Universitätsklinikum Ulm
Abteilung für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Der Einfluss von CK19 auf die Differenzierung und Malignität von Leber- und Cholangiokarzinomen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von
Cornelia Schupp
Geb. in Aschaffenburg
2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Knippschild

Tag der Promotion: 16. Februar 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... - iii -

1 Einleitung ..... - 1 -
1.1 Leberkarzinome ..... - 1 -
1.1.1 Epidemiologie ..... - 1 -
1.1.2 Klassifikation und Pathogenese der Leberkarzinome ..... - 1 -
1.1.3 Tumorstammzellen in Leberkarzinomen ..... - 4 -
1.2 Einfluss von Inflammation und Trp53-Verlust auf die Hepatokarzinogenese ..... - 6 -
1.2.1 NF-κB als Mediator chronischer Inflammation in der Leber ..... - 6 -
1.2.2 Trp53 als Tumorsuppressor in der Leber ..... - 6 -
1.2.3 Mausmodell der leberspezifischen Inflammation durch NF-κB-Aktivierung ..... - 7 -
1.2.4 Mausmodell der *Trp53*-Deletion ..... - 8 -
1.2.5 Mauskohorten zur Untersuchung von Inflammation und Trp53-Verlust in der Hepatokarzinogenese ..... - 8 -
1.3 Zytokeratin 19 in Lebergewebe und -karzinomen ..... - 11 -
1.3.1 Zytokeratine als Zellstrukturproteine und Tumormarker ..... - 11 -
1.3.2 CK19 als Marker für Cholangiozyten und hepatische Progenitorzellen ..... - 12 -
1.3.3 CK19 als negativer prognostischer Faktor und potentieller Tumorstammzellmarker in HCCs ..... - 13 -
1.3.4 CK19-Expression in ICCs ..... - 14 -
1.3.5 CK19-Expression in HCC-CCs ..... - 14 -
1.4 CRISPR/Cas9 als vielseitige Methode zur Genomeditierung ..... - 15 -
1.5 Zielsetzung der Arbeit ..... - 16 -
2 Material und Methoden ..... - 17 -
2.1 Material ..... - 17 -
2.1.1 Laborgeräte ..... - 17 -
2.1.2 Gebrauchswaren ..... - 20 -
2.1.3 Chemikalien ..... - 22 -
2.1.4 Lösungen ..... - 25 -
2.1.5 Systeme ..... - 28 -
2.1.6 Antikörper ..... - 30 -
2.1.7 Plasmide und Bakterienstämme ..... - 30 -
2.1.8 Primer ..... - 31 -
2.1.9 Software ..... - 32 -
2.2 Methoden ..... - 33 -
2.2.1 Histologische Verfahren ..... - 33 -
2.2.2 Molekularbiologische Methoden ..... - 36 -

2.2.3 Zellbiologische Methoden ..... - 46 -
2.2.4 Transplantationsversuch ..... - 53 -
2.2.5 Statistik ..... - 54 -
3 Ergebnisse ..... - 55 -
3.1 Untersuchung der CK19-Expression in Lebertumoren transgener Mäuse ..... - 55 -
3.1.1 Erhöhte CK19-Proteinexpression in ICCs und HCC-CCs von Mäusen mit leberspezifisch deletiertem *Trp53* ..... - 56 -
3.1.2 Erhöhte CK19-mRNA-Expression in gemischt differenzierten Tumoren von Mäusen mit leberspezifisch deletiertem *Trp53* ..... - 57 -
3.1.3 Korrelation der CK19-Expression mit der Expression der hepatischen Progenitor-/ Stammzellmarker CD24 und CD133 ..... - 57 -
3.2 Der Einfluss von CK19 in Cholangiokarzinomzelllinien ..... - 61 -
3.2.1 Induktion eines stabilen CK19-Knockouts in den Cholangiokarzinomzelllinien SZ-1 und TFK-1 mittels CRISPR/Cas9..... - 61 -
3.2.2 Der Einfluss von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomzellen .... - 62 -
4 Diskussion ..... - 70 -
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse ..... - 70 -
4.2 Untersuchung der CK19-Expression in Lebertumorgewebe transgener Mauskohorten ..... - 70 -
4.2.1 Transgene Mauskohorten der Hepatokarzinogenese auf Basis von leberspezifischer Entzündung und Trp53-Verlust..... - 70 -
4.2.2 Immunhistochemie ..... - 71 -
4.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion..... - 72 -
4.2.4 Geringe CK19-Expression in ICCs als Ausdruck einer hepatozytären Abstammung oder Tumordedifferenzierung ..... - 73 -
4.2.5 Erhöhte CK19-Expression in gemischt differenzierten Tumoren transgener Mäuse mit leberspezifisch deletiertem *Trp53* ..... - 74 -
4.2.6 Zusammenhang der CK19-Expression mit hepatischen Progenitor-/ Stammzellmarkern ..... - 78 -
4.3 Der Einfluss von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomzellen ..... - 81 -
4.3.1 Induktion eines stabilen CK19-Knockouts in CC-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 ..... - 81 -
4.3.2 Untersuchung der Malignität von Cholangiokarzinomzellen in Abhängigkeit von CK19 ..... - 82 -
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick ..... - 88 -
5 Zusammenfassung ..... - 89 -
6 Literaturverzeichnis ..... - 92 -
Anhang ..... - 106 -

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	HepPar1	*Hepatocyte Parrafin 1*
µg	Mikrogramm	HPCs	hepatische Progenitorzellen
µl	Mikroliter	Hz	Hertz
µm	Mikrometer	ICC	Intrahepatisches Cholangiokarzinom
3D	3-dimensional	*IG*	*intraductal-growing* (intraduktal wachsend)
ABC	ATP-Bindungskassette	IHC	Immunhistochemie
ACH	*air change per hour* (Luftwechsel pro Stunde)	IKK2	Inhibitor der κB-Kinase
AFP	α-Fetoprotein	IRES	interne ribosomale Eintrittsstellen
AG	Arbeitsgruppe	IκB	κB-Inhibitor
ALDH	Aldehyddehydrogenase	Kan^r:	Kanamycinresistenzgen
Alfp	Albumin α-fetoprotein	kb	Kilobasen
APS	Ammoniumpersulfat	kDa	kiloDalton
ASH	Alkoholische Steatohepatitis	ko	knockout
ATP	Adenosin-Triphosphat	*KRT19*	Keratin 19
bp	Basenpaare	LAP	*Liver-enriched transcriptional activator protein*
BSA	Bovine Serumalbumin-Lösung	LB	*lysogeny broth*
$CaCl_2$	Kalziumchlorid	LMP	*Low melting point* (niedriger Schmelzpunkt)
CAIKK2	Konstitutiv aktive IKK2-Isoform (IkB-Kinase);	mA	Milliampere
Cas9	*CRISPR associated*	MEM	*Minimum Essential Medium*
CC	Cholangiokarzinom	*MF*	*mass-forming*
CD13	*cluster of differentiation 13* = Alanin-Aminopeptidase	MgCl2	Magbesiumchlorid
CD133	*cluster of differentiation 133* = Prominin-1	mM	Millimol
CD24	*cluster of differentiation 24*	mRNA	messengerRNA
CD44	*cluster of differentiation 44*	n	Stichprobengröße

