikörper und *antibody dilutend* (1:1000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS wurde eine Tablette DAB und eine Tablette Peroxidase in einem Milliliter Wasser gelöst und 50 μl dieser Lösung auf jeden Zytospin pipettiert. Nach 8-10 min Inkubation wurde wieder mit PBS gewaschen und die Kerne wurden mit Hämalaun nach Angaben des Herstellers gegengefärbt. Zum Schluss folgte die Eindeckung des Präparates mit Glycergel der Firma Dako.

3.2.5 Proliferationsassay

Um die metabolische Aktivität der Zellen unter Nährstoffentzug zu untersuchen, wurde für HT29-Zellen unter allen Nährstoffbedingungen nach 24 h, 48 h und 72 h ein MTS-Test durchgeführt. Dabei wird das Tetrazolium-Salz MTS in Gegenwart von PMS (phenazine ethosulfate) und den Dehydrogenasen der Atmungskette in ein Formazan-Produkt mit einem Absorptionsmaximum von 490 nm reduziert. Die Veränderung des Absorptionsmaximums wurde mit dem ELISA-Reader ausgelesen und gibt Aufschluss über die metabolische Aktivität und Viabilität der Zellen [122, 123].

Dabei ändert sich das Absorptionsmaximum proportional zu der Menge des Formazan-Produkts. Es kann somit nicht auf die absolute Menge der vorhandenen Zellen geschlossen werden, sondern nur auf ihre durchschnittliche metabolische Aktivität und somit auch auf ihre durchschnittliche Viabilität und Proliferation [124]. Es wurden je 100 μl einer Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen pro Milliliter in die *wells* einer 96-*well*-Platte ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und je 100 μl der verschiedenen Testmedien auf 24 *wells* eingesetzt. Auf die übrigen 22 *wells* wurde Standardmedium gegeben. Nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h wurde jedes Medium ausgewertet, wobei jeweils Achtfachbestimmungen durchgeführt wurden. Hierzu wurden 20 μl des MTS-Reagenz zugegeben und die Platte eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde sie bei 490 nm im ELISA-Reader ausgelesen. Als Referenzwert wurden die *wells* mit Standardmedium verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Real-Time-PCR

4.1.1 Auswertung der Referenzgene

Für beide Referenzgene wurde gezeigt, dass sie stabil exprimiert werden und in Kombination zu verlässlichen Normalisierungen führten [125]. Für die HT29-Karzinomzellen ergab sich die höchste Konstanz in der GapDH Expression. Die Standardabweichung aller gemessenen Werte lag für GapDH bei 1,4. Bei *beta*-Aktin lag die Standardabweichung über den gemessenen Ct-Werten bei 1,9. Anders ergab es sich bei der Analyse der Referenzgene der PANC-1 Karzinomzellen. Hier stellte sich *beta*-Aktin als das optimale Referenzgen heraus. Die Standardabweichung der gemessenen Mittelwerte bei *beta*-Aktin lag bei 1,45 und bei GapDH bei 1,5. Bei der Auswertung der Referenzgene in MIA PaCa-2 Karzinomzellen konnte ebenfalls eine konstante Expression von *beta*-Aktin festgestellt werden. Hier lag die gemessene Standardabweichung bei 1,9. Mit einer Standardabweichung von 2,5 Ct-Werten schnitt GapDH hier am schlechtesten von allen ab.

Somit wurde für HT29 Kolonkarzinomzellen das Referenzgen GapDH und für PANC-1 und MIA PaCa-2 Pankreaskarzinomzellen das Referenzgen *beta*-Aktin für die weiteren Analysen gewählt.

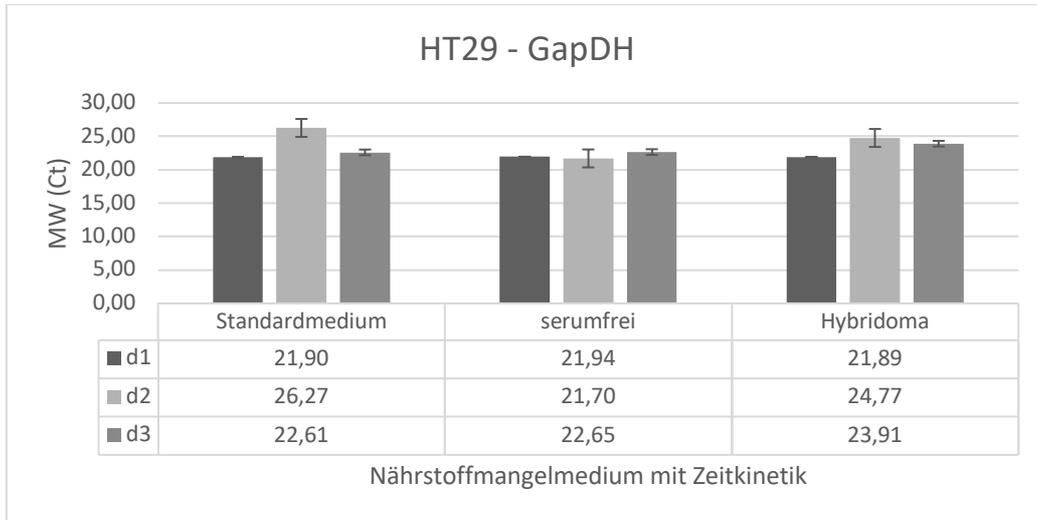


Abbildung 4: GapDH Expression in HT29 Zellen

Vergleich der Expression (Ct-Wert) des Referenzgens GapDH im HT29 Kolonkarzinom zwischen drei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen (Standardmedium, serumfreies Medium und Hybridoma Medium) jeweils nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3). Über allen gemessenen Ct-Werten ergab sich eine Standardabweichung von 0,77.

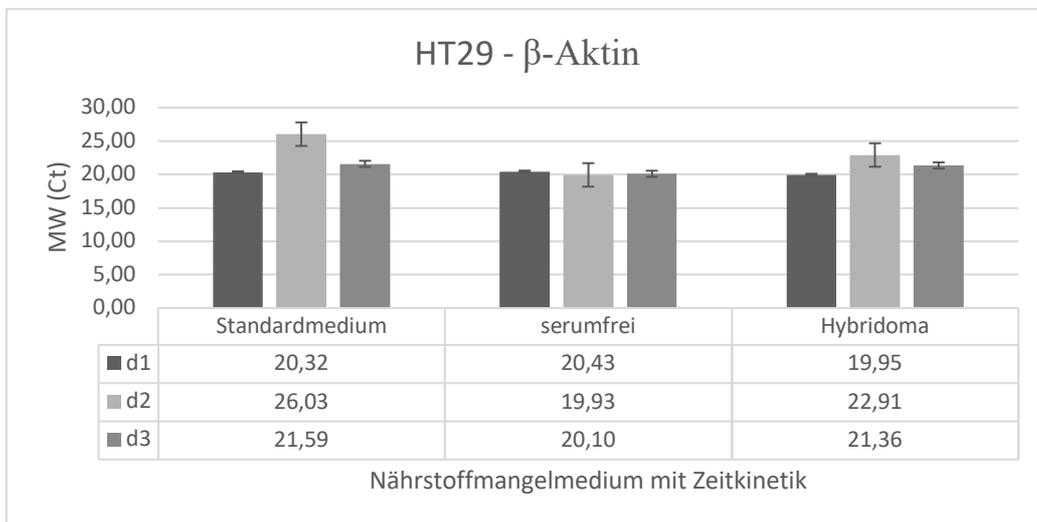


Abbildung 5: β -Aktin Expression in HT29 Zellen

Vergleich der Expression (Ct-Wert) des Referenzgens β -Aktin im HT29 Kolonkarzinom zwischen drei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen (Standardmedium, serumfreies Medium und Hybridoma Medium) jeweils nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3). Über allen gemessenen Ct-Werten ergab sich eine Standardabweichung von 2,0.

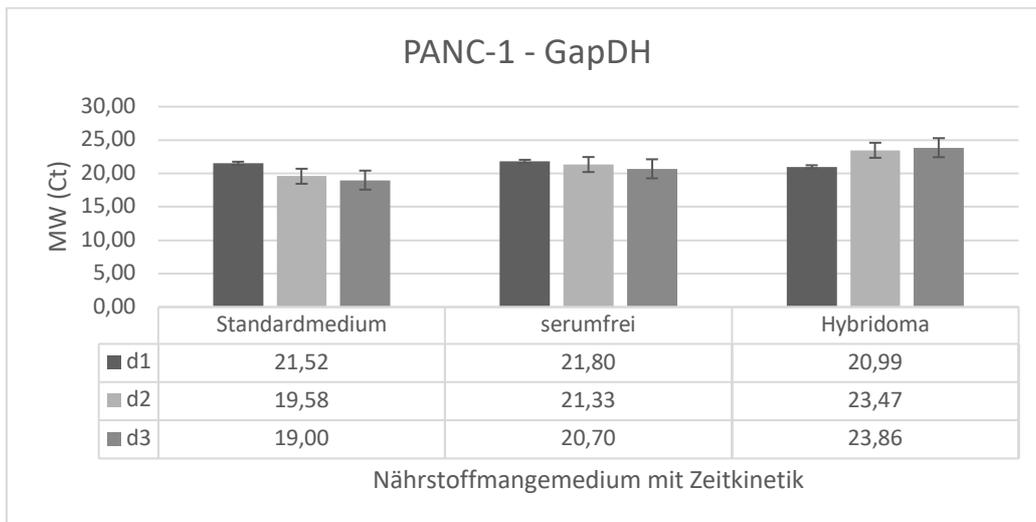


Abbildung 6: GapDH Expression in PANC-1 Zellen

Vergleich der Expression (Ct-Wert) des Referenzgens GapDH im PANC-1 Pankreaskarzinom zwischen drei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen (Standardmedium, serumfreies Medium und Hybridoma Medium) jeweils nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3). Über allen gemessenen Ct-Werten ergab sich eine Standardabweichung von 1,5.

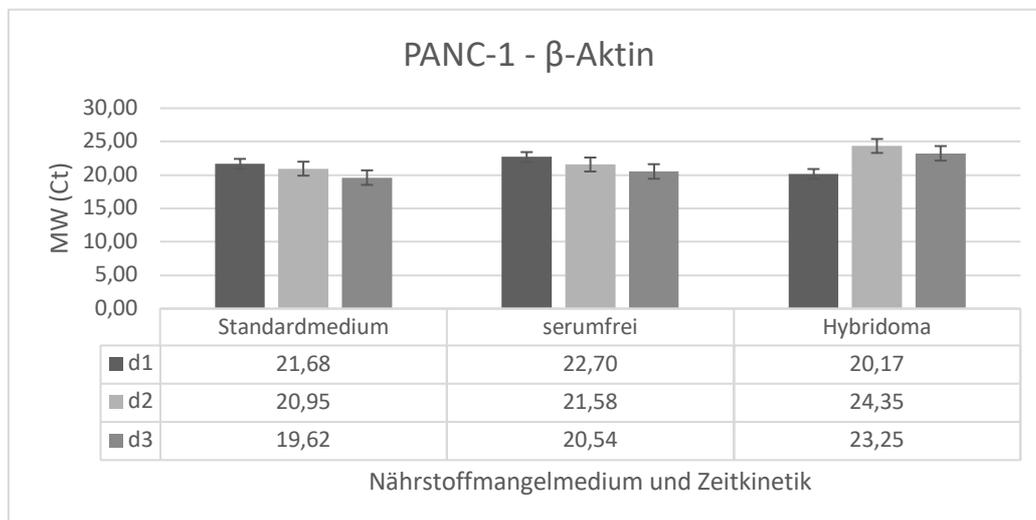


Abbildung 7: β -Aktin Expression in PANC-1 Zellen

Vergleich der Expression (Ct-Wert) des Referenzgens β -Aktin im PANC-1 Pankreaskarzinom zwischen drei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen (Standardmedium, serumfreies Medium und Hybridoma Medium) jeweils nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3). Über allen gemessenen Ct-Werten ergab sich eine Standardabweichung von 1,2.

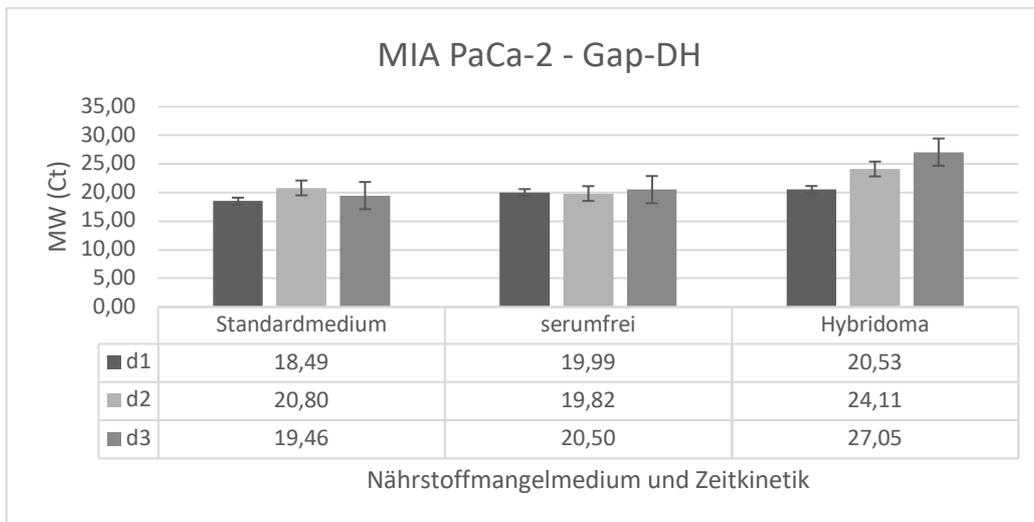


Abbildung 8: GapDH Expression in MIA PaCa-2 Zellen

Vergleich der Expression (Ct-Wert) des Referenzgens GapDH im MIA PaCa-2 Pankreaskarzinom zwischen drei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen (Standardmedium, serumfreies Medium und Hybridoma Medium) jeweils nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3). Über allen gemessenen Ct-Werten ergab sich eine Standardabweichung von 2,8.

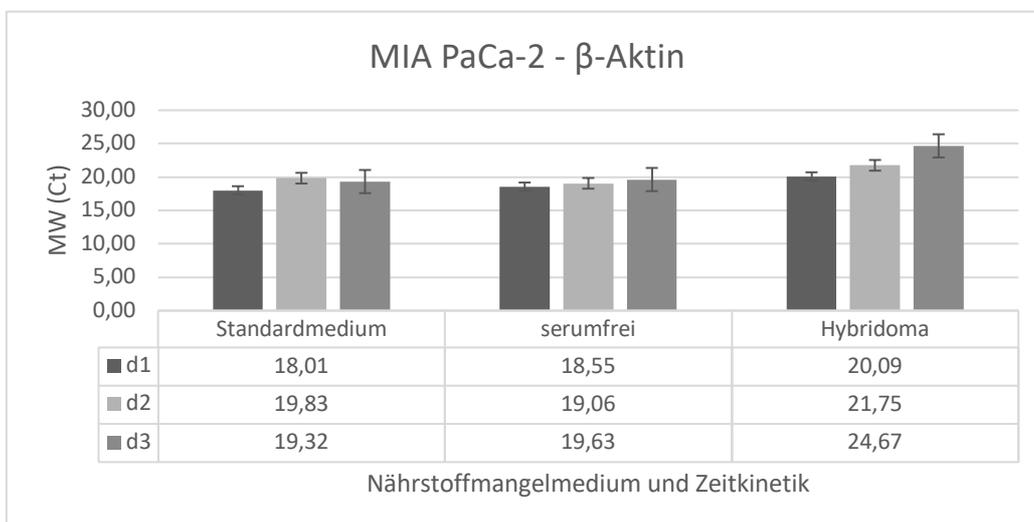


Abbildung 9: β -Aktin Expression in MIA PaCa-2 Zellen

Vergleich der Expression (Ct-Wert) des Referenzgens β -Aktin im MIA PaCa-2 Pankreaskarzinom zwischen drei unterschiedlichen Nährstoffbedingungen (Standardmedium, serumfreies Medium und Hybridoma Medium) jeweils nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3). Über allen gemessenen Ct-Werten ergab sich eine Standardabweichung von 1,9.

4.1.2 Expressionsanalysen im Kolon- und Pankreaskarzinom nach Nährstoffentzug

4.1.2.1 Expressionsanalyse im HT29-Kolonkarzinom nach Nährstoffentzug

In HT29 Tumorzellen wurde eine gesteigerte Genexpression für HSP90, MDR1, ABCB5, TLR3 und TLR4 und TLR 7, TLR8, TLR9 und TLR10 beobachtet. Dabei fiel auf, dass bei sieben der neun ausgewerteten Gene der größte Expressionsanstieg nach 24 h im Hybridoma Medium stattfand. Im serumfreien Medium wurde eine Expressionssteigerung nach 48 h beobachtet. Allerdings nicht in gleichem Umfang wie im Hybridoma Medium. Lediglich die ABCB5 Expression war im serumfreien Medium nach 48 h und bei TLR4 bereits nach 24 h deutlicher ausgeprägt als im Hybridoma Medium. Auch bei MDR1 fand sich eine gesteigerte Expression im serumfreien Medium nach 24 h. Diese blieb allerdings hinter der im Hybridoma Medium zurück. Nach 72 h zeigte sich im serumfreien und Hybridoma Medium eine rückläufige Expression.

Hitzeschockproteine

Für das Hitzeschockprotein 90 zeigte sich am zweiten Tag eine deutlich gesteigerte Expression im Hybridoma Medium. Ebenfalls wurde nach 48 h eine Expressionssteigerung im serumfreien Medium beobachtet. Diese war im Vergleich zum Hybridoma Medium geringer ausgeprägt. Nach 72 h war die Expression von HSP90 im Hybridoma Medium rückläufig, im Vergleich zur Expression nach 24 h, aber noch erhöht. Die Expression im serumfreien Medium blieb fast konstant gesteigert.

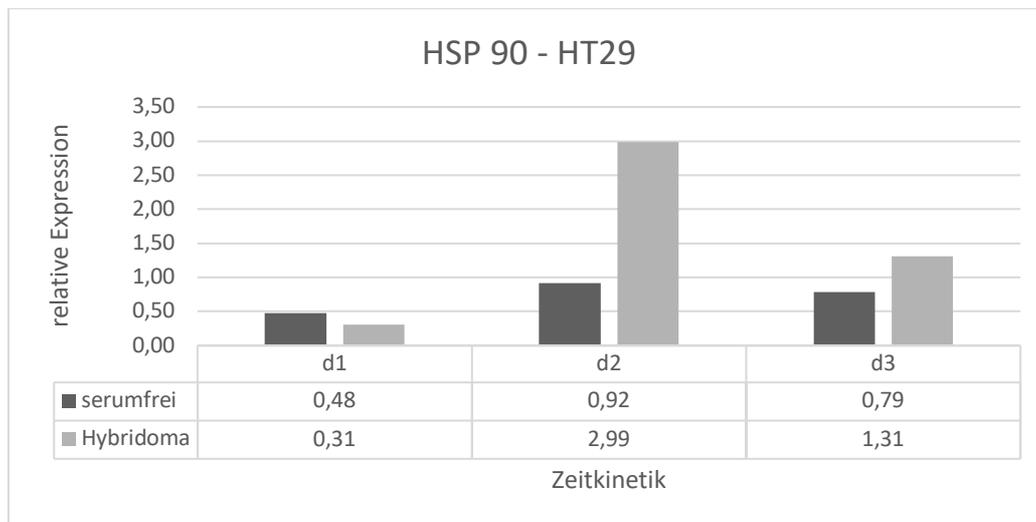


Abbildung 10: HSP90 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens HSP90 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der relativen Expression im Hybridoma Medium nach 48h. Die Expressionsveränderungen im serumfreien Medium fielen deutlich geringer aus.

ABC-Transporter

Ähnlich zu dem Hitzeschockprotein 90 zeigte sich bei den untersuchten ABC-Transportern ein Expressionsanstieg nach 48 h, der im Verlauf abflachte. Für ABCB5 wurde nach 48 h im serumfreien Medium eine deutliche Expressionssteigerung nachgewiesen. Diese war nach 72 h fast vollständig rückläufig. Im Hybridoma Medium konnte bei ABCB5 eine geringe Expressionssteigerung nach 48 h und 72 h nachgewiesen werden. Für MDR1 zeigte sich eine vergleichbare Steigerung nach 48 h im Hybridoma Medium. Auffällig war hier eine über den zeitlichen Verlauf hinweg konstant abnehmende Expression im serumfreien Medium mit initialem Maximum nach 24 h.

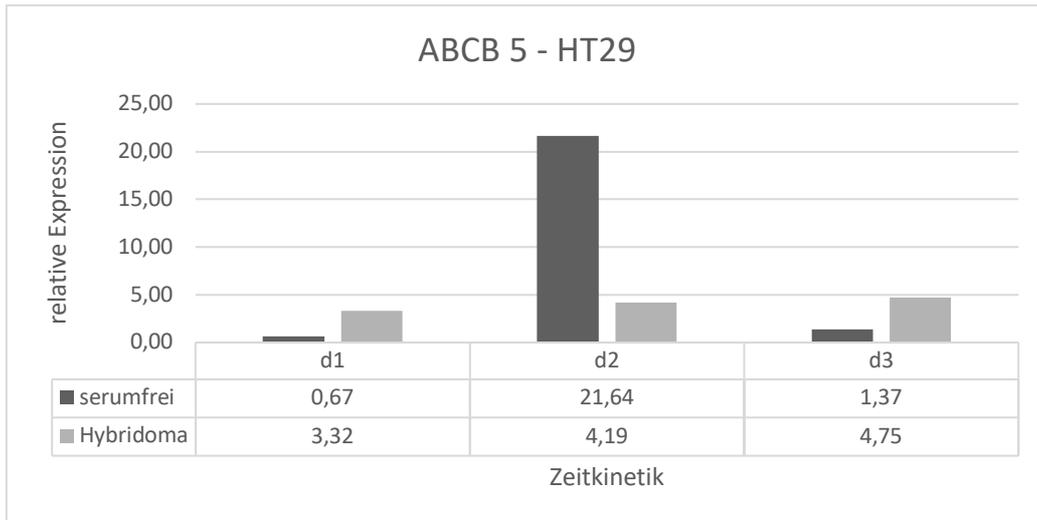


Abbildung 11: ABCB5 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens ABCB5 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Eine ausgeprägte Expressionssteigerung war nach 48h im serumfreien Medium festzustellen. Im Hybridoma Medium war diese etwas geringer ausgeprägt und zeigte Maxima nach 48h und 72h.

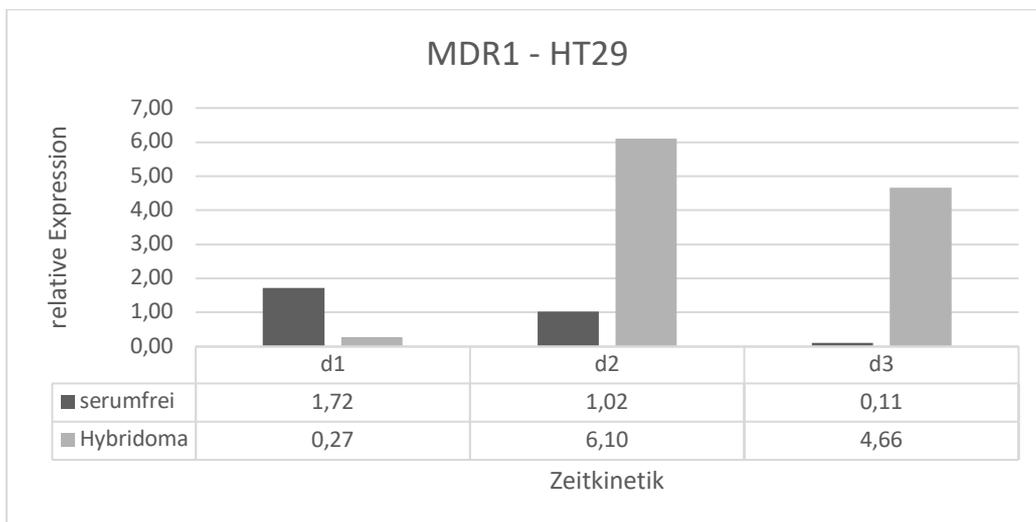


Abbildung 12: MDR1 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens MDR1 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Im Hybridoma Medium konnte eine Expressionssteigerung nach 48h verfolgt werden, die nach 72h leicht abflachte. Die Reaktionen im serumfreien Medium fielen deutlich geringer aus und nahmen nach initialem Maximum nach 24h kontinuierlich ab.

Toll-like Rezeptoren

Bei den *Toll-like* Rezeptoren (TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10) konnte wie bei dem Hitzeschockprotein 90 und den beiden ABC-Transportern eine deutliche Expressionssteigerung nach 48 h beobachtet werden. Fast immer war die Expressionssteigerung im Hybridoma Medium führend. Sie trat aber auch im serumfreien Medium auf. Bei TLR4 war sie dort deutlicher ausgeprägt und bereits nach 24 h zu beobachten. Die Expressionssteigerungen flachten in beiden Nährstoffmangelmedien nach 72 h in den meisten Ansätzen ab.

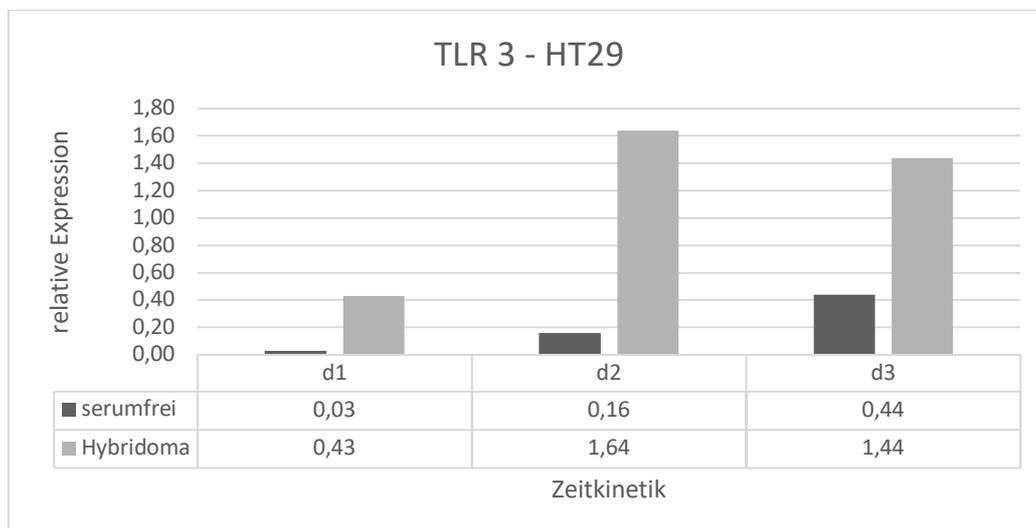


Abbildung 13: TLR3 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR3 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die maximale Expressionssteigerung erfolgte nach 48h im Hybridoma Medium. Insgesamt waren die Veränderungen in beiden Nährstoffmangelmedien jedoch nicht wegweisend

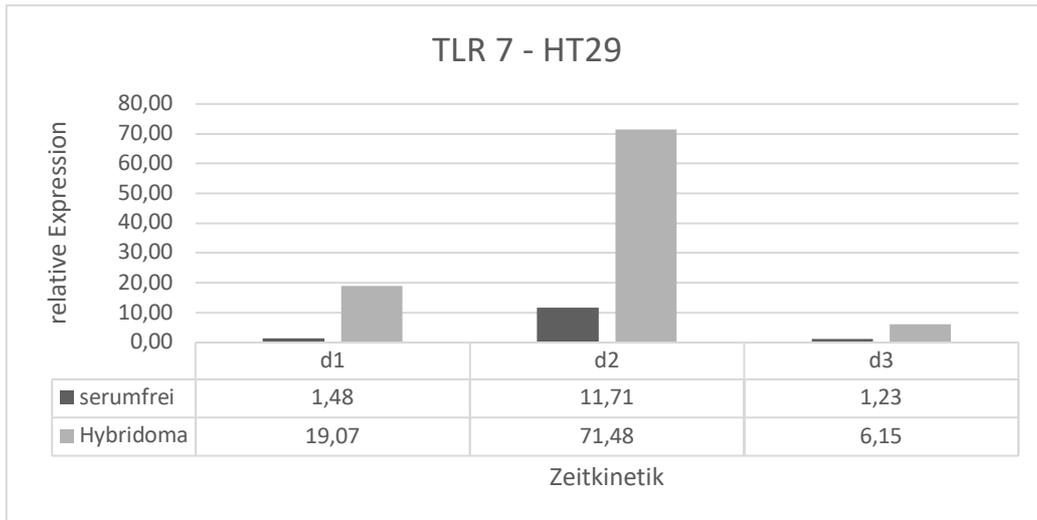


Abbildung 14: TLR7 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR7 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Nach 48h waren ausgeprägte Reaktionen im Hybridoma Medium und im serumfreien Medium zu verzeichnen. Dabei war die Expressionssteigerung im Hybridoma Medium führend. Nach 72h war die Reaktion wieder rückläufig.

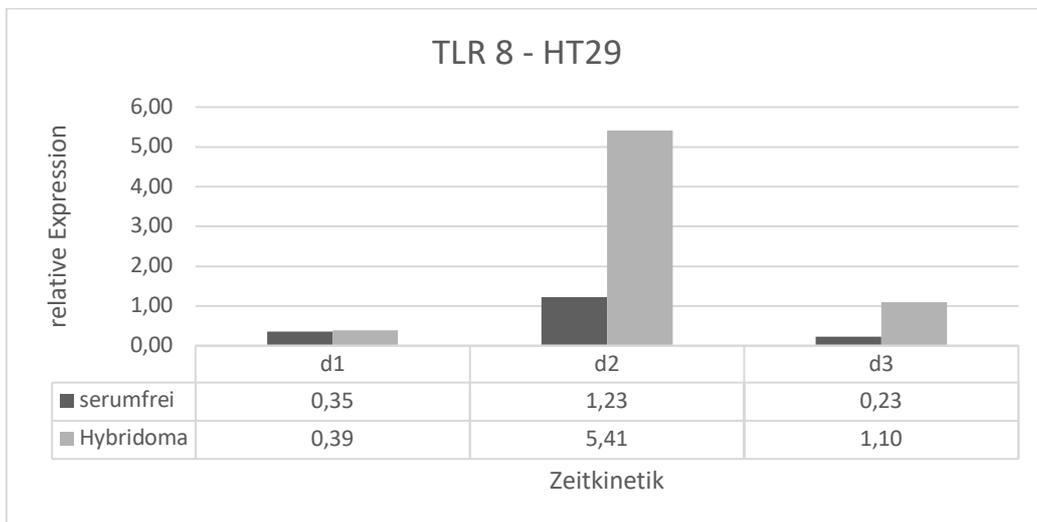


Abbildung 15: TLR8 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR8 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Analog zu den vorangegangenen Beobachtungen ist eine gesteigerte relative Expression nach 48h in beiden Kulturmedien zu beobachten. Dabei führt die Exposition mit Hybridoma Medium zur ausgeprägtesten Expressionssteigerung. Nach 72h sind rückläufige Werte zu beobachten.

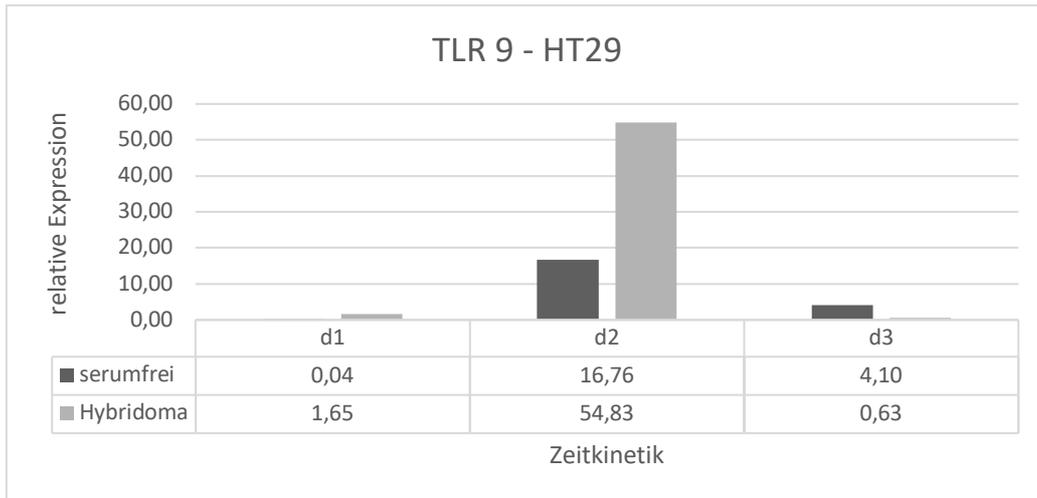


Abbildung 16: TLR9 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR9 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Analog zu den vorangegangenen Beobachtungen findet sich ein gleiches Ansprechen mit den Maxima nach 48h und einem Abfallen der relativen Expression nach 72h. Die Reaktion im Hybridoma Medium war erneut intensiver ausgeprägt.

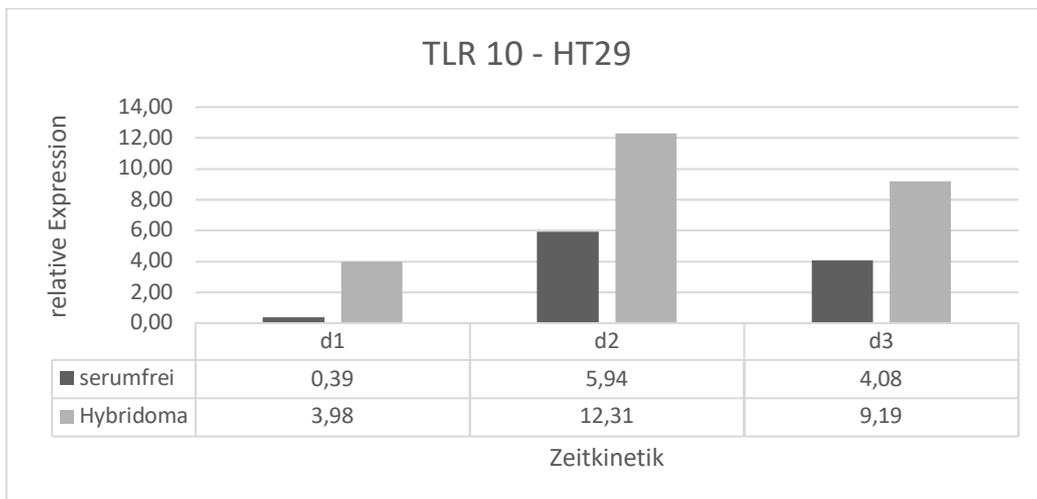


Abbildung 17: TLR10 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR10 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die Veränderungen des Gens TLR10 reihen sich ebenfalls in die vorangegangenen Beobachtungen ein. Es finden sich die Maxima nach 48h in beiden Kulturmedien, wobei die ausgeprägtesten Veränderungen im Hybridoma Medium auftreten. Nach 72h konnten wieder geringere Expressionssteigerungen beobachtet werden.