CD47	*cluster of differentiation 47*	Na_3VO_4	Natriumorthovanadat
CD90	*cluster of differentiation 90* = Thy-1-Membran-Glykoprotein	NASH	Nicht-Alkoholische Steatohepatitis
cDNA	komplementäre DNA	NEMO	NF-κB *essential modulator*
CFU	*Colony forming unit* (koloniebildende Einheit)	NF-κB	*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
Chrom-A	Chromogranin-A	ng	Nanogramm
CK	Zytokeratin	nm	Nanometer
CMV	Cytomegalovirus	nM	Millimol
CO_2	Kohlenstoffdioxid	OD^{600}	Optische Dichte bei 600 Nanometern
Cre-ER^{T2}	Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase (Fusionsprotein)	OV-6	*Oval-Cell*-Marker
CRISPR	*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*	p	Signifikanzwert
crRNA:	CRISPR-Ribonukleinsäure	PAM	*protospacer adjacent motif (Protospacer*-Nachbarmotiv)
Ct	*Cycle threshold* (Zyklus-Schwelle)	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CYFRA 21-1	Zytokertin-19-Fragment	PD-L1	*programmed death ligand 1*
d	Tag	PFA	Paraformaldehyd
ddH_2O	Doppelt destilliertes Wasser	PI	periduktal-infilitrierend
dH_2O	Destilliertes Wasser	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*	PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
DMSO	Dimethylsulfoxid	pUC ori	*origin of replication (*Replikationsursprung)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PVDF	Polyvinylidenfluorid

DSMZ	Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
DTT	Dithiothreitol	r	Rangkorrelationskoeffizient
E.coli	Escherichia coli	rel.	relativ
ECC	Extrahepatisches Cholangiokarzinom	RFP	rot fluoreszierendes Protein
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*	scICC	spindelzellige oder sarcomatoide ICC
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SD	Standardabweichung
EGF	*epidermal growth factor* (Epidermaler Wachstumsfaktor)	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat -Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ELS	*Ectopic Lymphoid Structures* (ektopische lymphoide Strukturen)	SP	Seitenpopulation
EMT	epithelial-mesenchymale Transition	TACE	transarterielle Chemoembolisation
et al.	et alii	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
FACS	*Fluorescence Activated Cell Sorting* (Durchflusszytometrie)	TBS-T	*Tris-buffered saline with Tween20*
FBS	*Fetal Bovine Serum* (Fetales Kälberserum)	TEMED	Tetramethylethylendiamin
FGF-β	*basic fibroblast growth factor* (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)	TGF-β	*Transforming Growth Factor beta* (Transformierender Wachstumsfaktor)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	tracrRNA	*transactivating crRNA*
GI	Gastrointestinal	TRE	*Tetracycline response promotor element*
GP73	Golgi-Protein-73	tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator
GPI	Glykosylphosphatidylinositol	U6	humaner U6 Promotor
gRNA	*guide* Ribonukleinsäure	UpM	Umdrehungen pro Minute
H&E	Hämatoxylin und Eosin	UV	Ultraviolett

H_2O_2	Wasserstoffperoxid	V	Volt
HBV	Hepatitis B Virus	VEGF	*vascular endothelial growth factor* (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom	VEGFR-2	*Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor 2*
HCC-CC	Kombiniertes hepato- und cholangiozelluläres Karzinom	WHO	World Health Organisation
HCV	Hepatitis C Virus	wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Leberkarzinome

1.1.1 Epidemiologie

Leberkrebs stellte 2020 mit 4,7 % aller malignen Tumorerkrankungen weltweit die sechsthäufigste Krebsart und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache dar [99]. Die höchsten Inzidenzen und Mortalitätsraten sah man in Südostasien, Ostasien und einigen Ländern Nord- und Westafrikas, mit höheren Raten unter der männlichen Bevölkerung. Zurückzuführen ist dies auf die Verbreitung der häufigsten Risikofaktoren für das hepatozelluläre Karzinom: HBV- und HCV-Infektion, Aflatoxin B1-Ingestion und die alkoholische Steatohepatitis (ASH) [99]. Eine höhere Prävalenz von Übergewicht, Diabetes und der häufig damit einhergehenden nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) führt auch in entwickelten Ländern zu einem Anstieg der Inzidenz [99].

1.1.2 Klassifikation und Pathogenese der Leberkarzinome

Der Großteil der primären Lebertumore sind Karzinome. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt mit 75-85 % den häufigsten Vertreter dar, gefolgt vom intrahepatischen Cholangiokarzinom (ICC; 10-15 %) und dem gemischt differenzierten oder kombinierten HCC-CC (2-5 %) [112].

1.1.2.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom ist der häufigste primäre Lebertumor und mit einer schlechten Prognose assoziiert. Im inoperablen Stadium beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 5 %. Ein längeres Überleben kann nur bei kleinen Tumoren durch Resektion, Lebertransplantation oder lokale Behandlung wie Radiofrequenzablation und TACE (transarterielle Chemoembolisation) erreicht werden [58,112]. Als systemische *first-line*-Therapie in fortgeschrittenen Stadien wird in den aktuellen Leitlinien eine Kombination aus dem PD-L1(*programmed death ligand 1*)-Inhibitor Atezolizumab und dem monoklonalen VEGF(*vascular endothelial growth factor*)-Antikörper Bevacizumab empfohlen [58]. Eine kürzlich publizierte Phase-3-Studie zeigte ein besseres Outcome der Kombination beider Medikamente (Azetolizumab + Bevacizumab) im Vergleich zu Sorafenib alleine, was zu einem Paradigmenwechsel in der systemischen *first-line*-Therapie bei inoperablem HCC geführt hat [23]. Die Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib und Lenvatinib kommen weiterhin in

der *second line*-Therapie zum Einsatz [50,58]. Bei Progress unter Sorafenib können zudem die Multikinaseinhibitoren Regorafenib und Cabozantinib sowie der monoklonale VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor 2)*-Antikörper Ramucirumab angewendet werden [1,7,58,130].

Ca. 80 % der HCCs entstehen auf dem Boden chronischer Entzündung mit konsekutiver Leberfibrose und -zirrhose, die im Rahmen chronischer Virushepatitiden, der alkoholischen und nicht-alkoholischen Steatohepatitis und seltener erblicher Erkrankungen wie Hämochromatose, Glykogenspeichererkrankungen oder Tyrosinämie auftritt. Ein weiterer Faktor in der Hepatokarzinogenese ist das Schimmelpilzgift Aflatoxin B1, welches in der Leber karzinogen wirkt [112,129]. Die Hepatokarzinogenese erfolgt üblicherweise sequentiell und geht mit einer Akkumulation klonaler molekularer Veränderungen einher. In zirrhotischem Lebergewebe formen sich dysplastische Noduli, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 9-31% entarten [112]. Aus den frühen, gut differenzierten HCCs können sich fortgeschrittene und weniger differenzierte Karzinome entwickeln. Gemeinsam ist allen HCCs die morphologische und immunhistochemische Ähnlichkeit zu Hepatozyten [82,112]. Aus diesem Grund wird angenommen, dass HCCs durch maligne Transformation aus Hepatozyten entstehen, was auch in *lineage-tracing*-Versuchen bestätigt wurde [25,73,121]. Ein Progenitorzellursprung kann insbesondere bei Tumoren, die Marker hepatischer Progenitorzellen exprimieren, nicht ausgeschlossen werden (s. Abschnitt 1.3.3) [18,57].

1.1.2.2 Intrahepatisches Cholangiokarzinom (ICC)

Der zweithäufigste primäre Lebertumor, das intrahepatische Cholangiokarzinom, ist mit einer noch schlechteren Prognose vergesellschaftet als HCCs [56]. Eine Resektion als einzige kurative Therapie ist aufgrund des fortgeschrittenen Tumorstadiums bei Diagnosestellung nur selten möglich [111]. Auch nach Resektion kommt es häufig zu Rezidiven. Weltweit ist in den letzten Jahren die Inzidenz von ICCs gestiegen, vermutlich bedingt durch eine höhere Inzidenz der Risikofaktoren Diabetes, Adipositas und NASH in entwickelten Ländern [30,112]. Eine geographische Häufung zeigt sich in Südostasien, insbesondere in Thailand und Südkorea, wo Leberegelinfektionen weit verbreitet sind [26,111,112]. In den meisten Fällen entwickeln sich ICCs jedoch in gesundem Lebergewebe [111]. ICCs stellen bezüglich Histologie, Pathogenese und Klinik eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren dar, denen eine cholangiozelluläre Differenzierung gemeinsam ist [112]. Neue Erkenntnisse zu

klinisch-pathologischen Eigenschaften und molekularen Veränderungen haben zu einer differenzierteren Einteilung der ICCs geführt.

Die aktuelle WHO-Tumorklassifikation übernimmt die histologische Unterteilung der ICCs von Nakanuma et al. in *Large duct* und *Small duct* ICCs [74,75]. *Small duct* ICCs entstehen im peripheren Lebergewebe und haben mit chronischen Virushepatitiden und nicht-biliärer Zirrhose dieselben Risikofaktoren wie HCCs [129]. Ihren Ursprung haben *Small duct* ICCs in kleinen interlobulären Gallengängen oder den Hering-Kanälchen, den Schaltstücken zwischen Gallenkanälchen und interlobulären Gallengängen [2]. Die klinisch-pathologische Ähnlichkeit von HBV-assoziierten ICCs und HBV-assoziierten HCCs lässt einen ähnlichen Entstehungsmechanismus beider Entitäten und möglicherweise einen Progenitorzellursprung vermuten [129]. Andererseits konnten Sekiya et al. die Entstehung von ICCs aus Hepatozyten über den Notch-Signalweg in zirrhotisch geschädigter Leber von Mäusen nachweisen [91].

Large duct ICCs entstehen proximal in den großen intrahepatischen Gallengängen oder den assoziierten peribiliären Drüsen und ähneln sowohl in Klinik als auch in Histologie den extrahepatischen Cholangiokarzinomen (ECC) [44]. Auch die Risikofaktoren entsprechen denen von ECCs und umfassen die primär sklerosierende Cholangitis, Hepatolithiasis und die Infektion mit Leberegeln [2]. Weitere seltene Risikofaktoren sind Gallengangsmalformationen wie das Caroli-Syndrom, oder die chemische Exposition gegenüber Karzinogenen wie Zigarrettenrauch, Asbest oder Thorotrast [112]. Die Entwicklung von *Large duct* ICCs aus peribiliären Drüsenzellen oder intraduktalen prämalignen Läsionen der großen Gallengänge wird angenommen [2].

Extrahepatische Cholangiokarzinome (ECCs) gehören laut Definition nicht zu den primären Leberkarzinomen, sondern zu den malignen biliären Tumoren. ECCs entstehen in den großen Gallenwegen und werden abhängig von der anatomischen Lokalisierung unterteilt in perihiläre (den Ductus hepaticus dexter oder sinister sowie deren Zusammenfluss betreffend) und distale Cholangiokarzinome (im Bereich des Ductus hepaticus communis und Ductus choledochus entstehend) [44]. Die häufigsten Risikofaktoren sind analog zu *large duct* ICCs PSC, Hepatolithiasis und Leberegelinfektionen [112]. Ein Großteil der ECCs entsteht auf der Basis von Vorläuferläsionen, den intraduktalen papillären Neoplasien oder den biliären intraepithelialen Neoplasien [112].

1.1.2.3 Gemischt differenziertes Karzinom (HCC-CC)

Bei den seltenen gemischt differenzierten Karzinomen (HCC-CCs) treten sowohl Anteile hepatozellulärer als auch cholangiozellulärer Differenzierung im selben Tumor auf. Ätiologie und klinische Präsentation ähneln HCCs und ICCs und auch das Gesamtüberleben nach Resektion liegt zwischen beiden Tumorentitäten [56]. In histologischen Schnitten werden oft am Übergang der beiden Tumorkomponenten oder an den Tumorrändern kleine Zellen mit schmalem Zytoplasmasaum und hyperchromatischen Nuclei beobachtet, die hepatischen Progenitor- bzw. Stammzellen entsprechen [112]. Über den zellulären Ursprung von HCC-CCs herrscht noch kein Konsens. Der Nachweis der Klonalität beider Tumoranteile und die Expression von Stammzellmarkern unterstützt einen möglichen Progenitorzellursprung [8,13,128]. Das vermehrte Auftreten von HCC-CCs nach TACE ist ein Hinweis auf eine mögliche Transdifferenzierung von HCCs [51].

1.1.3 Tumorstammzellen in Leberkarzinomen

Das Modell der Tumorstammzellen besagt, dass ein maligner Tumor aus einem heterogenen Zellkonglomerat besteht, von denen eine Subpopulation Stammzelleigenschaften aufweist. Diese Eigenschaften umfassen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien, eine hohe Proliferationskapazität und die Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie. Den Tumorstammzellen oder auch tumorinitiierenden Zellen wird eine wichtige Rolle in der Entstehung, dem Fortschreiten und der Entwicklung von Rezidiven und Metastasen vieler Krebsarten zugeschrieben [14,25]. Da sich die Tumorstammzellen meist im Ruhezustand befinden, können sie Chemotherapeutika entgehen, die vor allem stark proliferierende Zellen angreifen. Efflux-Pumpen, die Medikamente aktiv aus der Zelle hinausschleusen, verstärken diesen Effekt [69]. Wegen dieser Merkmale ist es für eine nachhaltig wirksame Krebstherapie essentiell, Tumorstammzellen in verschiedenen Krebsarten zu erforschen und in Zukunft möglicherweise als therapeutisches Ziel zu nutzen. Um die Stammzelleigenschaften von Subpopulationen zu untersuchen, werden verschiedene *in vivo* und *in vitro* Methoden angewandt. Die tumorinitiierenden Fähigkeiten können durch (1) Transplantationsversuche in immundefiziente Mäuse, (2) das Kolonieformationsassay, (3) das *Sphere Formation Assay* und (4) die Hoechst-Seitenpopulationsmethode analysiert werden. Im Transplantationsversuch werden potentiell Stammzellmarker-positive gegenüber Stammzellmarker-negativen Populationen eines Tumors oder Tumorzelllinie in unterschiedlichen Konzentrationen in immun-defiziente Mäuse subkutan transplantiert, um deren

tumorinitiierende Eigenschaften zu untersuchen. Beim Kolonieformationsassay, auch *Clonogenic Assay* genannt, wird die Kolonienbildung vereinzelter Tumorzellen beobachtet, während beim *Sphere Formation Assay* die Fähigkeit zur Tumorsphärenbildung in einer nicht-adherenten und serumfreien Umgebung analysiert wird [69]. Die Hoechst-Seitenpopulationsmethode (SP) ist eine Durchflusszytometrietechnik, die verwendet wird, um Stammzellen basierend auf den Farbstoffefflux-Eigenschaften der ATP-Bindungskassettentransporter (ABC-Transporter) zu erhalten. Die SP-Zellen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, den fluoreszierenden DNA-Bindungsfarbstoff Hoechst 33342 durch ihre ABC-Transporter abzuleiten. SP-Zellen sind durch Stammzelleigenschaften charakterisiert, welche die Selbsterneuerungskapazität, das Differenzierungspotential und die Expression von ABC-Multidrug Transportern umfasst [31,69].