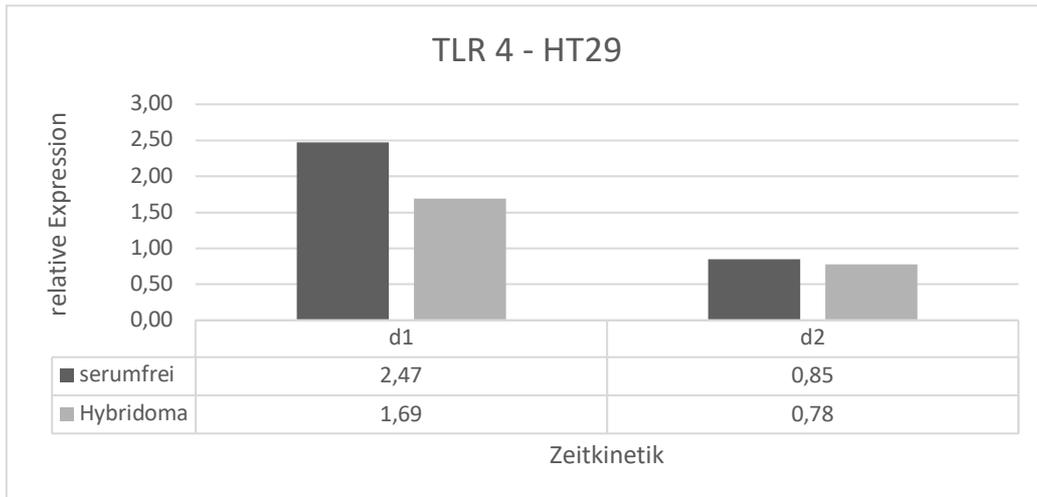


Abbildung 18: TLR4 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug

HT29 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR4 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Es wurde in beiden Medien eine geringe Zunahme der relativen Expression nach 24h beobachtet. Die setzte sich nach 48h nicht mehr fort.

4.1.2.2 Expressionsanalyse im PANC-1 Pankreaskarzinom nach Nährstoffentzug

Die Expressionsanalyse der PANC-1 Tumorzellen zeigte bei acht der untersuchten Gene einen Expressionsanstieg (TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, ABCB5, HSP70 und HSP90). Analog zu den Ergebnissen in HT29-Tumoren war die Expressionssteigerung im Hybridoma Medium führend. Dort war diese schon nach 24 h nachzuweisen. Im serumfreien Medium war die Expressionssteigerung oftmals später als im Hybridoma Medium zu beobachten. Die deutlichsten Expressionsmaxima traten erst nach 72 h auf, jedoch konnte auch nach 24 h und 48 h eine gesteigerte Expression verzeichnet werden. Die nach 72 h erhobenen Daten konnten nicht für alle Gene verwendet werden. Somit bleibt offen, ob bei diesen nicht auch eine Expressionssteigerung nach 72 h stattfand.

Hitzeschockproteine

Für HSP70 und HSP90 ergaben sich keine verwertbaren Ergebnisse nach 72 h. In beiden Fällen war die Expressionssteigerung im Hybridoma Medium nach 24 h am deutlichsten und flachte bereits nach 48 h ab. Bei HSP70 war die Expressionssteigerung nach 24h deutlich ausgeprägt. Bei HSP90 waren die Reaktionen kaum messbar. Im serumfreien Medium zeigte sich für die beiden HSPs ein geringer Anstieg nach 48 h. Hier wäre eine Beobachtung nach 72 h aufschlussreich gewesen.

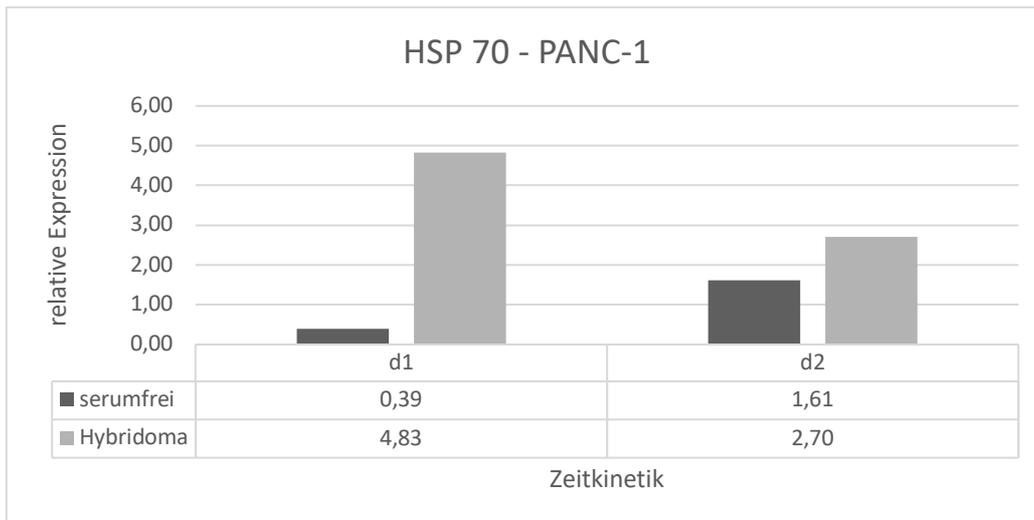


Abbildung 19: HSP70 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens HSP70 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Im Hybridoma Medium konnte eine Expressionssteigerung bereits nach 24h nachgewiesen werden. Im serumfreien Medium erfolgte die Reaktion später und deutlich geringer ausgeprägt.

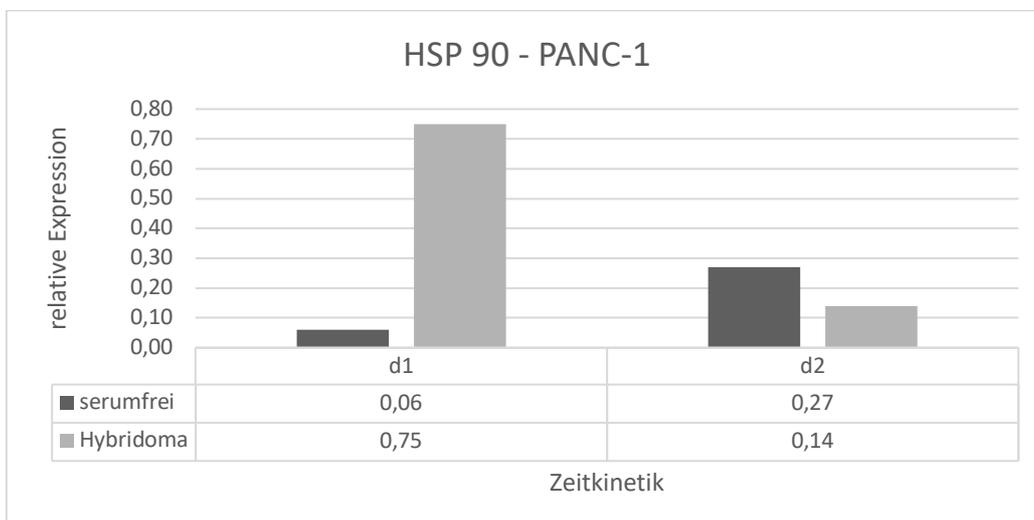


Abbildung 20: HSP90 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens HSP90 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Die Reaktionen waren insgesamt nur schwach ausgeprägt. Aufschlussreich wären verwertbare Ergebnisse nach 72 h gewesen.

ABC-Transporter

Für das Gen ABCB5 war vor allem nach 24 h, kaum jedoch nach 48 h und 72 h eine Expressionssteigerung im Hybridoma Medium nachweisbar. Im serumfreien Medium zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen.

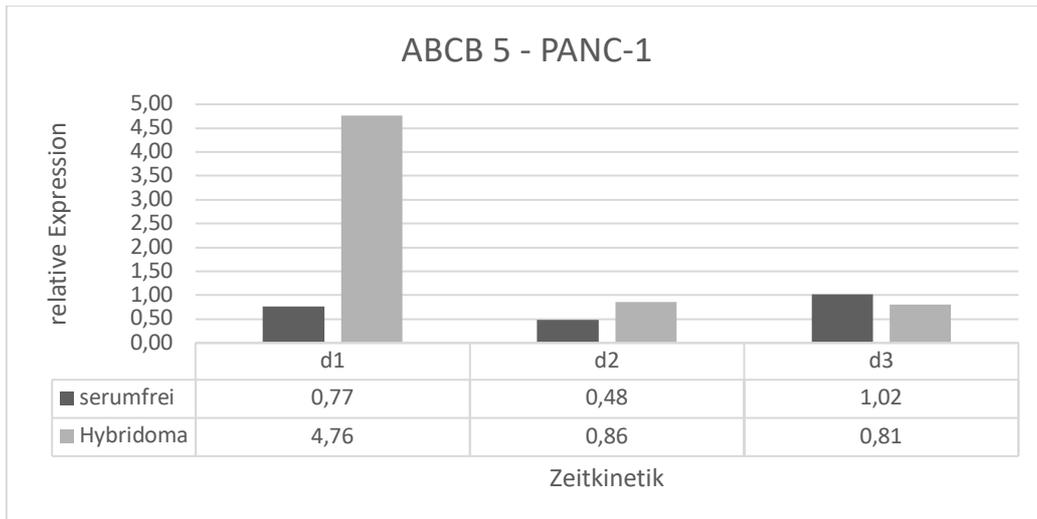


Abbildung 21: ABCB5 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens ABCB 5 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Bereits nach 24h konnte eine Steigerung der relativen Expression im Hybridoma Medium nachgewiesen werden. Nach 48h und 72h war diese nicht mehr nachverfolgbar.

Toll-like Rezeptoren

Für TLR6, TLR7, TLR9 und TLR10 waren deutliche Expressionssteigerungen nach 24 h im Hybridoma Medium zu verzeichnen. Im weiteren zeitlichen Verlauf war die Expression rückläufig. Im serumfreien Medium waren für TLR6 und TLR7 ähnliche Verläufe zu beobachten. In beiden Fällen steigerte sich die Expression der Gene im serumfreien Medium bis zu einem Maximum nach 72 h. Bei TLR7 war die Expressionssteigerung im serumfreien Medium deutlicher ausgeprägt als im Hybridoma Medium. Für TLR 8 und TLR 10 war im serumfreien Medium bereits nach 24 h ein Anstieg der Expression zu verzeichnen. Für TLR 9 zeigte sich ein geringer Anstieg nach 48 h. Hier wären die nicht verwertbaren Ergebnisse nach 72 h interessant gewesen, um einen ähnlichen Verlauf wie bei TLR 6 und TLR 7 zu überprüfen.

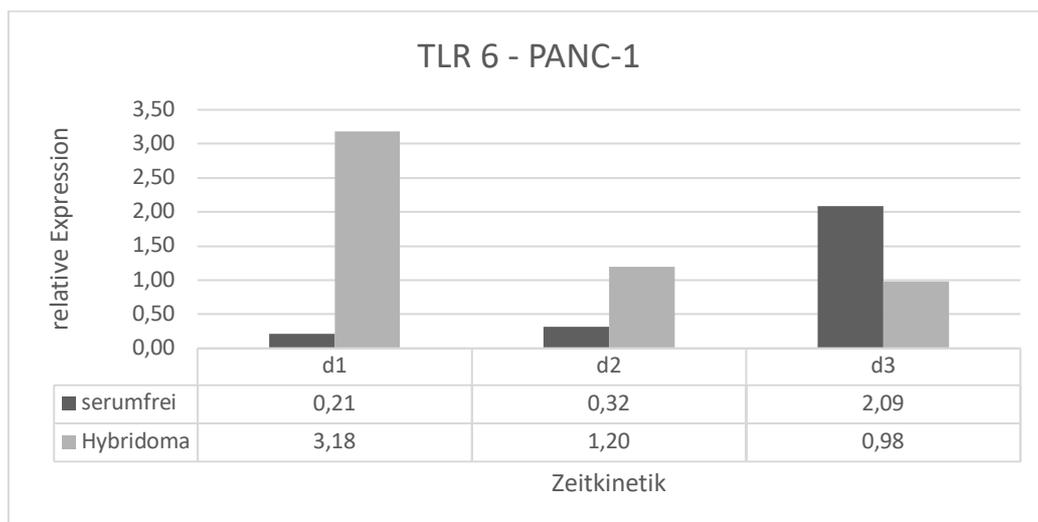


Abbildung 22: TLR6 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 6 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Dies konnte vornehmlich bereits nach 24h im Hybridoma Medium nachgewiesen werden. Danach nahm die Expressionssteigerung kontinuierlich ab. Nur im serumfreien Medium fand sich noch ein Maximum nach 72h.

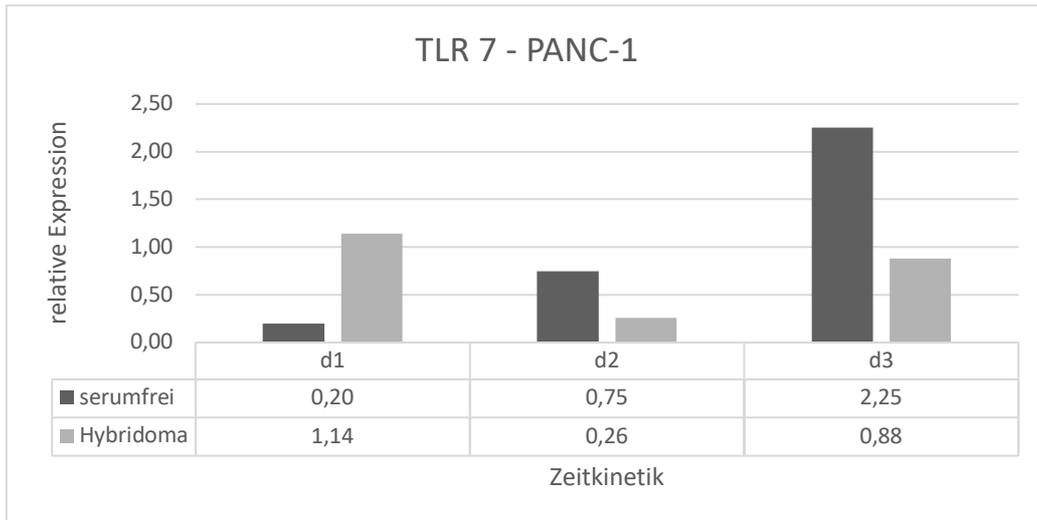


Abbildung 23: TLR7 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 7 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Im serumfreien Medium nahm die Expression entsprechend der Zeitkinetik kontinuierlich bis zu einem Maximum nach 72h zu. Im Hybridoma Medium waren geringer ausgeprägte Maxima nach 24h und nach 72h zu beobachten.

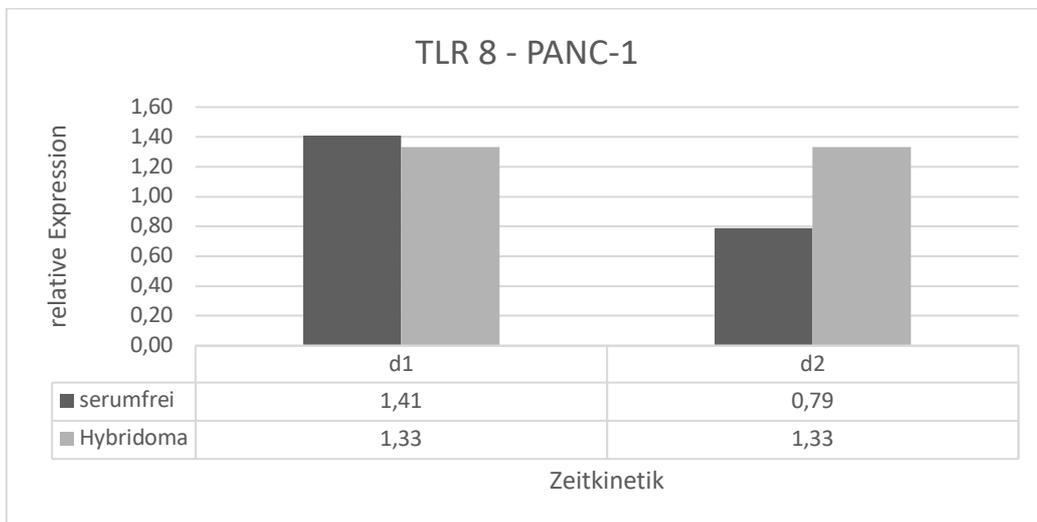


Abbildung 24: TLR8 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 8 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Bis dahin zeigten sich minimale Reaktionen in beiden Medien. Nach 24h war analog zu den Vorbeobachtungen bereits ein Ansprechen auf das serumfreie Medium zu beobachten.