Verschiedene Faktoren fördern einen Stammzellphänotyp in Tumorzellen, darunter EMT (epithelial-mesenchymale Transition), epigenetische Veränderungen, selektive Stimuli wie Chemotherapie, oder die Interaktion mit einer Mikroumgebung [25]. Man nimmt an, dass Tumorstammzellen in Stammzellnischen vorkommen, einer spezifischen Mikroumgebung aus Immunzellen, Fibroblasten, mesenchymalen (Stamm)Zellen, löslichen Faktoren und Extrazellulärmatrix, die Stammzelleigenschaften fördern und diese schützen [64,69]. Auch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), bei der Tumorzellen epitheliale Eigenschaften, z.B. Zellpolarität und Zell-Zell-Adhäsion, ablegen und einen invasiveren, mesenchymalen Charakter erlangen, ist eng mit Tumorstammzellen verknüpft. EMT ist charakterisiert durch den Verlust der Expression epithelialer Marker, wie E-Cadherin, und die Hochregulierung mesenchymaler Marker, wie Vimentin. Dadurch können sich Tumorzellen aus dem Zellverband lösen und Sekundärtumore zu bilden [25,46,69].

Aufgrund der Tendenz von Leberkarzinomen zu Rezidiven, Metastasen und Chemoresistenz, liegt die Existenz von Tumorstammzellen nahe und scheint nach aktuellem Forschungsstand sehr wahrscheinlich [25]. Die Identifizierung von Markern für hepatische Tumorstammzellen stellt Forscher vor eine große Herausforderung. Flores-Télles et al. führen dies auf das Nebeneinander verschiedener Subpopulationen von Tumorstammzellen innerhalb von HCCs und auf deren Interkonversion untereinander und mit nicht-Tumorstammzellen zurück [25]. Eine Reihe von Markern, darunter EpCAM, CD133, CD44, CD13, CD90, CD24, OV-6, CD47 und ALDH, wurden zur Isolierung von Tumorstammzellen in HCCs verwendet [64]. Auch Zytokeratin 19 (CK19) wurde in HCCs als

Tumorstammzellmarker postuliert (s. Abschnitt 1.3.3) [40]. In ICCs wurden tumorinitiierende Zellen durch die Oberflächenmarker CD24, CD44, CD133, CXCR4 und EpCAM charakterisiert [69]. Keiner dieser Marker ist jedoch spezifisch für hepatische Tumorstammzellen oder alleine ausreichend, um diese zu identifizieren. Vielmehr muss die Expression im Kontext mit weiteren Markern oder Signalwegen gesehen werden, die mit Stammzelleigenschaften verknüpft sind [25].

1.2 Einfluss von Inflammation und Trp53-Verlust auf die Hepatokarzinogenese

1.2.1 NF-κB als Mediator chronischer Inflammation in der Leber

Leberfibrose und -zirrhose entstehen auf der Grundlage chronischer Lebererkrankungen und sind ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Leberkarzinomen [82]. In diesem Kontext findet bei den meisten chronischen Lebererkrankungen (ASH, NASH, viralen Hepatitiden und PBC) eine Aktivierung des NF-κB-Signalwegs als Reaktion auf Hepatozytenschädigung statt [80,101]. Über zwei Mechanismen fördert NF-κB die Entstehung von Karzinomen. Zum einen führen proinflammatorische Signale zu Leberfibrose und -zirrhose. Dabei werden Immunzellen rekrutiert und hepatische Sternzellen aktiviert, die dadurch in Extrazellulärmatrix-produzierende Myofibroblasten umgewandelt werden [97]. Zum Anderen schützt NF-κB transformierte Hepatozyten über anti-apoptotische Signale vor dem Zelltod [80]. Andererseits scheint eine basale NF-κB-Aktivität die Tumorentstehung über anti-apoptotische Signale zu verhindern. Durch die Inhibierung der Apoptose von Hepatozyten wird eine kompensatorische Hyperproliferation verhindert, die eine höhere Wahrscheinlichkeit für onkogene Mutationen mit sich bringt [118].

1.2.2 Trp53 als Tumorsuppressor in der Leber

Mutationen im *Trp53*-Gen zählen zu den häufigsten Mutationen in primären Leberkarzinomen und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [105,111,113]. In 12-48 % aller HCCs und bis zu 77 % aller ICCs sind *Trp53*-Mutationen festzustellen, wobei die Prävalenz von Risikofaktoren abhängt [45,112,131]. Besonders häufig finden sich Mutationen bei Aflatoxin B1- oder HBV-induzierten HCCs und ICCs aufgrund von HBV oder Parasitenbefall [21,45,95,112]. Als „Wächter des Genoms“ reguliert der Tumorsuppressor Trp53 nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die zu Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur führen. Durch Mutationen im *Trp53*-Gen wird dieser Kontrollpunkt umgangen

und es kommt zu genomischer Instabilität und schließlich maligner Transformation durch die unkontrollierte Proliferation geschädigter Zellen [45]. Zudem induziert Trp53 die Differenzierung embryonaler Stammzellen und beschränkt die Fähigkeit von Stammzellen zur Selbsterneuerung. In HCCs sind *Trp53*-Mutationen mit schlechter Differenzierung, schlechtem Überleben und einer Stammzell-ähnlichen Genexpression assoziiert [101,113]. Die Arbeit von Katz et al. konnte zeigen, dass eine leberspezifische *Trp53*-Deletion im Mausmodell zur Bildung von gemischt differenzierten Karzinomen führt, die assoziiert sind mit der Dedifferenzierung von Hepatozyten und einer erhöhten Fähigkeit zur Selbsterneuerung von hepatischen Progenitorzellen [39].

Um den Einfluss von Trp53-Verlust und chronischer Inflammation auf die Hepatokarzinogenese zu untersuchen, wurden von Dr. André Lechel und Kollegen verschiedene transgene Mauskohorten etabliert und publiziert [39,101]. Im Mausmodell der Sequenz von IKK2/NF-κB-Aktivierung und Trp53-Verlust wurde ein Cre-LoxP-System zur *Trp53*-Deletion mit dem Tet-Off-System einer konstitutiv aktiven IKK2-Expression kombiniert. Beide Systeme sind leberspezifisch und induzierbar.

1.2.3 Mausmodell der leberspezifischen Inflammation durch NF-κB-Aktivierung

Eine leberspezifische und induzierbare Aktivierung des NF-κB-Signalwegs wurde durch eine konstitutiv aktive IKK2 (*Inhibitor of κB-Kinase)*-Isoform unter Kontrolle eines Tetrazyklin-Transaktivators erreicht. Der Hepatozyten-spezifische LAP-Promotor führt zur Expression des Tetrazyklin-Transaktivator-Elements. Im Tet-Off-System bindet dieses Element in Abwesenheit von Doxyzyklin das *Tetracycline response promotor element* (TRE) und ermöglicht so die Expression der nachgeschalteten konstitutiv aktiven IKK2-Isoform (CAIKK2). Die Phosphorylierung von IκB (*Inhibitor of κB*) durch IKK2 im IkB-Kinase-Komplex führt zur Ubiquitinylierung und somit Abbau des Inhibitors. Der dadurch frei gewordenene NF-*κB*-Komplex kann in den Nucleus eintreten und als Transkriptionsfaktor die Expression pro-inflammatorischer und anti-apoptotischer Gene induzieren. Doxyzyklin bindet den Tetrazyklin-Transaktivator und verhindert so die Expression von CAIKK2 [101].