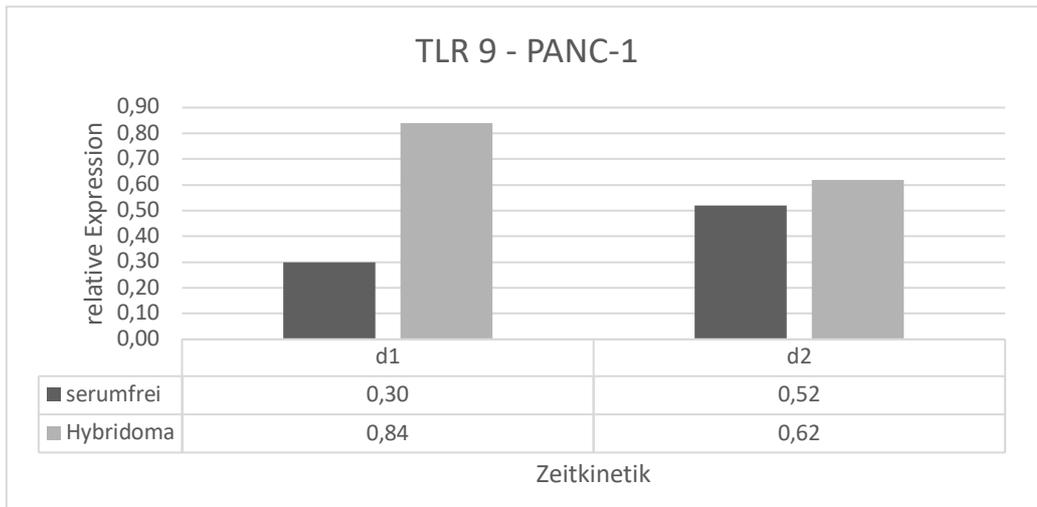


Abbildung 25: TLR9 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 9 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Die bis zu diesem Zeitpunkt analysierten Daten waren nicht richtungsweisend. Im serumfreien Medium zeigte sich die Tendenz zur Expressionssteigerung entsprechend der Zeitkinetik. Hier wären Daten nach 72h aufschlussreich.

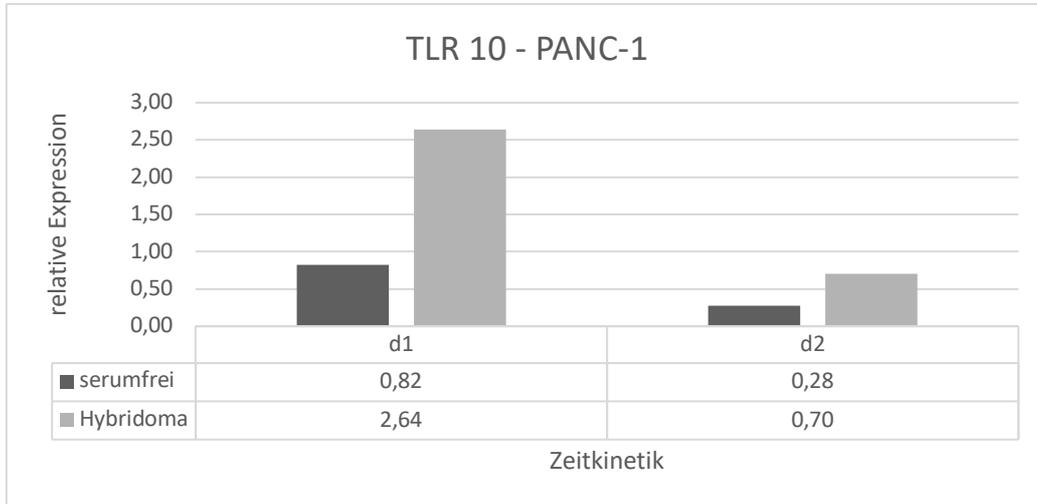


Abbildung 26: TLR10 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug

PANC-1 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 10 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Nach bereits 24h wurde im Hybridoma Medium ein Maximum der Expressionssteigerung verzeichnet. Deutliche Reaktionen im serumfreien Medium wurden nicht beobachtet.

4.1.2.3 Expressionsanalyse im MIA PaCa-2 Pankreaskarzinom nach Nährstoffentzug

Die Untersuchungsergebnisse der MIA PaCa-2 Pankreaskarzinomzellen reihen sich in die Beobachtungen der HT29 und PANC-1 Karzinome ein. Es konnte vornehmlich eine Expressionsänderung im Hybridoma Medium nach 24 h oder 48 h für die Gene HSP70, MDR1, ABCB5, TLR2, TLR3, TLR5, TLR8 und TLR9 nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich gerade für TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 auch eine Expressionsänderung im serumfreien Medium. Auffällig war, dass im serumfreien Medium eine initiale Expressionssteigerung für MDR1, TLR4, TLR5 und TLR6 nach 24 h von einem Rückgang der Expression nach 48 h und von einem weiteren Anstieg ihrer Expression nach 72 h gefolgt war. Es bleibt offen, ob sich auch für HSP70, ABCB5, TLR2, TLR3, TLR8 und TLR9 ein zweites Expressionsmaximum angeschlossen hat. Nach 48 h konnte konstant ein Rückgang der Expression beobachtet werden.

Hitzeschockproteine

Für das Gen HSP70 konnte im Hybridoma Medium nach 48 h ein Expressionsanstieg nachgewiesen werden. Bezüglich des serumfreien Mediums ergab sich wie oben bereits beschrieben ein geringer Rückgang der Expression nach 48 h.

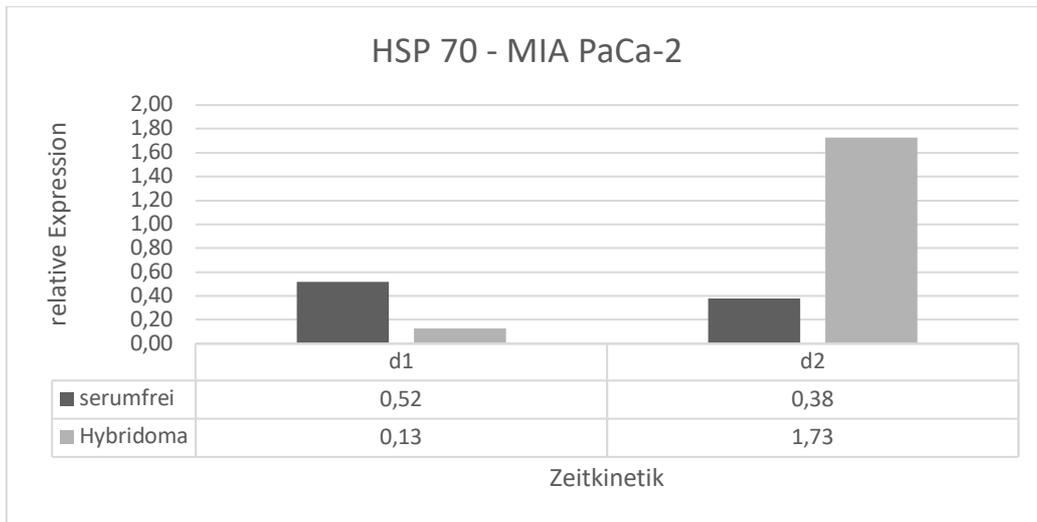


Abbildung 27: HSP70 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens HSP70 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Nach 48h wurde ein Anstieg der relativen Expression im Hybridoma Medium beobachtet.

ABC-Transporter

Die beobachteten ABC-Transporter zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. Für MDR1 und MIA PaCa-2 Tumorzellen war nach 48 h im Hybridoma Medium ein leichter Expressionsanstieg zu verzeichnen. Dieser setzte sich für MDR1 nach 72 h fort und zeigte hierbei einen deutlichen Anstieg.

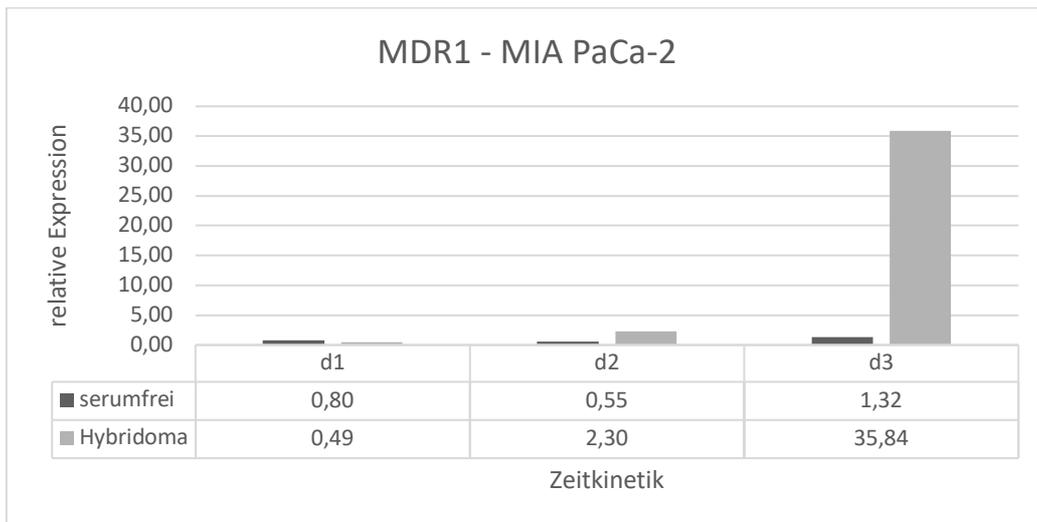


Abbildung 28: MDR1 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Zielgens MDR1 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Nach 72h konnte eine deutliche Reaktion im Hybridoma Medium nachgewiesen werden.

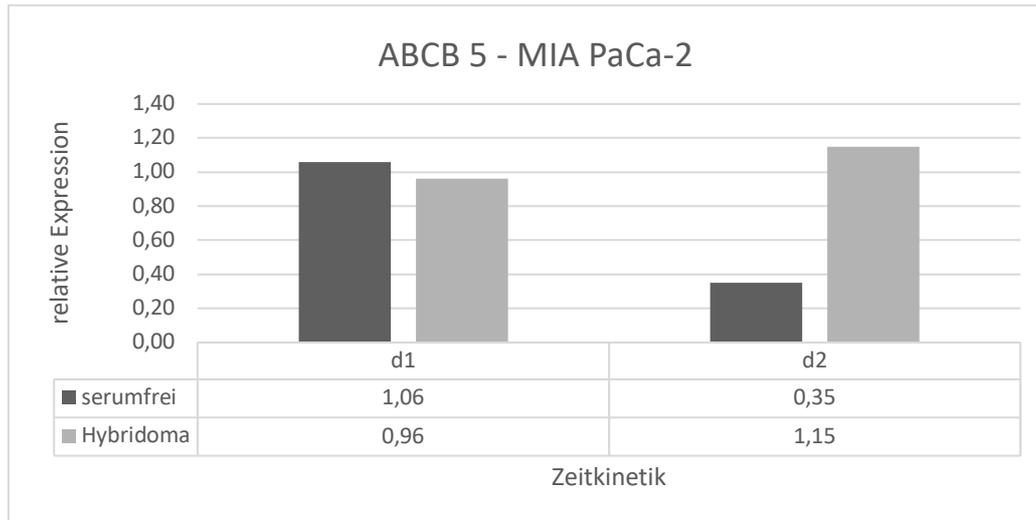


Abbildung 29: ABCB5 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens ABCB 5 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Die Beobachtungen bis dahin boten keine eindeutige Tendenz.

Toll-like Rezeptoren

Für TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8 und TLR9 wurde ein uneinheitliches Expressionsmuster vorgefunden. Führend waren in den meisten Fällen die Expressionsanstiege im Hybridoma Medium. Dabei wurde für TLR2, TLR4 und TLR6 das Maximum bereits nach 24 h beobachtet. Bei den übrigen TLRs wurde das Expressionsmaximum nach 48 h erreicht. Bezüglich des serumfreien Mediums ergaben sich ebenfalls Maxima nach 24 h und nach 72 h. Nach 48 h konnte immer ein Rückgang der Expression beobachtet werden. Bereits nach 24 h zeigte sich bei TLR2, TLR3, TLR4, TLR8 und TLR9 das Expressionsmaximum. Nur für TLR2 und TLR4 bewegten sich diese in einer nennenswerten Größenordnung. Bei TLR4 war dieses deutlicher ausgeprägt als im Hybridoma Medium. Auch bei TLR 4 folgte ein zweites Maximum der Expression nach 72 h. Steigerungen der Expression nach dieser Zeit konnten für TLR5 und TLR6 beobachtet werden. Diese waren allerdings zu gering ausgeprägt, um daraus ein eindeutiges Verhalten ableiten zu können. Vorangegangen waren auch hier leichte Expressionssteigerungen

nach 24 h. Wie bereits bei TLR4 war bei TLR6 das Maximum deutlicher im serumfreien Medium zu beobachten.

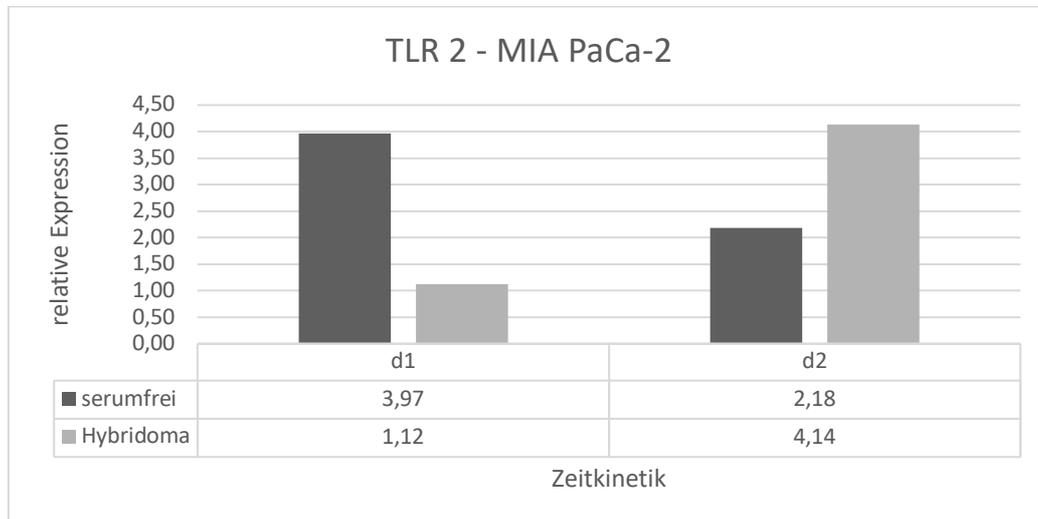


Abbildung 30: TLR2 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die TLR 2 Expression wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Nach 24h wurde ein Expressionsmaximum im serumfreien Medium beobachtet. Im Hybridoma Medium wurde die maximale Expressionssteigerung nach 48h nachgewiesen.

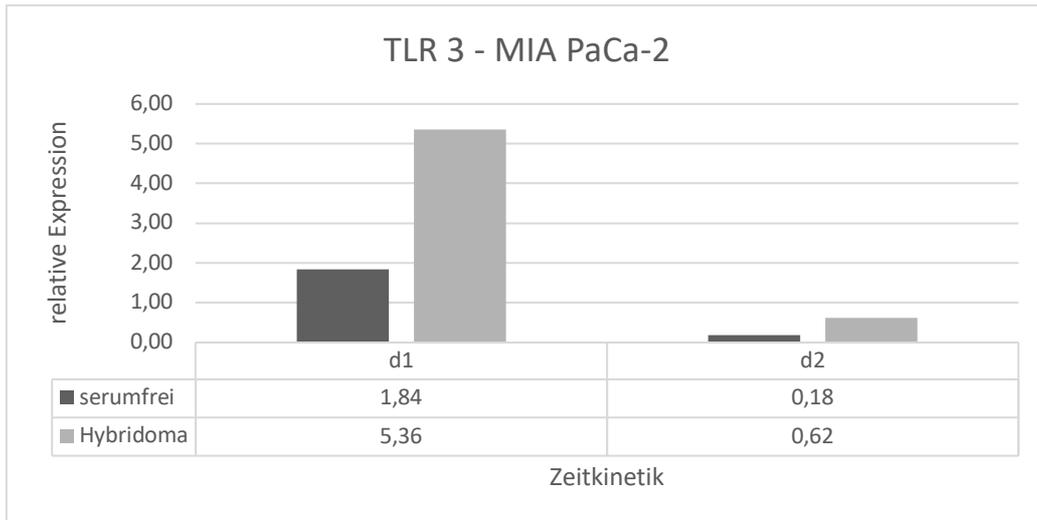


Abbildung 31: TLR3 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 3 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Bereits nach 24h stellte sich im Hybridoma Medium eine maximale Expressionssteigerung ein.

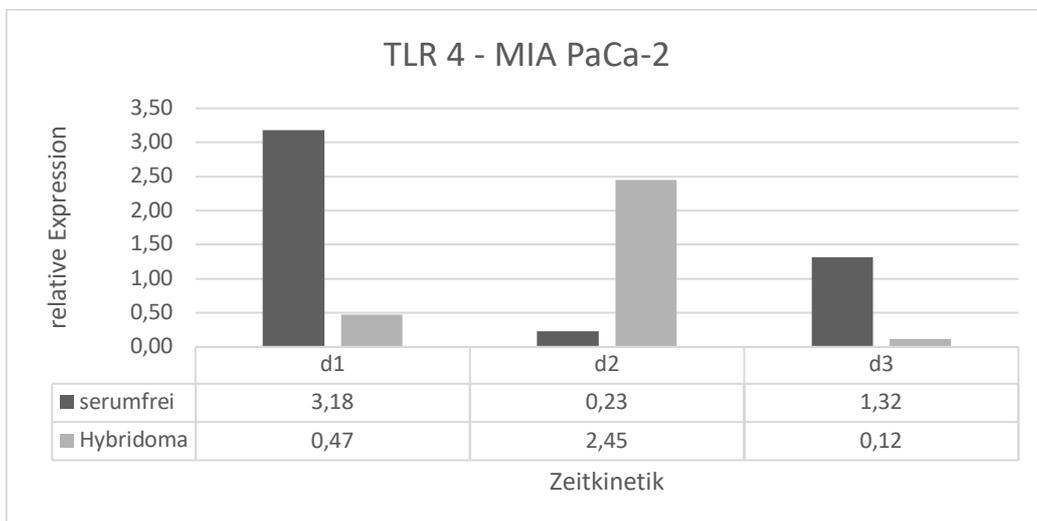


Abbildung 32: TLR4 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die TLR 4 Expression wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Es konnten Maxima nach 24h im serumfreien Medium und nach 48h im Hybridoma Medium registriert werden.

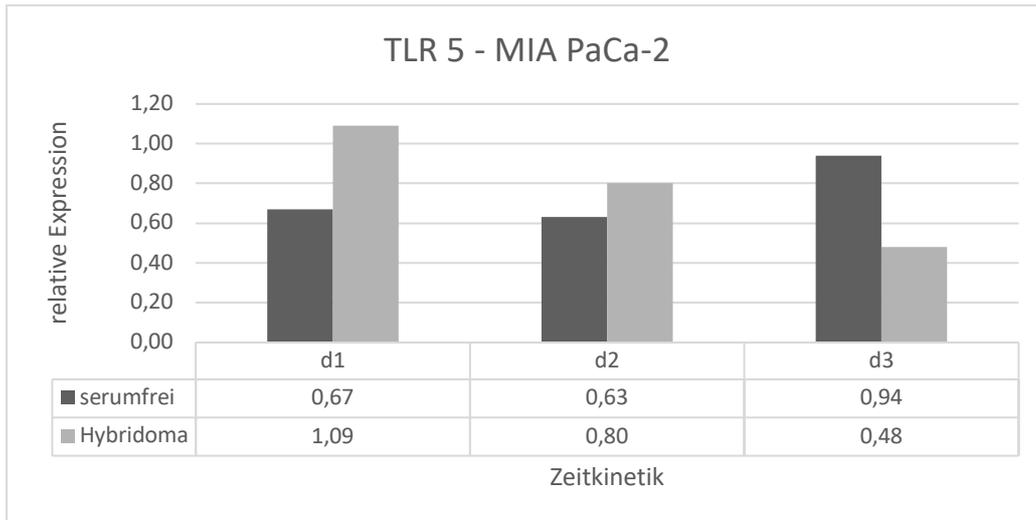


Abbildung 33: TLR5 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 5 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Insgesamt waren die Veränderungen gering ausgeprägt. Für das Gen TLR5 ließ sich kein eindeutiges Verhalten ableiten.

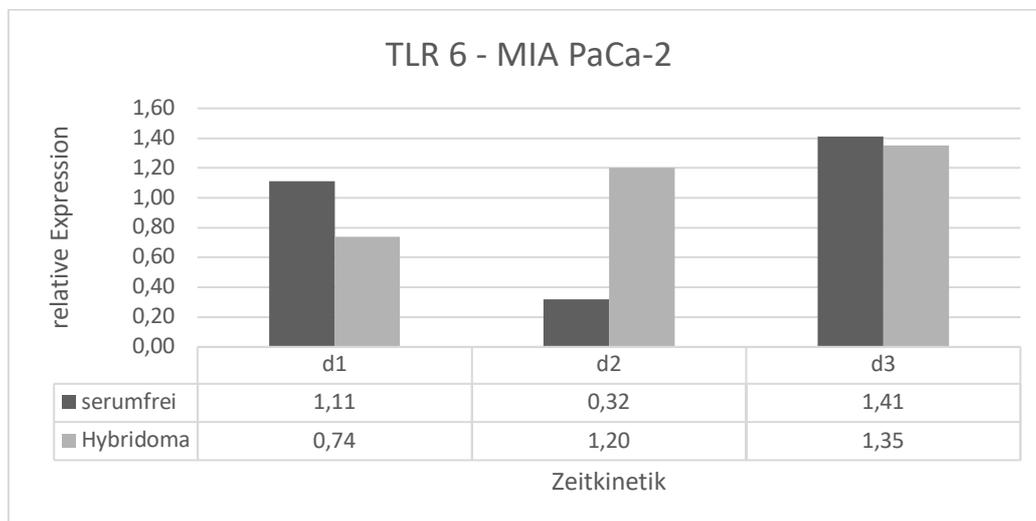


Abbildung 34: TLR6 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die TLR 6 Expression wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Unter keiner Versuchsbedingung konnte eine eindeutige Zunahme der relativen Expression nachgewiesen werden.

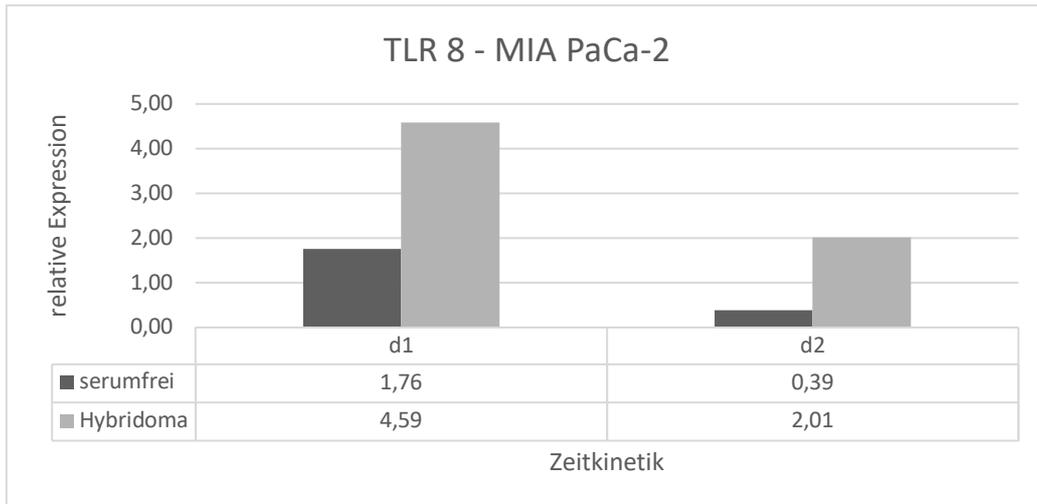


Abbildung 35: TLR8 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 8 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Nach 24h wurde im Hybridoma Medium ein Anstieg der Expression nachgewiesen. Diese nahm nach 48h wieder ab.

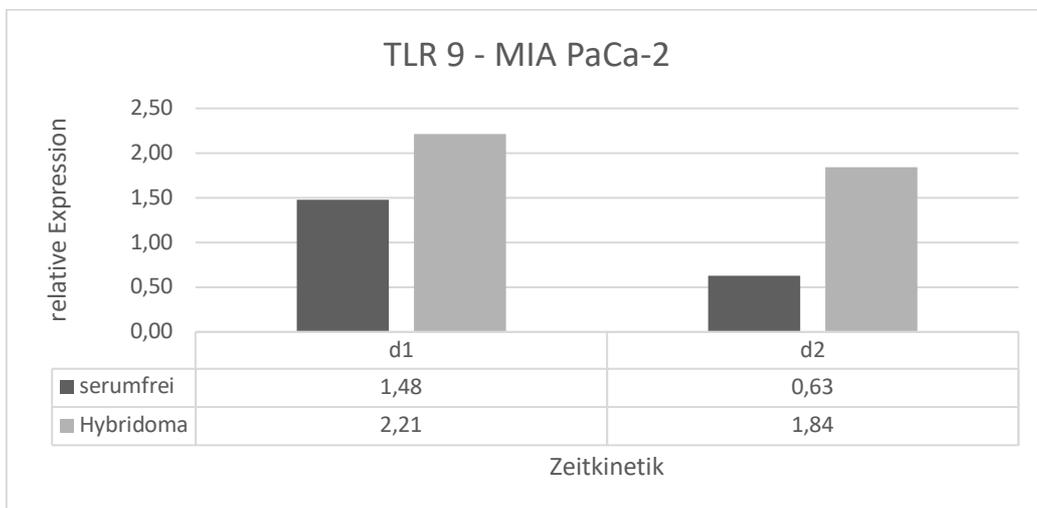


Abbildung 36: TLR9 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug

MIA PaCa-2 Karzinomzellen wurden zwei verschiedenen Hungermedien ausgesetzt (serumfreies Medium und Hybridoma Medium). Die Expression des Gens TLR 9 wurde nach 24h (d1), 48h (d2) und 72h (d3) gemessen und in Relation zum Normalmedium gesetzt. Die nach 72h (d3) erhobenen Ergebnisse wurden nicht verwendet. Ähnlich zu der Beobachtung beim Gen TLR8 war auch hier ein Expressionsmaximum im Hybridoma Medium nach 24h zu verzeichnen.

4.2 Western Blot

Um eine Expressionsänderung der untersuchten Gene auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden für HSP90 im HT29-Kolonkarzinom beispielhaft Western Blots durchgeführt. Als Ladungskontrolle wurde GapDH verwendet. Es zeigte sich für HT29 Zellen nach 72 h im serumfreien Medium analog zu den Ergebnissen in der real-time PCR ein Expressionsanstieg auf Proteinebene.

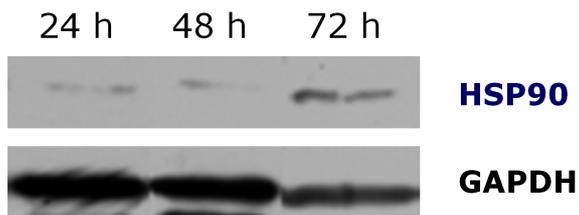


Abbildung 37: Western Blot aus HT29-Zellen mit Nachweis von HSP90

Western Blot aus whole-cell extrahierten HT29-Zellen. Die GapDH-Banden zeigen über die gesamte Zeitkinetik hinweg eine gleiche intensive Färbung und belegen somit eine konstante Beladung. HSP90 zeigt nach 72 h im Vergleich zu 24 h und 48 h eine stärkere Expression. Nach 72 h konnte auch auf Proteinebene eine vermehrte Expression des Gens HSP90 nachgewiesen werden.

4.3 Immunhistochemie

Um die in den RT-PCRs beobachteten Expressionsänderungen mit einer zweiten Methode auf Proteinebene zu überprüfen, wurden für TLR6 in HT29-Tumorzellen immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Die HT29-Zellen wurden dazu nach 24 h und nach 72 h im serumfreien Medium auf TLR6 Expression hin untersucht. Es zeigte sich bei Kultur der Zellen im serumfreien Medium eine Zunahme der TLR6 Expression auf Proteinebene. Dies bestätigt die Beobachtungen aus den quantitativen Genanalysen in den real-time PCRs.

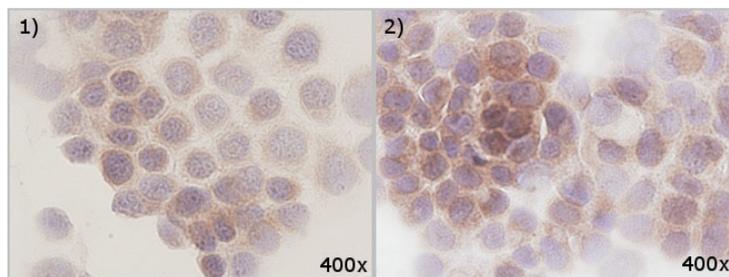


Abbildung 38: Immunhistochemische Färbung von TLR6 an HT29-Zellen

Repräsentative immunhistochemische Darstellung der TLR6 Expression in HT29-Tumorzellen. HT29-Zellen wurden 24 h (Abb. 37, 1) links) und 72h (Abb. 37, 2) rechts) im serumfreien Medium kultiviert. Immunhistochemisch fand sich nach 72 h eine verstärkte TLR6-Expression.

4.4 MTS Proliferationsassay

Um das Proliferationsverhalten unter Nährstoffentzug in HT29 Tumorzellen zu überprüfen, wurde deren Zellproliferation im Standardmedium, im serumfreien Medium und im Hybridoma Medium (PFHM II) jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h analysiert. Die Ergebnisse wurden auf das Standardmedium normalisiert und in Prozent bezogen auf das Standardmedium angegeben. Im serumfreien Medium folgte auf einen initialen Proliferationsanstieg nach 24 h ein relativer Wiederanstieg nach 72 h. Nach 48 h und 72 h blieb die relative Proliferation jedoch unter 70 % des Werts im Standardmedium.

Im Hybridoma Medium fiel die relative Proliferation nach 24 h sofort auf unter 80 % ab. Nach 48 h und 72 h verblieb sie konstant auf Werten unter 60 %. Festzuhalten ist, dass im serumfreien Medium erst nach 48 h und im Hybridoma Medium schon nach 24 h eine Rückgang der Proliferation zu verzeichnen war. Somit führt der Serumentzug in beiden Nährstoffmangelmedien erwartungsgemäß zu einer rückläufigen Zellproliferation. Im proteinfreien Hybridoma Medium ist der Rückgang der Proliferation am deutlichsten zu beobachten.

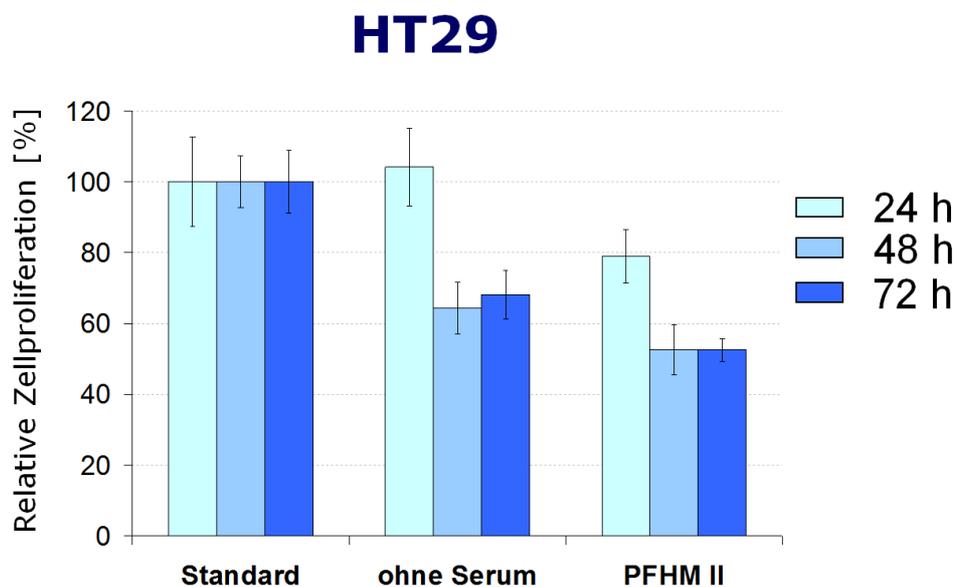


Abbildung 39: Relative HT29-Zellproliferation im MTS Assay

Die relative Zellproliferation von HT29-Kolonkarzinomzellen wurde im MTS-Test nach jeweils 24 h, 48 h und 72 h im Standardmedium, serumfreien Medium und Hybridoma Medium (PFHM II) untersucht. Im Vergleich zur Inkubation im Standardmedium (auf 100 % normalisiert) proliferierten HT29-Kolonkarzinomzellen in den Hungermedien (Serumfreies Medium und PFHM II-Hybridomamedium) im Verlauf verhältnismäßig schwächer. So fiel die Proliferation nach 48 h und 72 h auf Werte zwischen 65 % und 55 % ab.

5 Beantwortung der Fragestellungen

Hemmt Nährstoffentzug die Proliferation von Kolonkarzinomzellen *in vitro*?

Nährstoffmangelbedingungen führen in humanen HT29-Kolonkarzinomzellen bereits nach 48 und 72 Stunden zu rückläufiger Zellproliferation in beiden Nährstoffmangelmedien. Der Rückgang der relativen Proliferation im Hybridoma Medium fiel dabei deutlicher aus und war früher zu beobachten. Bereits nach 24 Stunden sank sie unter 80 Prozent und nach 48 und 72 Stunden auf unter 60 Prozent. Im serumfreien Medium fiel sie nach 48 und 72 Stunden auf circa 70 Prozent. Somit konnte funktionell gezeigt werden, dass ein Nährstoffentzug die Zellproliferation im HT29-Kolonkarzinom *in vitro* nachhaltig hemmt.

Ist in Kolonkarzinomzellen unter Nährstoffentzug ein verändertes Expressionsverhalten von kodierenden Reparaturgenen für die Hitzeschockproteine nachweisbar?

Nährstoffentzug führt neben einer rasch verminderten Zellproliferation zu einem veränderten Genexpressionsverhalten für stressbedingte intrazelluläre Reparaturvorgänge in HT29 Kolonkarzinomzellen. In dieser Arbeit wurde in HT29-Kolonkarzinomzellen bereits 24 Stunden nach Kultivierung im Hybridoma Medium eine gesteigerte Expression des für Reparaturvorgänge repräsentativen Hitzeschockproteins 90 beobachtet. Die Behandlung mit serumfreiem Medium führte zu einer vergleichsweise geringeren Reaktion der HSP90 Expression, was sich mit dem beobachteten Proliferationsverhalten im Vergleich beider Kulturbedingungen funktionell deckt. Auch auf Proteinebene fand sich bereits nach 24 sowie nach 48 und 72 Stunden im serumfreien Medium eine gesteigerte Expression. Somit führt ein Nährstoffentzug sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stressbedingt zu verstärkter Expression des Hitzeschockproteins 90.