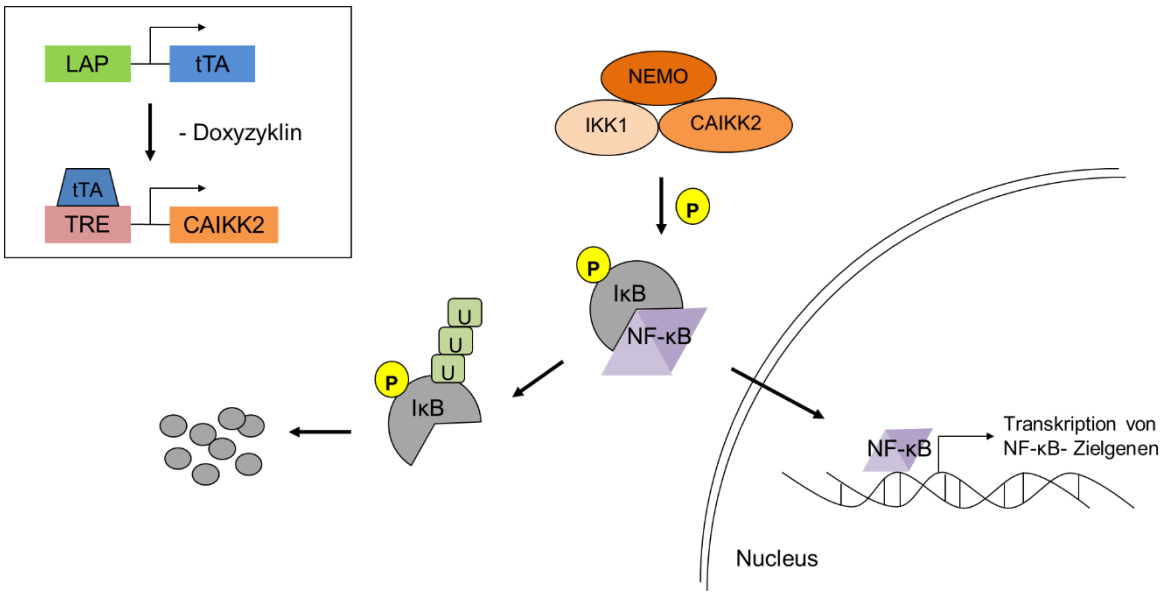

Abbildung 1: Tet-Off-System der leberspezifischen NF-κB-Aktivierung im transgenen Mausmodell

Unter Kontrolle des hepatozytenspezifischen LAP-Promotors wird tTA exprimiert, das in Abwesenheit von Doxyzyklin an TRE bindet und zur Transkription von CAIKK2 führt. CAIKK2 bildet mit NEMO und IKK1 den IκB-Kinase-Komplex und phosphoryliert IκB. IκB wird ubiquitinyliert und abgebaut, wodurch NF-κB frei wird, in den Nukleus diffundiert und zur Transkription proinflammatorischer und anti-apoptotischer Gene führt.; **LAP**: Liver-enriched transcriptional activator protein ; **tTA**: Tetrazyklin Transaktivator; **TRE**: Tetrazyklin-Transaktivator; **CAIKK2**: Konstitutiv aktive IKK2-Isoform (IkB-Kinase); **NEMO**: NF-κB *essential modulator;* **IκB**: κB-Inhibitor [101]

1.2.4 Mausmodell der *Trp53*-Deletion

Die *Trp53*-Deletion wurde durch ein induzierbares Cre-LoxP-System herbeigeführt. Unter Kontrolle des Leber-spezifischen Alfp-Promotors wird die Cre-Rekombinase Cre-ER^{T2} exprimiert. Diese Cre-ER^{T2}-Rekombinase weist eine mutierte Form der Liganden-Bindungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors auf. Durch Bindung von Tamoxifen kann die Rekombinase zu einem beliebigen Zeitpunkt aktiviert werden und in den Zellkern einwandern. Hier erfolgt die Rekombination der beiden loxP-*Sites* des *Trp53*-Allels an Intron 1 und Intron 10 und damit die Deletion von *Trp53* [77,101].

Ein früher Trp53-Verlust bereits im embryonalen Stadium wurde durch ein nicht-induzierbares Cre-LoxP-System erzielt. Die Expression der Cre-Rekombinase erfolgt unter Kontrolle des Leber-spezifischen Alfp-Promotors [39].

1.2.5 Mauskohorten zur Untersuchung von Inflammation und Trp53-Verlust in der Hepatokarzinogenese

Es wurde die Expression von hepatischen Tumorstammzellmarkern in Leberkarzinomgewebe aus verschiedenen transgenen Mauskohorten untersucht, die chronische

Leberentzündung und leberspezifischen Trp53-Verlust kombinieren. Durch Kreuzung wurden Mäuse generiert, die eine konstitutiv aktive IKK2 (CAIKK2) und gleichzeitig eine induzierbare *Trp53*-Deletion aufweisen (AlfpCreER^{T2}+, *Trp53*$^{loxP/loxP}$, CAIKK2+, LAP-tTA+), Mäuse die nur CAIKK2 exprimieren (AlfpCreER^{T2}-, *Trp53*$^{loxP/loxP}$, CAIKK2+, LAP-tTA+) und Cre-Kontroll-Mäuse (AlfpCreER^{T2}+, *Trp53*$^{+/+}$). Von der Verpaarung bis zur Geburt wurde den Tieren oral Doxyzyklin verabreicht, um eine embryonale NF-κB-Überexpression zu verhindern. Allen drei Kohorten wurde im Alter von 4 Wochen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen Tamoxifen intraperitoneal injiziert, wodurch in der CAIKK2 p53-/- Kohorte die Cre-Rekombinase aktiviert und die *Trp53*-Deletion induziert wurde [101]. In bereits publizierten Ergebnissen konnten Svinarenko et al. zeigen, dass eine konstitutiv aktive IKK2 in der Mausleber zur Entstehung von Leberkarzinomen auf der Grundlage chronischer Leberentzündung und -fibrose führt. In Kombination mit leberspezifischem Trp53-Verlust kommt es zu einer erhöhten Tumorlast und einem Shift der Tumordifferenzierung von hauptsächlich HCCs (79%) in der CAIKK2 Kohorte zu ICCs (49%) in der CAIKK2 p53-/- Kohorte [101].

Außerdem sollte in dieser Arbeit die Expression von Stammzellmarkern in Leberkarzinomgewebe von Mäusen untersucht werden, die eine embryonale *Trp53*-Deletion aufweisen (AlfpCre+, *Trp53*$^{loxP/loxP}$) [39]. Durch Kreuzung dieser Tiere mit der CAIKK2-Maus wurde eine Kohorte generiert, die CAIKK2 und einen embryonalen Trp53-Verlust zeigt (AlfpCre+, *Trp53*$^{loxP/loxP}$, CAIKK2+, LAP-tTA+) [101]. Eine Übersicht über Geno- und Phänotyp der untersuchten Mauskohorten ist Abbildung 2 zu entnehmen. Aus Gründen der Übersicht wurde in die Phänotypbezeichnung der verschiedenen Mauskohorten die Bezeichnung p53 für den Tumorsuppressor 53 verwendet.

AlfpCreER^{T2}+, Trp53+/+	**p53+/+** → Cre-Kontrolle
AlfpCreER^{T2}-, Trp53$^{loxP/loxP}$; *CAIKK2+, LAP-tTA+*	**CAIKK2** → Entzündung
AlfpCreER^{T2}+, Trp53$^{loxP/loxP}$, Tamoxifen mit 4 Wochen; *CAIKK2+, LAP-tTA+*	**CAIKK2 p53-/- mit 4 Wo.** → Entzündung und *Trp53*-Deletion später
AlfpCre+, Trp53$^{loxP/loxP}$, *CAIKK2+, LAP-tTA+*	**CAIKK2 p53-/- embryonal** → Entzündung und *Trp53*-Deletion früh
AlfpCre+, Trp53$^{loxP/loxP}$	**p53-/- embryonal** → *Trp53*-Deletion früh

Abbildung 2: Geno- und Phänotyp der Mauskohorten zur Untersuchung von leberspezifischer Inflammation und p53-Verlust

Alfp: *Albumin α-fetoprotein-enhancer promoter*; **CreER^{T2}**: Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase (Fusionsprotein); **p53**: Tumorsuppressor 53; **CAIKK2**: Konstitutiv aktive IKK2-Isoform (IkB-Kinase); **LAP**: *Liver-enriched transcriptional activator protein* ; **tTA**: Tetrazyklin Transaktivator

Die Tiere wurden im Alter von 28 – 50 Wochen analysiert, auf Lebertumore und Metastasen untersucht und Tumor- sowie Lebergewebe wurde zur weiteren Untersuchung eingebettet und eingefroren. Das entnommene Tumorgewebe wurde anhand immunhistochemischer Marker (CK7 für cholangiozelluläre und CK8/18 für hepatozelluläre Differenzierung) oder anhand histomorphologischer Merkmale durch die Referenzpathologie der Ruhr-Universität Bochum unter Leitung von Prof. Dr. Andrea Tannapfel bestimmt. Während die p53+/+ Kontroll-Gruppe keine Tumore im Analysezeitraum entwickelte, bildeten sich in der CAIKK2 Kohorte bei 27,5 % der Mäuse Tumore [101]. In der CAIKK2 p53-/- (4 Wochen) Kohorte entwickelten 52 % der Mäuse Tumore, während alle Mäuse mit CAIKK2 und embryonalem Trp53-Verlust Tumore bekamen. Ein reiner embryonaler p53-Verlust ohne Leberentzündung führte bei 12 % der Mäuse innerhalb von 50 Wochen zur Bildung von Tumoren (s. Abb. 3A) [39]. Auch bezüglich der Tumorentitäten unterschieden sich die Kohorten deutlich. Während es in der CAIKK2-Gruppe vorwiegend zur Entstehung von HCCs kam, führte der zusätzliche leberspezifische Trp53-Verlust zu einem Shift im Tumorspektrum hin zu ICCs [101]. Eine embryonale leberspezifische *Trp53*-Deletion ohne Leberentzündung führte zur Bildung von überwiegend gemischt differenzierten Tumoren (s. Abb. 3B) [39].

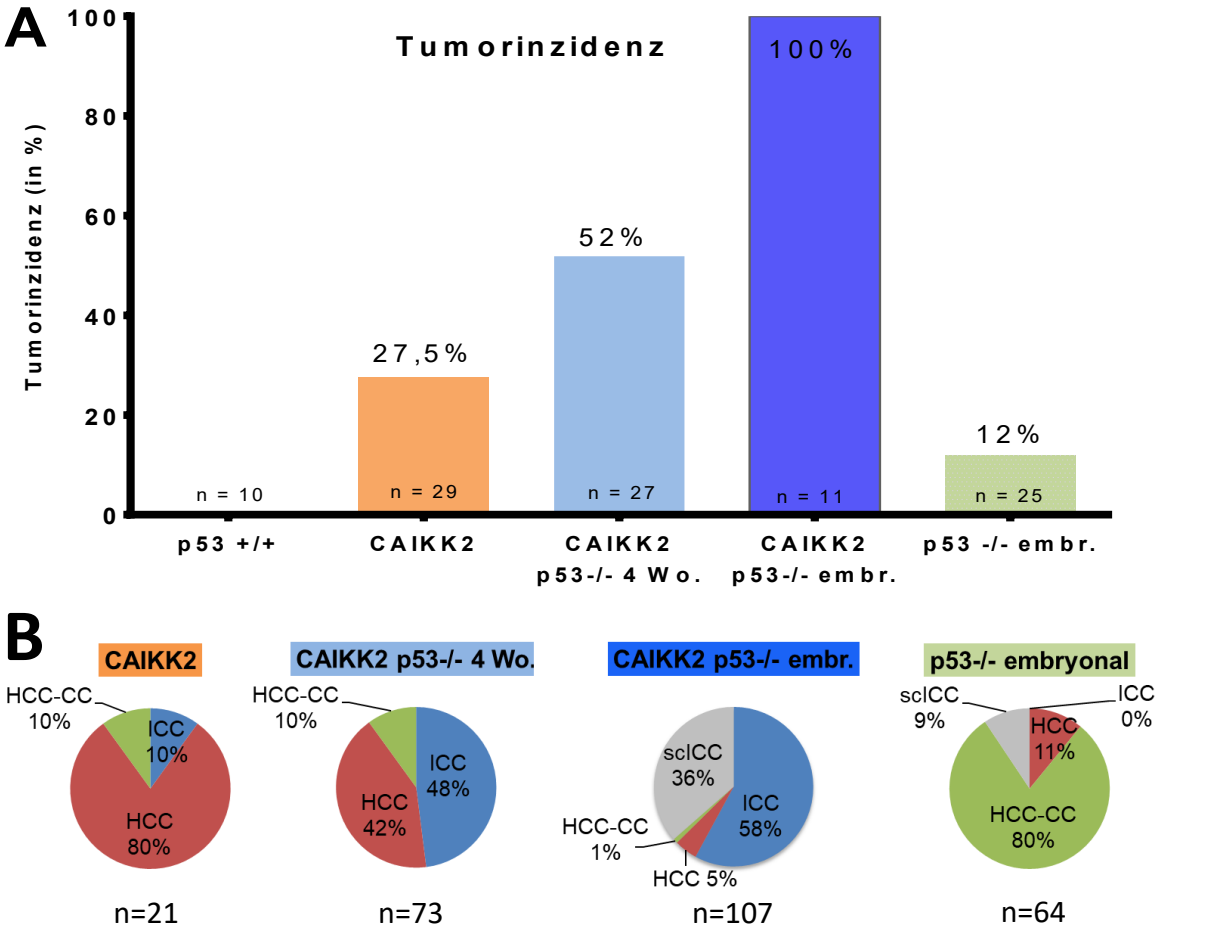

Abbildung 3: leberspezifische *Trp53*-Deletion und chronische Leberentzündung induzieren die Bildung von Leberkarzinomen unterschiedlicher Differenzierung