Zeigt sich nach zellulärem Stress von Kolonkarzinomzellen durch Nährstoffentzug ein verändertes Genexpressionsmuster auch für andere charakteristische Signalvorgänge wie den *multiple drug resistance* (ABC Transporter) Genen sowie für inflammatorische Signalprozesse wie den *Toll-like* Rezeptoren?

Toll-like Rezeptoren wie auch ABC-Transportproteine spielen bei der Tumorentwicklung und -progression des Kolonkarzinoms eine wichtige Rolle. Es stellt sich daher die Frage, ob auch relevante inflammatorische Signalwege und membranständige Transportmechanismen für die Ausschleusung intrazellulärer Substanzen unter Nährstoffmangelbedingungen im Kolonkarzinom beeinflusst werden. Im Hybridoma Medium wurde für die untersuchten repräsentativen Gene ABCB1 und ABCB5 eine gesteigerte Expression beobachtet. Am deutlichsten fiel die Expressionssteigerung von ABCB5 nach 48 Stunden im serumfreien Medium auf. Es kann jedoch postuliert werden, dass neben ABCB5 auch ABCB1 unter Serumentzug hochreguliert wird. Dies konnte in dieser Arbeit allerdings nicht explizit nachgewiesen werden.

Die Beobachtungen zu inflammatorischen Signalprozessen weisen in die gleiche Richtung. Unter Nährstoffentzug wurden in HT29-Tumorzellen gesteigerte Expressionen für TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 beobachtet. Auch hier war eine deutlichere Expressionssteigerung im Hybridoma Medium zu registrieren. Der maximale Expressionsanstieg war nach 48 Stunden zu verzeichnen. Für TLR4 wurde bereits nach 24 Stunden eine maximale Expressionssteigerung im serumfreien Medium beobachtet. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen anschaulich eine hochregulierte Genexpression für inflammatorische Signalprozesse in Form repräsentativer sechs *Toll-like* Rezeptoren sowie für den Substrattransport aus der Tumorzelle (anhand zweier ABC-Transporter) unter Nährstoffentzug und den damit herbeigeführten Mangelbedingungen.

Ist ein verändertes Genexpressionsverhalten der untersuchten Reparaturgene, Gene für den Substrattransport aus der Tumorzelle und für inflammatorische Signalprozesse auch in anderen gastrointestinalen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom vergleichbar nachweisbar?

Eine gesteigerte Expression der untersuchten Gene wurde sowohl beim humanen PANC-1- als auch beim MIA PaCa-2-Pankreaskarzinom im Hybridoma Medium nach 24 Stunden und somit früher als im HT29-Kolonkarzinom beobachtet. Im serumfreien Medium zeigten sich entsprechende Expressionsveränderungen nach 24 Stunden sowie teilweise erst nach 72 Stunden. Das Hitzeschockprotein 70 wurde im PANC-1-Pankreaskarzinom bereits nach 24 Stunden Kultur im Hybridoma Medium verstärkt exprimiert. Auch für die untersuchten repräsentativen Gene des Substrattransports (ABCB1 und ABCB5) und der inflammatorischen Signalprozesse im Pankreaskarzinom (TLRs) waren Expressionssteigerungen vornehmlich im Hybridoma Medium nach 24 Stunden zu registrieren. Nach 48 und 72 Stunden wurden nur noch selten Expressionssteigerungen beobachtet. Die Ergebnisse im serumfreien Medium ähneln den beobachteten Veränderungen im Hybridoma Medium. Insbesondere wurden TLR2 und TLR4 in humanen MIA PaCa2-Pankreaskarzinomzellen nach 24 Stunden hochreguliert. TLR6 und TLR7 wurden in PANC1-Pankreaskarzinomzellen allerdings erst nach 72 Stunden verstärkt exprimiert.

Somit kann geschlussfolgert werden, dass sich die Ergebnisse der untersuchten Pankreaskarzinome in die Ergebnisse des HT29-Kolonkarzinoms einreihen. Beide untersuchten Krebsentitäten reagieren in sehr ähnlicher Weise auf den durchgeführten Nährstoffentzug.

Welche Bedeutung können die nachgewiesenen Veränderungen in Kolon- und Pankreaskarzinomzellen unter Nährstoffentzug für die Klinik haben und welche Schlussfolgerungen wären daraus für den Tumorpatienten zu ziehen?

Im Rahmen einer multimodalen Krebstherapie könnten Strategien hilfreich sein, die neben einer modernen Chemotherapie zukünftig auf eine Verminderung des Nährstoffangebots im Tumormikromilieu abzielen. Derartige Therapiemaßnahmen, die durch induzierte Mangelbedingungen im Tumorbett Tumorzellen absterben lassen, sind bislang jedoch kaum etabliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es interessant wäre, nährstoffarme Bedingungen im Mikromilieu von Kolonkarzinomen zu erzeugen, um Tumorzellproliferation zu verhindern. Außerdem wäre zu überprüfen, ob nicht unter einem solchen Vorgehen einer induzierten Mangelversorgung einige wenige robuste Tumorzellen im Kolonkarzinom überleben und möglicherweise, wie in der Literatur für andere Stressmechanismen beschrieben, ein aggressiveres Proliferationsverhalten und eine stärkere Chemotherapieresistenz entwickeln würden.

In diesem Zusammenhang haben die hier vorgestellten Beobachtungen einen relevanten Erkenntniswert für die Weiterentwicklung bestehender Therapien beim Kolonkarzinom.

6 Diskussion

Hemmt Nährstoffentzug die Proliferation von Kolon- und Pankreaskarzinomzellen *in vitro*?

Zurückliegende Untersuchungsergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe deuten wie die Beobachtungen in der eigenen Arbeit darauf hin, dass eine erhöhte Toleranz von soliden Tumoren gegenüber einem Nährstoffmangel mit einem gesteigerten malignen Potential einhergehen kann [126]. In diesen zurückliegenden Untersuchungen wurden die Effekte von Nährstoffentzug wie in der eigenen Arbeit im kolorektalen Karzinom sowie im PANC-1- und MIA PaCa-2-Pankreaskarzinom untersucht. Die Viabilität der Zellen wurde jedoch lediglich über eine Färbung mit Trypanblau gemessen, bei der vitale Zellen mit intakter Zellmembran keinen Farbstoff aufnahmen [127]. Abgestorbene Zellen wurden hingegen vollständig angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass sich Tumorzellen im Vergleich zu Fibroblasten deutlich resistenter gegenüber einem Nährstoffmangel verhielten. Das galt insbesondere für das PANC-1-Pankreaskarzinom und schlecht differenzierte Kolonkarzinome. Mehr als 50 Prozent der PANC-1-Zellen waren nach 48 Stunden Nährstoffmangel noch überlebensfähig. Ähnliches Verhalten wurde für andere etablierte Kolonkarzinomzellen beobachtet. Untersucht wurde neben dem Entzug von Serum auch der Entzug von Glucose, Aminosäuren sowie die entsprechenden Kombinationen. Bis 24 Stunden nach dem Nährstoffentzug wurde eine konstante oder steigende Zellzahl beobachtet. Danach waren zunehmend geringere Zellzahlen erkennbar. Allerdings zeigten sich Pankreaskarzinomzellen und kolorektale Tumorzellen im Vergleich zu Magen- und Leberkarzinomzellen resistenter [126].

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Arbeit weisen in die gleiche Richtung. Die untersuchten Pankreas- und Kolonkarzinomzellen überlebten den Nährstoffentzug über 3 Tage. Auch nach 72 Stunden konnte im MTS-Test eine Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Nährstoffentzug führte letztlich aber auch hier zu einer verminderten Zellproliferation. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals in diesem Zusammenhang das maligne Potential von etablierten und häufig verwendeten humanen Pankreas- und Kolonkarzinomen anhand ihrer veränderten Expressionsmuster von

Toll-Like Rezeptoren, ABC-Transportern und Hitzeschockproteinen im Rahmen des Nährstoffentzugs weitergehend untersucht.

Ist in Kolonkarzinomzellen unter Nährstoffentzug ein verändertes Expressionsverhalten von kodierenden Reparaturgenen für die Hitzeschockproteine nachweisbar?

Diverse Stressoren führen zu einer gesteigerten Expression von Hitzeschockproteinen [22]. Die bekanntesten Auslöser der sogenannten *heat shock response* sind Hitze, ionisierende Strahlung und oxidativer Stress. Über Nährstoffentzug als wichtigen Co-Faktor im Tumormikromilieu für eine Tumorzellapoptose oder Tumorzellproliferation ist weniger bekannt. Jüngere Arbeiten zeigten in Tumorzellen unter Nährstoffentzug ein gesteigertes Migrationsverhalten der Zellen, das abhängig vom Hitzeschockprotein 90 zu sein scheint, da über eine HSP90 α -Antikörper-basierte Blockade die Migration der Tumorzellen unter Nährstoffentzug reduziert wurde. [128]

Darüber hinaus scheinen Tumorzellen die *heat shock response* auf mehreren weiteren Ebenen zu benötigen und entwickeln über die Hochregulierung der Hitzeschockproteine einen Überlebensvorteil [34]. Schon 1993 wurde gezeigt, dass Hitzeschockproteine und in diesem Falle besonders das HSP70 die Tumorzellen und ihre Proteine in Phasen von metabolischem Stress schützen können [129]. Die Hitzeschockproteine bilden einen Pool an *chaperon*-Molekülen, welche essenziell für die Proteinfaltung sind und ihre Substrate im Falle einer zellulären Stresssituation, unter der es zu vermehrt fehlerhaften Faltungen kommt, in ihrer Struktur schützen. Für maligne Zellen und ihren gesteigerten Stoffwechsel, welcher mit vermehrtem proteotoxischem und oxidativem Stress einhergeht, ist daher eine ausreichende Versorgung mit diesen *chaperon*-Molekülen von großem Vorteil. Die Hitzeschockproteine können in dieser Situation maligne Signalkaskaden stabilisieren und so einen Überlebensvorteil für diejenigen Tumorzellen generieren, die die *heat shock response* hochreguliert haben. Darüber hinaus tragen sie über diverse Mechanismen zur Tumorentwicklung und Metastasierung bei. [34] In Bezug auf den Nährstoffmangel können Hitzeschockproteine zudem essentielle onkogene Signalkaskaden vor lysosomalem Abbau schützen [130]. Ein gesteigerter lysosomaler Abbau und auch eine gesteigerte

Autophagozytose werden regelmäßig im Rahmen eines Nährstoffmangels und dem hieraus resultierenden Stress beobachtet. Tumorzellen können sich über die Autophagozytose im Rahmen einer geordneten Selbstverdauung mit Aminosäuren und Energie versorgen und sich gleichzeitig von beschädigten Proteinen entledigen [131]. Anhand diverser Degradationsprozesse über das Proteasom oder das endoplasmatische Retikulum entsorgen sich Tumorzellen schließlich falsch gefalteter und zu viel oder schadhafte produzierter Proteine. In diesem Zusammenhang kann eine ausreichende Versorgung der Krebszelle mit schützenden *chaperon*-Molekülen von Vorteil sein. Eine gesteigerte Expression von Hitzeschockproteinen wurde in diversen Tumorentitäten beobachtet [22, 33, 34, 38, 39]. Zudem mehren sich die Hinweise aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, dass Hitzeschockproteine das maligne Potential von Tumorzellen steigern [22, 32].

Die eigenen Ergebnisse zeigen hierzu erstmals, dass Kolonkarzinomzellen unter Nährstoffentzug die schützenden Hitzeschockproteine weiter überexprimieren. Möglicherweise kann somit das schädliche Mikromilieu in nährstoffunterversorgten Tumorealen zu einer malignen Progression beitragen. Unterstützt wird diese Annahme durch Beobachtungen in *Xenograft* Studien. Mit antiangiogenetischen Substanzen behandelte Tiere zeigten eine Induktion von GRP78, einem Mitglied der HSP70-Proteine, insbesondere im Randbereich zu Tumornekrosearealen. GRP78 überexprimierende Zellen waren zudem deutlich chemotherapieresistenter und weniger anfällig für eine Tumorzellapoptose. [132]

Zeigt sich nach zellulärem Stress von Kolonkarzinomzellen durch Nährstoffentzug ein verändertes Genexpressionsmuster auch für andere charakteristische Signalvorgänge wie den *multiple drug resistance* (ABC Transporter) Genen sowie für inflammatorische Signalprozesse wie den *Toll-like* Rezeptoren?

ABC-Transporter werden wie Hitzeschockproteine in diversen soliden Tumoren überexprimiert. Im kolorektalen Karzinom spielen die ABC-Transporter eine wichtige Rolle bei der Entwicklung hin zu chemotherapieresistenten Krebszellen und werden für ein Therapieversagen mitverantwortlich gemacht. [19] Über ihre beschriebene Bedeutung als Effluxpumpen hinausgehend konnten in der letzten Zeit weitergehende funktionelle Hinweise zu den ABC-Transportern erbracht werden. Eine Überexpression von ABCB1 schützt Krebszellen zum Beispiel vor substratunabhängigen Stressoren wie UV-Strahlung und Anwesenheit von TNF und *Fas*-Ligand [133]. Zudem sind ABCG2-positive Krebszellen resistenter gegenüber Nährstoffentzug. Diese Resistenz scheint über eine ABCG2-vermittelte gesteigerte Autophagozytoseaktivität erreicht zu werden. [134] Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen zusammen mit der aktuellen Literatur erneut in dieselbe Richtung. Ähnlich der Beobachtungen verstärkt exprimierter Hitzeschockproteine könnte eine Expressionssteigerung von ABCB1 und ABCB5 in den untersuchten HT29-Tumorzellen zu einem Überlebensvorteil im Kolonkarzinom unter Nährstoffentzug führen. Somit würde ein nährstoffarmes Tumormikromilieu in soliden Tumoren Zellpopulationen hervorbringen, die resistenter gegenüber Chemotherapeutika sind. Die Mechanismen, die dieser gesteigerten Resistenz zugrunde liegen, bleiben allerdings weiterhin unklar. Es ist anzunehmen, dass die gesteigerte Expression von ABC-Transportern im Rahmen des veränderten Zellmetabolismus der hungrigen Tumorzelle zum Vorteil gereicht. Eine gesteigerte Autophagozytose und ein modifizierter Zellmetabolismus scheinen hierbei eine Schlüsselrolle einzunehmen. [134, 135]

Inflammatorische Signalprozesse spielen neben den Hitzeschockproteinen und den ABC-Transportern in vielen soliden Malignomen eine wichtige Rolle bei der Proliferation von Tumorzellen. Beispielhaft wurden in vorliegender Arbeit dazu die

Toll-like Rezeptoren (TLRs) als initiale Signalstrukturen bei der Induktion einer Inflam-
mationsantwort aufgegriffen und untersucht. TLR-exprimierende Tumorzellen reagieren
auf bestimmte molekulare Strukturen im Tumormikromilieu (*damage-associated
molecular pattern*, DAMP) indem sie durch exprimierte Wachstumsfaktoren ihre eigene
Proliferation steigern oder über die Produktion immunsuppressiver Signalproteine der
Vernichtung durch das Immunsystem entgehen. In einer zurückliegenden Untersuchung
wurden Langerhans-Zellen zusammen mit Immunzellen untersucht, welche entweder
über einen intakten oder einen gestörten TLR-Signalweg verfügten. Sowohl unter Nähr-
stoffentzug als auch unter Sauerstoffentzug zeigte sich, dass durch das veränderte Mikro-
milieu Zellen untergingen. Das führte zur Akkumulation von DAMPs im Kulturmedium.
Diese DAMPs bewirkten eine Aktivierung der Immunzellen über einen TLR-abhängigen
Signalweg. [136] Somit kann auch für den hier gewählten Versuchsaufbau des Nährstoff-
entzuges vermutet werden, dass DAMPs im Rahmen des Tumorzelluntergangs im Nähr-
stoffmangelmedium gebildet werden. Diese DAMPs aktivierten zwar keine vorhandenen
Immunzellen, könnten aber Signalprozesse in den Tumorzellen in Gang setzen, die wie-
derum zu einer gesteigerten TLR-Expression führen. Die gesteigerte Expression von
TLR7 und TLR8 wurde im Kolonkarzinom bereits nachgewiesen und wird mit höheren
Tumorstadien in Verbindung gebracht [137]. Die Beobachtung, dass eine Expressions-
steigerung der TLRs unter Nährstoffentzug stattfindet, könnte bedeuten, dass die Akti-
vierung von *Toll-like* Rezeptoren über DAMPs zu einem Selektionsvorteil dieser Tumor-
zellen führt. Diese könnten sich wie oben beschrieben z.B. mit
zytoprotektiven und proliferativen Signalen versorgen.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass schlecht perfundierte Gewebeareale in
soliden Tumoren ein Mikromilieu aufweisen, in welchem erhöhte Konzentrationen von
DAMPs vorliegen. Diese DAMPs könnten wiederum direkt eine vermehrte
TLR-Expression in Tumorzellen bewirken. Somit würde die Überexpression von TLRs
in Tumorzellen auch unabhängig vom Einfluss infiltrierender Immunzellen zu einer Tu-
morprogression im Rahmen eines Nährstoffmangels beitragen. Areale mit schlechter
Nährstoffversorgung, Zellapoptose und einer hohen Konzentration von DAMPs würden
so zur Bildung aggressiverer Tumorzellen beitragen.