A: Tumorinzidenz in % von 28-50 Wochen alten Mäusen der p53+/+-, CAIKK2-, CAIKK2 Trp53-/- 4 Wo.-, CAIKK2 Trp53-/- embryonal- und Trp53-/- embryonal-Kohorte; n=10-29; **B:** Anteil verschiedener Tumorentitäten (HCC, ICC, HCC-CC und scICC = spindelzellige oder sarcomatoide ICC) in % der CAIKK2-, CAIKK2 Trp53-/- 4 Wo.-, CAIKK2 Trp53-/- embryonal- und Trp53-/- embryonal-Kohorte. n=21-107. [39,101]

1.3 Zytokeratin 19 in Lebergewebe und -karzinomen

1.3.1 Zytokeratine als Zellstrukturproteine und Tumormarker

(Zyto)keratine gehören zu den Intermediärfilamenten und sind ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen. Im menschlichen Genom gibt es 54 funktionelle Keratin-gene, von denen etwa die Hälfte ausschließlich in Haaren und Haarfollikeln vorkommt (Keratine 25–86) [72]. Die nicht haarspezifischen Zytokeratine werden nach einer Klassifikation von Moll et al. von 1982 in 2 Gruppen unterteilt: die sauren Typ I Zytokeratine CK9–20, und die basischen Typ II Zytokeratine CK1–CK8 [3,71]. Beide Gruppen wurden im Laufe der Jahre durch neue Vertreter ergänzt: CK23-24 (Typ I) und CK76-80 (Typ II) [72]. Für

gewöhnlich bilden je ein Typ I und ein Typ II Keratin ein Heterodimer in Form einer *coiled-coil* Struktur, die wiederum als Tetramere zu Protofilamenten assoziieren. Als Beispiel kann die Dimerbildung von CK8 und CK18 in einfachen Epithelien angeführt werden [4,19]. Zu den Hauptaufgaben von Zytokeratinen gehören die Aufrechterhaltung der mechanischen Zellstabilität und -polarität, sowie die Zell-Adhäsion über Interaktion mit Desmosomen und Hemidesmosomen [11,89]. Weiterhin scheinen Zytokeratine eine Rolle bei der zellulären Stressantwort, der Signaltransduktion, der Wundheilung, der Apoptose und dem Proteintransport in der Zelle zu spielen [35,72]. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Intermediärfilamente werden Zytokeratine fast ausschließlich in Epithelien exprimiert und folgen einem spezifischen Expressionsmuster abhängig von Gewebetyp, Differenzierung und Entwicklungsstadium [12]. Während in mehrschichtigen Epithelien vor allem CK1-6 und CK9-17 vorkommen, findet man in einfachen Epithelien überwiegend CK7, CK8 und CK18-20 [71]. Da Karzinomzellen in den meisten Fällen die Keratinexpression ihrer Ursprungszelle beibehalten, finden Zytokeratine breite Anwendung in der histopathologischen Klassifizierung von Karzinomen [4]. So kann die CK7/CK20 Immunfärbung bei der Differenzierung von Lebertumoren in HCCs (häufig CK7–/CK20–), Cholangiokarzinome (meist CK7+/CK20–) und Metastasen von kolorektalen Karzinomen (meist CK7–/CK20+) herangezogen werden [12].

1.3.2 CK19 als Marker für Cholangiozyten und hepatische Progenitorzellen

Zytokeratin 19 stellt mit seiner Proteingröße von 40 kDa den kleinsten Vertreter der Typ I Zytokeratine dar. Das humane *KRT19*-Gen liegt auf Chromosom 17 und beinhaltet nur 5 Introns im Gegensatz zu 7-8 Introns anderer Keratine. Auch bezüglich der Proteinstruktur nimmt CK19 durch das Fehlen einer nicht-α-helicalen Schwanzdomäne eine Sonderstellung unter den Zytokeratinen ein. CK19 wird in verschiedensten Geweben exprimiert, unter anderem in gastrointestinalen Epithelien, Urothel, renalen Sammelrohren, Brustdrüsenepithel, respiratorischem Epithel, Mesothel und mehrschichtig-unverhorntem Plattenepithel [3,71]. Häufig zeigt CK19 eine Koexpression mit CK7. In Geweben, die keine CK7-Expression aufweisen, wie beispielsweise intestinalem Epithel, findet eine Dimerbildung mit CK8 statt [72]. Entsprechend der weitverbreiteten Expression in physiologischen Epithelien, sind auch viele Karzinome CK19-positiv, darunter Adenokarzinome des GI-Traktes und der Lunge, Mesotheliome, Urothelkarzinome, duktale Mammakarzinome, Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs und papilläre Schilddrüsenkarzinome [12,78,87].

In physiologischem Lebergewebe wird CK19 gemeinsam mit CK7, CK8 und CK18 in Cholangiozyten exprimiert, während Hepatozyten CK8 und CK18 exprimieren und keine CK7- oder CK19-Expression zeigen [35,59]. Auch hepatische Progenitorzellen (HPCs), nach der Form ihres Zellkerns bei Nagern ovale Zellen genannt, sind positiv für CK19 [83]. Sie liegen im periportalen Feld entlang der Hering-Kanälchen und entstehen dort aus ruhenden fakultativen Stammzellen [17]. Die bipotenten HPCs können als Reaktion auf Leberschäden sowohl zu Cholangiozyten als auch zu Hepatozyten differenzieren und zeigen ein Expressionsmuster, das Marker von Hepatozyten und Cholangiozyten vereint (s.Abb. 4) [17,83]. Bei starker Progenitorzell-Aktivierung bilden hämatopoetische Stammzellen ein Reservoir für HPCs und wandern in die geschädigte Leber ein [59]. Im Rahmen chronischer Leberschädigung über einen langen Zeitraum konnte in Mäusen die Regeneration von Hepatozyten durch CK19-positive Cholangiozyten beobachtet werden [16].

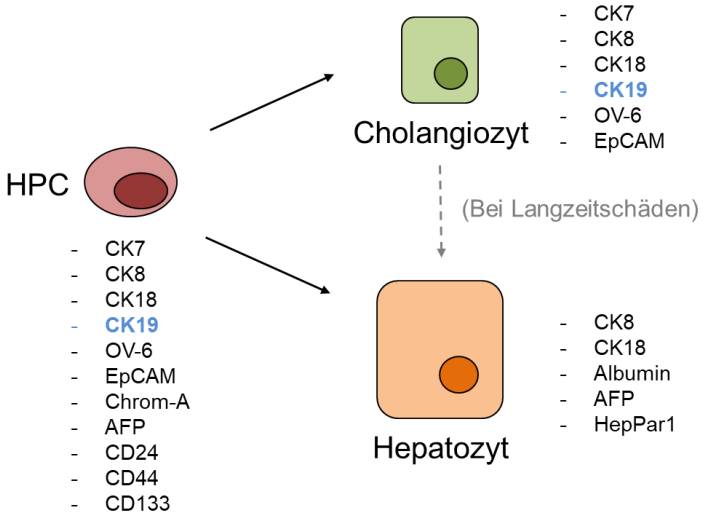

Abbildung 4: Expressionsmuster und Differenzierung von HPC (hepatischen Progenitorzellen)

Bipotente HPCs exprimieren Cholangiozyten- und Hepatozytenmarker und können zu beiden Zelltypen differenzieren. Bei Langzeit-Leberschäden wurde eine Transdifferenzierung von Cholangiozyten zu Hepatozyten beobachtet. **OV-6**: *Oval-Cell*-Marker; **EpCAM**: *Epithelial Cell Adhesion Molecule*; **AFP**: α-Fetoprotein; **Chrom-A**: Chromogranin-A; **HepPar1**: *Hepatocyte Parrafin 1 [16,17,35,59,83]*