Ist ein verändertes Genexpressionsverhalten der untersuchten Reparaturgene, Gene für den Substrattransport aus der Tumorzelle und für inflammatorische Signalprozesse auch in anderen gastrointestinalen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom vergleichbar nachweisbar?

PANC-1-Pankreaskarzinome stellen sich als sehr resistent gegenüber Nährstoffmangel dar. Diese Resistenz scheint besonders bei undifferenzierten Tumoren ausgeprägt zu sein und wurde auch für undifferenzierte Magen- und Kolonkarzinome nachgewiesen. Die Resistenz gegenüber Nährstoffentzug ist mit einer Aktivierung des intrazellulären PI3K/Akt-Signalwegs assoziiert, da eine Unterdrückung (*knock-down*) des Akt-Gens in nährstoffresistenten PANC-1-Zellen zu einer reduzierten Toleranz dieser Zellen gegenüber Nährstoffentzug führte. [126] Da viele onkogene Signalprozesse in Tumorzellen den PI3K/Akt-Signalweg nutzen, ist anzunehmen, dass in hypovaskularisierten Gewebearealen Tumorzellen vorhanden sind, die sich diesem nährstoffbedingt feindlichen Tumormikromilieu auf diesem Wege angepasst haben. [126] Klinisch makroskopisch wurden die hypovaskularisierten Tumorareale im Pankreaskarzinom über PET-Scans auf ihre Perfusion und metabolische Aktivität hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Pankreaskarzinom im Vergleich zum Normalgewebe eine deutlich geringere Perfusion vorliegt. Zudem wurde beschrieben, dass die Kombination von geringerer Perfusion und hoher metabolischer Aktivität mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Brustkrebs sowie bei Kopf-Hals-Tumoren gemacht werden. [138] In nährstoffunterversorgten Tumorarealen des Pankreaskarzinoms könnte sich also eine aggressivere und auch resistenterere Tumorzellpopulation entwickeln. Die in dieser Arbeit vorgestellten Expressionsveränderungen in Hitzeschockproteinen, ABC-Transporten und *Toll-like* Rezeptorenwürden mit diesen Beobachtungen einhergehen und bisherige Erkenntnisse unterstützen. Nährstoffmangelbedingungen könnten zu ähnlichen Anpassungsreaktionen in verschiedenen Malignomen des Gastrointestinaltraktes, wie dem Kolon- und Pankreaskarzinom, führen.

Welche Bedeutung können die nachgewiesenen Veränderungen in Kolon- und Pankreaskarzinomzellen unter Nährstoffentzug für die Klinik haben und welche Schlussfolgerungen wären daraus für den Tumorpatienten zu ziehen?

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass Nährstoffmangelbedingungen zur Entstehung eines aggressiveren Phänotyps an Tumorzellen im Kolon- und Pankreaskarzinom beitragen können. Umgekehrt wirken Tumorzellen zugleich auf ihr eigenes Mikromilieu ein. So bildet sich im Pankreaskarzinom insgesamt ein hypovaskularisiertes Tumorstroma aus, welches eine Unterversorgung an Nährstoffen nach sich zieht. [138] Dieses lässt eine intensive Wechselwirkung zwischen Tumorzellen, infiltrierenden Immunzellen und Stromazellen vermuten. Die gegenseitigen Wechselwirkungen der beteiligten Zellen untereinander sowie über das Tumormikromilieu stehen in direktem Zusammenhang zu den beschriebenen Charakteristika sehr vieler solider Tumore, bezeichnet als sogenannte *hallmarks of cancer* [103]. Beispiele hierfür sind unter den auch in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen bei Nährstoffmangel ein veränderter Tumorzellmetabolismus hin zur anaeroben Glykolyse und einer anabolen Stoffwechsellage, die Überwachung und Steuerung der Tumorummunantwort (*immunosurveillance*) der Tumorzellen sowie die Induktion chronischer Entzündungsprozesse im Mikromilieu, die Verhinderung von Apoptose z.B. unter Chemotherapie und das Einsprossen von neuen Blutgefäßen.

Somit sollte im Rahmen von zukünftigen gezielten Therapieansätzen insbesondere bei soliden Tumoren die Wechselwirkungen zwischen Tumormikromilieu und Tumorzellen als ein wichtiges Therapieziel betrachtet werden. Gerade in Bezug auf das hypovaskularisierte Pankreaskarzinom gibt es dazu interessante Ergebnisse. So wurde ein Mausmodell (*KPC-mice*) entwickelt, welches Pankreastumore hervorbringt, die den menschlichen Karzinomen sehr ähnlich sind. Diese Tumore sind hypovaskularisiert und verfügen über ein desmoplastisches Tumorstroma [139]. Beide Charakteristika sind auch beim menschlichen Pankreaskarzinom zu beobachten und scheinen die Tumorzellen zu beschützen. In weiteren Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Konzentration von Medikamenten im Tumor durch diese Abschirmung deutlich reduziert wird. Daraufhin wurde eine Behandlung mit einem Derivat des Cyclophosphamid

(IPI-962) durchgeführt. Dieses wirkt auf die Stromazellen des Tumors und führt zu einem Abbau des Stromas sowie zu einer Normalisierung der Gefäßarchitektur. In weiteren Versuchen wurde beobachtet, dass eine Behandlung mit IPI-962/Gemcitabin zu einer erhöhten Konzentration von Gemcitabin im Tumor und somit zu einem verlängerten Überleben, einer Reduktion der Tumorgroße und einer geringeren Metastasierung führt. [140] Diese Ergebnisse konnten bisher noch nicht in die Klinik übertragen werden. Oft wurde sogar ein aggressiverer Tumortyp über eine gezielte Reduktion des Tumorstromas hervorgebracht. Somit scheint das Tumorstroma die Tumorprogression auch verhindern zu können. Daher ist eine differenzierte Betrachtung angebracht. [141] [142]

Zusammenfassend kann eine Kombination von klassischer und gezielter Krebstherapie, insbesondere im Hinblick auf das Tumormikromilieu, zu Synergien führen. Dabei müssen allerdings die komplexen Zusammenhänge zwischen Tumorzellen und ihrem Mikromilieu exakter analysiert werden, um einen Therapieerfolg zu erzielen. Die hier vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass ein nährstoffarmes Tumormikromilieu einerseits zu einem Absterben großer Anteile von Tumorzellen und andererseits aber zum möglichen Überleben resistenter Tumorzellen und zu aggressiveren Tumorzellpopulationen führt. Diese sind unter anderem durch veränderte Expressionsmuster an *Toll-like* Rezeptoren, ABC-Transportern und Hitzeschockproteinen charakterisiert. Die beschriebenen nährstoffmangelbedingten molekularen Veränderungen der Chemotherapieresistenz (*multiple drug resistance*), der intrazellulären Stressreaktionen (*heat shock response*) und der inflammatorischen *Toll-like* Rezeptor-vermittelten Signalwege in Tumorzellen untermauern deren Bedeutung im Pankreas- und Kolonkarzinom und stellen damit spannende klinische Therapieziele für die Zukunft dar.

7 Zusammenfassung und Ausblick

In soliden Tumoren des Gastrointestinaltraktes herrschen in der Regel keine optimalen Wachstumsbedingungen für Tumorzellen wie im gesunden Zellverband *in vivo*. Die Bedingungen sind durch schlechte Gefäßversorgung und chronisches inflammatorisches Mikromilieu charakterisiert. So mangelt es an Sauerstoff, adäquaten Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Bestandteile untergegangener Zellen, schädliche Stoffwechselprodukte und ein unphysiologischer, zumeist saurer pH-Wert, Gewebedruck und eine unphysiologische Osmolarität machen den Zellen das Überleben schwer. Chronische Entzündungsprozesse fördern oder inhibieren Krebszellen in ihrem weiteren Wachstum. All diese Veränderungen im Tumormikromilieu wirken auf die Tumorigenese und Tumorprogression ein. Darüber hinaus übt die klinische Medizin mit ihren zumeist zytotoxischen Therapien Einfluss auf das Tumormikromilieu aus. Tumorzellen lernen sich anzupassen und Wege zu finden, wie sie trotz dieser Bedingungen überleben, proliferieren und in Körperabschnitte mit besseren Lebensbedingungen migrieren können. Die hier beschriebenen Anpassungsmechanismen aus einem Nährstoffmangel heraus machen Tumore resistenter und letztlich aggressiver. Aus dem weitergehenden Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und ihrem Tumormikromilieu können somit neue effiziente Therapiemethoden entwickelt werden.

In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass humane Kolon- und Pankreaskarzinome unter Nährstoffentzug zeitabhängig eine verminderte Zellproliferation aufweisen. Gleichzeitig versuchen die Tumorzellen auf molekularer Ebene sowie auf Proteinniveau vermehrt gegensteuernde Prozesse der Zellreparatur (*heat shock* Proteine), der Chemotherapieresistenz (*multiple drug resistance*) und der Inflammation (*Toll-like* Rezeptoren) in Gang zu bringen. Das könnte darauf hindeuten, dass einige wenige Tumorzellen versuchen, darüber den Nährstoffmangel zu überleben und somit resistenter zu werden. Ob der durchgeführte Nährstoffentzug zu einer Selektion von resistenteren Tumorzellen geführt hat oder durch Expressionssteigerung der untersuchten Gene bei einzelnen Krebszellen zu einem weiteren Überlebensvorteil führte, bleibt unklar.

In vorliegender Arbeit wurde das Gen CD133 untersucht, welches sich als ein teils kontrovers diskutierter Marker für Tumorstammzellen etabliert hat. Die Ergebnisse wurden wegen zu hoher Abweichungen zudem hier nicht weiter betrachtet.

Ein vermehrter Nachweis von CD133-positiven Zellen nach Nährstoffentzug würde eher für eine Selektion von hoch malignen Tumorstammzellen sprechen. Zum Beispiel wurde die Koexpression von ABCB5 und CD133 im malignen Melanom beschrieben, was nahe legt, dass ABCB5 von CD133-positiven Tumorstammzellen exprimiert wird [16]. Der Nachweis einer ähnlichen Koexpression im Pankreaskarzinom wie beim malignen Melanom würde diesen Verdacht erhärten. ABCB5 könnte auf eine Chemotherapieresistenz in soliden Tumorstammzellen hindeuten. Eine weitergehende Charakterisierung des Tumormikromilieus und der zellphysiologischen und biochemischen Prozesse im Kolon- und Pankreaskarzinom scheint großes Potential für einen umfassenderen Erkenntnisgewinn zur Entwicklung neuer und effizienterer Therapieoptionen zu beinhalten. Anstrengungen in dieser Richtung hegen die Hoffnung, in Zukunft eine Reduktion der Sterblichkeit beim Kolorektal- und Pankreaskarzinom zu erreichen.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μg	Microgram (= 10 ⁻⁶ l)
μl	Microliter (= 10 ⁻⁶ l)
5-FU	5-Fluorouracil
ABC	ATP-binding cassette
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1
ABCB5	ATP-binding cassette sub-family B member 5
ALDH	aldehyd dehydrogenase
ASR	altersstandardisierte Sterbeziffer
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Mycobacterium Bovis bacillus Calmette-Guérin
BCR-ABL	Fusionsgene aus BCR- Gen und ABL- Gen
BLC2	B-cell lymphoma-2
BRAF	B-Raf proto-oncogene

Abkürzung	Bedeutung
CD133	cluster of differentiation 133 (= PROM 1)
cDNA	complementary DNA
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CIS	carzinoma in situ
CSC	cancer stem cell (engl. Tumorstammzelle)
Ct-Wert	cycle threshold
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMPS	damage associated molecular patterns
DC	Dendritische Zellen
DNA	deoxyribonucleic acid
EGF	epidermal growth factor
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
ephA2	ephrin-Rezeptor-A2
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum

Abkürzung	Bedeutung
g	g-Kraft ($1g \approx 9,81m/s$)
GapDH	G lycerinaldehyd-3- p hosphat- D ehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCV	H epatitis- C - V irus
Her-2/neu	h uman e pidermal growth factor r eceptor 2
HMGB1	h igh m obility group b ox- <i>1</i>
HPV	H umane P apillom V iren
HRP	h orseradish p eroxidase
HSP	h eat shock p rotein
HSP70	h eat shock p rotein 70
HSP90	h eat shock p rotein 90
IGF-1	i nsulin-like growth factor 1
IL-10	I nterleukin- 10
ILGFBP-1	i nsulin-like growth factor- b inding P rotein 1
kDa	K ilodalton

Abkürzung	Bedeutung
KRK	K olorektales K arzinom
LLR	leucin-rich repeat
LPS	L ipopolysaccharides
m/v	Gewichtsprozent
mA	Microampere (= 10^{-6} A)
MDR	m ultiple d rug r esistance
MDR1	m ultidrug R esistance Protein 1
min	Minute
ml	Milliliter (= 10^{-3} l)
mRNA	m essenger R NA
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MW	Mittelwert
MyD88	m yeloid d ifferentiation primary response 88
NBD	N ukleotid b indungs d omänen
NF- κ B	n uclear factor ' k appa-light-chain-enhancer' of activated B -cells

Abkürzung	Bedeutung
<i>ng</i>	Nanogram ($0 \cdot 10^{-9}$)
NLR	n ucleotide-binding domain and l eucin rich repeat-containing r eceptor
Nm	Nanometer (= 10^{-9} m)
PAMP	p athogen-associated m olecular p attern
PBS	p hosphate- b uffered s aline
PCR	p olymerase c hain r eaction
PFHM II	p rotein f ree h ybridoma m edium
P-gp	P -Glykoprotein
PMS	p henazine m ethosulfate
PROM1	p rominin 1 (= CD133)
PRR	p attern r ecognition r eceptors
R	relative expression ratio
RLR	r etinoic acid-inducible gene I-like r eceptor
RNA	r ibonucleic a cid
RT-PCR	r everse t ranscription p olymerase c hain r eaction
s	Sekunde

Abkürzung	Bedeutung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamitgelelektrophorese
SP	side population
TGF- β	transforming Growth Factor- β
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR1	Toll-like Rezeptor 8
TLR10	Toll-like Rezeptor 10
TLR2	Toll-like Rezeptor 1
TLR3	Toll-like Rezeptor 2
TLR4	Toll-like Rezeptor 3
TLR5	Toll-like Rezeptor 4
TLR6	Toll-like Rezeptor 5
TLR7	Toll-like Rezeptor 6
TLR8	Toll-like Rezeptor 7
TLR9	Toll-like Rezeptor 9

Abkürzung	Bedeutung
TMD	Transmembranäre Domänen
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TP53	tumor protein p53
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UICC	Union internationale contre le cancer
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VEGF	vascular endothelial growth factor

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1: Genetisches Tumorprogressionsmodell für das kolorektale Karzinom [8]	3
Abbildung 2: Entwicklung zum Pankreaskarzinom über präneoplastische Gangläsionen [11, 12]	6
Abbildung 3: Flussdiagramm der Zellkulturen	41
Abbildung 4: GapDH Expression in HT29 Zellen	56
Abbildung 5: β -Aktin Expression in HT29 Zellen	56
Abbildung 6: GapDH Expression in PANC-1 Zellen	57
Abbildung 7: β -Aktin Expression in PANC-1 Zellen	57
Abbildung 8: GapDH Expression in MIA PaCa-2 Zellen	58
Abbildung 9: β -Aktin Expression in MIA PaCa-2 Zellen	58
Abbildung 10: HSP90 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	60
Abbildung 11: ABCB5 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	61
Abbildung 12: MDR1 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	61
Abbildung 13: TLR3 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	62
Abbildung 14: TLR7 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	63
Abbildung 15: TLR8 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	63
Abbildung 16: TLR9 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	64
Abbildung 17: TLR10 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	64
Abbildung 18: TLR4 Expression in HT29 Zellen nach Nährstoffentzug	65
Abbildung 19: HSP70 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	67
Abbildung 20: HSP90 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	67
Abbildung 21: ABCB5 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	68
Abbildung 22: TLR6 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	69
Abbildung 23: TLR7 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	70
Abbildung 24: TLR8 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	70
Abbildung 25: TLR9 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	71
Abbildung 26: TLR10 Expression in PANC-1 Zellen nach Nährstoffentzug	71
Abbildung 27: HSP70 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	73
Abbildung 28: MDR1 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	74

Abbildung 29: ABCB5 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	75
Abbildung 30: TLR2 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	76
Abbildung 31: TLR3 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	77
Abbildung 32: TLR4 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	77
Abbildung 33: TLR5 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	78
Abbildung 34: TLR6 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	78
Abbildung 35: TLR8 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	79
Abbildung 36: TLR9 Expression in MIA PaCa-2 Zellen nach Nährstoffentzug	79
Abbildung 37: Western Blot aus HT29-Zellen mit Nachweis von HSP90	80
Abbildung 38: Immunhistochemische Färbung von TLR6 an HT29-Zellen	81
Abbildung 39: Relative HT29-Zellproliferation im MTS Assay	82

9.2 Tabellen

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms	4
Tabelle 2: Stadieneinteilung des exokrinen Pankreaskarzinoms.....	7
Tabelle 3: TLR-Rezeptoren mit zugehörigen PAMPs, ihrer Lokalisation und ihren Adaptermolekülen [73, 74].....	18
Tabelle 4: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben.....	28
Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Herstellerangaben	29
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangaben.....	33
Tabelle 7: Verwendete Fertigansätze mit Herstellerangaben	34
Tabelle 8: Verwendete Primer mit Herstellerangaben	36
Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper mit Herstellerangaben	36
Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper mit Herstellerangaben.....	37
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien mit Ursprungsgewebe und Erstbeschreibung	37
Tabelle 12: Verwendete Kulturmedien und Zusätze mit Herstellerangaben.....	38
Tabelle 13: Zusammensetzung der verschiedenen Kulturmedien nach Zelllinie.....	40
Tabelle 14: Zyklusparameter der cDNA-Synthese.....	43
Tabelle 15: Zyklusparameter der RTq-PCR.....	45
Tabelle 16: Bradford-Reaktionsansatz für Probe und Blank.....	50
Tabelle 17: SDS-Page Probenansatz	51
Tabelle 18: Verwendete Primer mit Verdünnungen.....	52

10 Literaturverzeichnis

1. Hajdu, S.I. and F. Darvishian, *A note from history: landmarks in history of cancer, part 5*. Cancer, 2013. **119**(8): p. 1450-66.
2. Hajdu, S.I. and M. Vadmal, *A note from history: Landmarks in history of cancer, Part 6*. Cancer, 2013. **119**(23): p. 4058-82.
3. Robert Koch-Institut (Hrsg), *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis*. 2015, RKI: Berlin. p. 52ff.
4. Robert Koch-Institut (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017, RKI: Berlin. p. 16ff.
5. Riemann, J.F.H. and B.M. Adam, *Gastroenterologie - Das komplette Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Vol. 1. Auflage. 2010, Stuttgart: Thieme. 2077.
6. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
7. Weinberg, R.A., *the biology of cancer*. 2007, New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LCC. 403ff.
8. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. **61**(5): p. 759-67.
9. Cascinu, S. and S. Jelic, *Pancreatic cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2009. **20 Suppl 4**: p. 37-40.
10. Hruban, R.H., R.E. Wilentz, and A. Maitra, *Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer*. Methods Mol Med, 2005. **103**: p. 1-13.
11. Hruban, R.H., et al., *Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(5): p. 579-86.
12. Werner, J. and M.W. Büchler, *Pankreaskarzinom: ein Schritt vorwärts in der Behandlung*. Dtsch med Wochenschr, 2011. **136**(36): p. 1807-1810.
13. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
14. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Genome Res, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
15. Linton, K.J., *Structure and function of ABC transporters*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 122-30.
16. Frank, N.Y., et al., *ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4320-33.
17. Szakacs, G., et al., *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 219-34.
18. Longley, D.B. and P.G. Johnston, *Molecular mechanisms of drug resistance*. J Pathol, 2005. **205**(2): p. 275-92.
19. Hu, T., et al., *Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(30): p. 6876-89.
20. König, J., et al., *Expression and localization of human multidrug resistance protein (ABCC) family members in pancreatic carcinoma*. Int J Cancer, 2005. **115**(3): p. 359-67.
21. Pang, L., et al., *ATP-Binding Cassette Genes Genotype and Expression: A Potential Association with Pancreatic Cancer Development and Chemoresistance?* Gastroenterol Res Pract, 2014. **2014**: p. 414931.
22. Dai, C., S. Dai, and J. Cao, *Proteotoxic stress of cancer: implication of the heat-shock response in oncogenesis*. J Cell Physiol, 2012. **227**(8): p. 2982-7.

23. Ritossa, F., *Discovery of the heat shock response*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 97-8.
24. Lindquist, S., *The heat-shock response*. Annu Rev Biochem, 1986. **55**: p. 1151-91.
25. Morimoto, R.I., et al., *The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones*. Essays Biochem, 1997. **32**: p. 17-29.
26. Jee, H., *Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review*. J Exerc Rehabil, 2016. **12**(4): p. 255-9.
27. Craig, E.A., B.D. Gambill, and R.J. Nelson, *Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis*. Microbiol Rev, 1993. **57**(2): p. 402-14.
28. Benjamin, I.J. and D.R. McMillan, *Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 1998. **83**(2): p. 117-32.
29. Balch, W.E., et al., *Adapting proteostasis for disease intervention*. Science, 2008. **319**(5865): p. 916-9.
30. Salim, S. and D.C. Eikenburg, *Role of 90-kDa heat shock protein (Hsp 90) and protein degradation in regulating neuronal levels of G protein-coupled receptor kinase 3*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(3): p. 1106-12.
31. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. Exp Biol Med, 2003. **228**(2): p. 111-33.
32. Neckers, L. and P. Workman, *Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet?* Clin Cancer Res, 2012. **18**(1): p. 64-76.
33. Calderwood, S.K., et al., *Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(3): p. 164-72.
34. Wu, J., et al., *Heat Shock Proteins and Cancer*. Trends Pharmacol Sci, 2017. **38**(3): p. 226-256.
35. Kawabe, M., et al., *Heat shock protein 90 inhibitor 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin enhances EphA2+ tumor cell recognition by specific CD8+ T cells*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6995-7003.
36. Murphy, C.G. and S. Modi, *HER2 breast cancer therapies: a review*. Biologics, 2009. **3**: p. 289-301.
37. Ahn, J.Y., et al., *Acquired resistance to 5-fluorouracil via HSP90/Src-mediated increase in thymidylate synthase expression in colon cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(32): p. 32622-33.
38. Gress, T.M., et al., *Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma*. Cancer Res, 1994. **54**(2): p. 547-51.
39. Saluja, A. and V. Dudeja, *Heat shock proteins in pancreatic diseases*. J Gastroenterol Hepatol, 2008. **23 Suppl 1**: p. S42-5.
40. Aghdassi, A., et al., *Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 616-25.
41. Lee, C.C., A.M. Avalos, and H.L. Ploegh, *Accessory molecules for Toll-like receptors and their function*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 168-79.
42. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-45.
43. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
44. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
45. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
46. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis*. Biochemistry (Mosc), 2008. **73**(5): p. 555-61.

47. Ohashi, K., et al., *Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 558-61.
48. Vabulas, R.M., H. Wagner, and H. Schild, *Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **270**: p. 169-84.
49. Vabulas, R.M., et al., *HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15107-12.
50. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. J Biol Chem, 2002. **277**(17): p. 15028-34.
51. Dybdahl, B., et al., *Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4*. Circulation, 2002. **105**(6): p. 685-90.
52. Vabulas, R.M., et al., *The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20847-53.
53. Roelofs, M.F., et al., *Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2006. **176**(11): p. 7021-7.
54. Park, J.S., et al., *High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(3): p. C917-24.
55. Park, J.S., et al., *Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7370-7.
56. Liu-Bryan, R., et al., *Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2936-46.
57. Liu-Bryan, R., et al., *TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 5016-23.
58. Guillot, L., et al., *Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4*. J Immunol, 2002. **168**(12): p. 5989-92.
59. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10229-33.
60. Johnson, G.B., et al., *Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5233-9.
61. Termeer, C., et al., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 99-111.
62. Jiang, D., et al., *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1173-9.
63. Maruyama, K., et al., *Innate immunity and cancer therapy*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(3): p. 350-7.
64. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
65. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
66. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 253-8.
67. Muzio, M., et al., *The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2097-101.

68. Schnare, M., et al., *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.
69. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(1): p. 57-63.
70. Oldenburg, M., et al., *TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1111-5.
71. Shi, Z., et al., *A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus*. J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4517-24.
72. Lee, J.Y., L. Zhao, and D.H. Hwang, *Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids*. Nutr Rev, 2010. **68**(1): p. 38-61.
73. Venugopal, P.G., T.B. Nutman, and R.T. Semnani, *Activation and regulation of toll-like receptors (TLRs) by helminth parasites*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 252-63.
74. Tsung, K. and J.A. Norton, *Lessons from Coley's Toxin*. Surg Oncol, 2006. **15**(1): p. 25-8.
75. Simons, M.P., M.A. O'Donnell, and T.S. Griffith, *Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer*. Urol Oncol, 2008. **26**(4): p. 341-5.
76. Virchow, R., *Aetiologie der neoplastischen Geschwülste/Pathogenie der neoplastischen Geschwülste*. Virchow, R., editor. Die krankhaften Geschwülste, 1863: p. 57-101.
77. Pradere, J.P., D.H. Dapito, and R.F. Schwabe, *The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer*. Oncogene, 2014. **33**(27): p. 3485-95.
78. Kolb, R., et al., *Inflammasomes in cancer: a double-edged sword*. Protein Cell, 2014. **5**(1): p. 12-20.
79. van Noort, J.M. and M. Bsibsi, *Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair*. Prog Brain Res, 2009. **175**: p. 139-48.
80. Li, X., S. Jiang, and R.I. Tapping, *Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival*. Cytokine, 2010. **49**(1): p. 1-9.
81. Kluwe, J., A. Mencin, and R.F. Schwabe, *Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(2): p. 125-38.
82. Garay, R.P., et al., *Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help*. Eur J Pharmacol, 2007. **563**(1-3): p. 1-17.
83. D'Agostini, C., et al., *Antitumour effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions*. Int Immunopharmacol, 2005. **5**(7-8): p. 1205-12.
84. Meraldi, V., et al., *OM-174, a new adjuvant with a potential for human use, induces a protective response when administered with the synthetic C-terminal fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of Plasmodium berghei*. Vaccine, 2003. **21**(19-20): p. 2485-91.
85. Lacarrubba, F., et al., *Successful treatment and management of large superficial basal cell carcinomas with topical imiquimod 5% cream: a case series and review*. J Dermatolog Treat, 2011. **22**(6): p. 353-8.
86. Salaun, B., et al., *TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4894-901.
87. Pidgeon, G.P., et al., *The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease*. Br J Cancer, 1999. **81**(8): p. 1311-7.
88. Harme, J.H., et al., *Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion*. Int J Cancer, 2002. **101**(5): p. 415-22.

89. Luo, J.L., et al., *Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(3): p. 297-305.
90. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(6): p. 1869-81.
91. Grimmig, T., et al., *TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer*. *Int J Oncol*, 2015. **47**(3): p. 857-66.
92. Sato, Y., et al., *Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment*. *Cancer Microenviron*, 2009. **2 Suppl 1**: p. 205-14.
93. Sato, T., et al., *Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy*. *Immunol Res*, 2011. **51**(2-3): p. 170-82.
94. Abdullah, L.N. and E.K. Chow, *Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells*. *Clin Transl Med*, 2013. **2**(1): p. 3.
95. Ma, J. and M.H. Frank, *Tumor initiation in human malignant melanoma and potential cancer therapies*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010. **10**(2): p. 131-6.
96. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
97. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, *Primary bioassay of human tumor stem cells*. *Science*, 1977. **197**(4302): p. 461-3.
98. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
99. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. *Nature*, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
100. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. *Nature*, 2007. **445**(7123): p. 106-10.
101. Chaudhary, P.M. and I.B. Roninson, *Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells*. *Cell*, 1991. **66**(1): p. 85-94.
102. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. *Nat Med*, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
103. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
104. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY*. *J Gen Physiol*, 1927. **8**(6): p. 519-30.
105. Potter, V.R., *The biochemical approach to the cancer problem*. *Fed Proc*, 1958. **17**(2): p. 691-7.
106. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
107. Mathew, R. and E. White, *Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011. **76**: p. 389-96.
108. Lee, C., L. Raffaghello, and V.D. Longo, *Starvation, detoxification, and multidrug resistance in cancer therapy*. *Drug Resist Updat*, 2012. **15**(1-2): p. 114-22.
109. Jenkins, D.E., E.A. Auger, and A. Matin, *Role of RpoH, a heat shock regulator protein, in Escherichia coli carbon starvation protein synthesis and survival*. *J Bacteriol*, 1991. **173**(6): p. 1992-6.
110. Lee, C., et al., *Reduced levels of IGF-I mediate differential protection of normal and cancer cells in response to fasting and improve chemotherapeutic index*. *Cancer Res*, 2010. **70**(4): p. 1564-72.

111. Flavahan, W.A., et al., *Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake*. Nat Neurosci, 2013. **16**(10): p. 1373-82.
112. Rausch, V., et al., *Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment*. J Pathol, 2012. **227**(3): p. 325-35.
113. von Kleist, S., et al., *Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor*. J Natl Cancer Inst, 1975. **55**(3): p. 555-60.
114. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. Int J Cancer, 1975. **15**(5): p. 741-7.
115. Yunis, A.A., G.K. Arimura, and D.J. Russin, *Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase*. Int J Cancer, 1977. **19**(1): p. 128-35.
116. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
117. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
118. de Jonge, H.J., et al., *Evidence based selection of housekeeping genes*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e898.
119. Mehta, R., et al., *Validation of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis of human visceral adipose samples*. BMC Mol Biol, 2010. **11**: p. 39.
120. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
121. Towbin, H., *Origins of protein blotting*. Methods Mol Biol, 2009. **536**: p. 1-3.
122. Rich, P.R., et al., *The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **202**(2): p. 181-7.
123. Ried, W., *Formazane und Tetrazoliumsälze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe*. Angewandte Chemie, 1952. **64**(14): p. 391-396.
124. Promega Corporation, *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin, #TB112, 1ff.* 2012.
125. Tan, S., et al., *Identification of valid housekeeping genes for quantitative RT-PCR analysis of cardiosphere-derived cells preconditioned under hypoxia or with prolyl-4-hydroxylase inhibitors*. Molecular Biology Reports, 2012. **39**(4): p. 4857-4867.
126. Izuishi, K., et al., *Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 6201-7.
127. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
128. Chen, W.S., et al., *Identification of heat shock protein 90alpha as an IMH-2 epitope-associated protein and correlation of its mRNA overexpression with colorectal cancer metastasis and poor prognosis*. Int J Colorectal Dis, 2011. **26**(8): p. 1009-17.
129. Williams, R.S., et al., *Human heat shock protein 70 (hsp70) protects murine cells from injury during metabolic stress*. Journal of Clinical Investigation, 1993. **92**(1): p. 503.
130. Tanaka, M., et al., *Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96785.
131. Sato, K., et al., *Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9677-84.
132. Dong, D., et al., *Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5785-91.

133. Notarbartolo, M., et al., *Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins)*. *Cancer Lett*, 2002. **180**(1): p. 91-101.
134. Ding, R., et al., *A role for ABCG2 beyond drug transport: Regulation of autophagy*. *Autophagy*, 2016. **12**(5): p. 737-51.
135. Li, Y.J., et al., *Autophagy and multidrug resistance in cancer*. *Chin J Cancer*, 2017. **36**(1): p. 52.
136. Paredes-Juarez, G.A., et al., *DAMP production by human islets under low oxygen and nutrients in the presence or absence of an immunisolating-capsule and necrostatin-1*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 14623.
137. Grimm, M., et al., *Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumourigenesis and tumour progression*. *Eur J Cancer*, 2010. **46**(15): p. 2849-57.
138. Komar, G., et al., *Decreased blood flow with increased metabolic activity: a novel sign of pancreatic tumor aggressiveness*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(17): p. 5511-7.
139. Hingorani, S.R., et al., *Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(5): p. 469-83.
140. Olive, K.P., et al., *Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer*. *Science*, 2009. **324**(5933): p. 1457-61.
141. Zhan, H.X., et al., *Crosstalk between stromal cells and cancer cells in pancreatic cancer: New insights into stromal biology*. *Cancer Lett*, 2017. **392**: p. 83-93.
142. Chiavarina, B. and A. Turtoi, *Collaborative and Defensive Fibroblasts in Tumor Progression and Therapy Resistance*. *Curr Med Chem*, 2017. **24**(26): p. 2846-2859.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. C.-T. Germer, Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ohne seine bereitwillige Unterstützung und Zurverfügungstellung von Arbeitsplatz und Materialien wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit zu erstellen.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser und bei Herrn Prof. Dr. Martin Gasser für Bereitstellung von Thematik und Mitteln, für die stetige Motivation, für ihr Interesse und ihre Geduld zu erklären und für die strukturierte Anleitung bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in der Molekularen Onkoimmunologie, insbesondere Frau Dr. Tanja Grimmig, Frau Sabine Müller und Frau Mariola Dragan ergeht ein weiterer Dank für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit und der angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an meine Frau. Trotz der vielen Aufgaben, die wir in den letzten Jahren bewältigen mussten, konnte sie mir dennoch immer wieder Freiräume schaffen, um mein Ziel der Promotion zu erlangen.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Johannes Christian Schmitt
Geburtsdatum/-ort: 18.02.1984 in Homburg/Saar

BERUF

11/2012 - 11/2014 Chirurgische Klinik, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
11/2014 - 03/2017 Abteilung für Innere Medizin, Krankenhaus Tauberbischofsheim
04/2017 - 06/2018 Internisten am Dominikanerplatz, Würzburg
07/2018 – aktuell Niederlassung als Facharzt für Allgemeinmedizin, Rimpar

STUDIUM DER HUMANMEDIZIN

04/2005 - 07/2005 Universität Regensburg, Bayern
10/2005 - 05/2012 Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Bayern
03/2008: 1. Staatsexamen Humanmedizin
05/2012: 2. Staatsexamen Humanmedizin

PRAKTISCHES JAHR

02/2011 - 06/2011 Medizinische Klinik und Poliklinik, UKW
06/2011 - 09/2011 Chirurgische Klinik, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
10/2011 - 01/2012 Universitäts-Frauenklinik, UKW

SCHULE UND AUSBILDUNG

08/1995 - 06/2004 Cusanus Gymnasium, Sankt Wendel
Allgemeine Hochschulreife
07/2001 - 05/2002 Westerville North High School, Columbus, Ohio
Internationaler Jugendaustausch
10/2004 - 11/2005 Rettungsdienstschule Saar, Lebach
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Würzburg, den 10.11.2021