1.3.3 CK19 als negativer prognostischer Faktor und potentieller Tumorstammzellmarker in HCCs

Obwohl die Mehrzahl der HCCs CK19-negativ ist, gibt es eine Untergruppe von CK19-positiven Tumoren, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. In verschiedenen Patientenkohorten beträgt der Anteil CK19-positiver Tumore 10 – 35 % und korreliert mit schlechter Differenzierung, invasivem Wachstum, postoperativen Rezidiven und Metastasierung [55,106,115,123]. Zudem wurde CK19 mehrfach als unabhängiger prädiktiver Faktor für ein schlechteres Gesamtüberleben nach Tumorresektion bestätigt [40,46,56,98]. Auch *in vitro* führte CK19 in HCC-Zellen zu invasiverem Wachstum, erhöhter Chemoresistenz und Angiogenese sowie einer Hemmung von Apoptose und Seneszenz [29,103]. Der

Enstehungsmechanismus dieser aggressiveren und biliär differenzierten HCCs wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Zum Einen wären hepatische Progenitorzellen als Ursprung dieser Tumore denkbar [18]. Zum Anderen könnte es im Verlauf der Hepatokarzinogenese zu einer Dedifferenzierung der Tumorzellen und damit schrittweisen Aneignung eines Progenitorzell-Phänotyps kommen [48,57,73,90,121].

Die schlechte Prognose und die Assoziation der CK19-Expression mit anderen Tumorstammzellmarkern, wie EpCAM und CD133, führte zur Bezeichnung von CK19 als *stemness-related marker* in der Leber [29,40,46]. Kawai et al. postulieren CK19 sogar als Tumorstammzellmarker in HCCs. Sie konnten zeigen, dass CK19-positive HCC-Zellen *in vitro* schneller proliferieren, mehr Kolonien aus Einzelzellen bilden und resistent gegenüber 5-Fluorouracil sind [40]. In Xenotransplantationsversuchen bildeten CK19-positive Tumorzellen größere Tumore und differenzierten teilweise zu CK19-negativen Zellen. CK19-positive HCC-Zellen zeigen somit wichtige Eigenschaften von Tumorstammzellen (s. Abschnitt 1.1.3): Selbstreplikation, Differenzierung in verschiedene Zelllinien, Chemoresistenz und die Fähigkeit zur Tumorinitiierung *in vivo* [40].

1.3.4 CK19-Expression in ICCs

CK19 gilt gemeinsam mit CK7 als Marker für Cholangiokarzinome. Der Anteil der CK19-positiven Cholangiokarzinome variiert je nach Studie zwischen 85 % und 100 % [53,62]. Für ICCs liegt der Anteil bei 77 – 100 % [15,86,93,126]. Shimonishi et al. sahen eine erhöhte CK19-Expression in gut differenzierten ICCs im Vergleich zu schlechter differenzierten ICCs, was auf einen Verlust der CK19-Expression während der Dedifferenzierung der Tumore hinweise [93]. In einer kleineren Stichprobe fanden Demarez et al. keinen Zusammenhang zwischen der CK19-Expression in ICCs und dem histologischen Differenzierungsgrad [15]. Liu et al. beschreiben jedoch ein schlechteres Gesamtüberleben und häufigere Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit ICCs, die viel CK19 exprimieren [62]. Auch das lösliche CK19-Fragment CYFRA 21-1 ist im Serum von ICC-Patienten mit Tumorprogression und schlechtem postoperativem Outcome assoziiert [107]. Ein eindeutiger Effekt der CK19-Expression auf die Malignität von ICCs lässt sich im Gegensatz zu HCCs nicht ausmachen.

1.3.5 CK19-Expression in HCC-CCs

80 – 100 % der HCC-CCs und damit ein ähnlicher Anteil wie bei ICCs, sind immunhistochemisch positiv für CK19 [13,126-128]. In HCC-CCs aus Mäusen mit leberspezifisch

deletiertem *Trp53* konnte sowohl die Expression von CK19 als auch des Hepatozytenmarkers Albumin nachgewiesen werden [39]. Wie in Abschnitt 1.1.2.3 beschrieben, bestehen HCC-CCs aus Anteilen mit HCC-Morphologie und Teilen mit ICC-Differenzierung. An den Übergängen beider Komponenten und in der Peripherie werden zudem hepatische Progenitor- oder Stammzellen beobachtet. Eine Positivität für CK19 ist in cholangiozytär differenzierten Anteilen und Progenitorzellen üblich und kann anhand der Zellmorphologie interpretiert werden [8].

1.4 CRISPR/Cas9 als vielseitige Methode zur Genomeditierung

Die Entdeckung von CRISPR *(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)* in Prokaryoten und dessen Mechanismus in Verbindung mit Cas *(CRISPR-associated)* hat zur Entwicklung einer relativ einfachen und vielfältigen Methode zur gezielten Genomveränderung geführt [36,60]. Breite Anwendung findet CRISPR/Cas9 in der Forschung, beispielsweise in der Entwicklung transgener Tiere und Pflanzen oder der Herstellung gezielt veränderter Zelllinien, um Krankheitsmechanismen aufzudecken und neue Therapien zu entwickeln, sowie möglicherweise bald in der Gentherapie [60].

Für Bakterien ist CRISPR/Cas als Teil des adaptiven Immunsystems ein potenter Abwehrmechanismus gegen Viren und Plasmide. In das Bakteriengenom werden bei Erstkontakt kurze virale DNA-Sequenzen, sogenannte *protospacer* integriert, die bei Reinfektion zur Transkription von pre-crRNA (pre-CRISPR-RNA) führen. Nach enzymatischer Spaltung entsteht die zur Ziel-DNA komplementäre reife CRISPR-RNA (crRNA). Mithilfe der crRNA, die die Zielsequenz bindet, kann die Endonuklease Cas gezielt einen Doppelstrangbruch proximal der PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif:* NGG) im nicht-komplementären DNA-Strang der Fremd-DNA induzieren (s. Abb. 5). In den Typ-II-Systemen, zu denen auch CRISPR/Cas9 gehört,

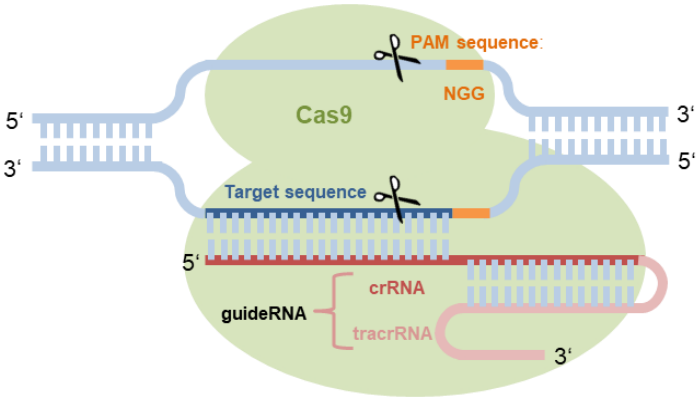

Abbildung 5: Induktion von Doppelstrangbrüchen durch CRISPR/Cas9

CRISPR: *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats;* **Cas9**: *CRISPR associated protein;* **PAM**: *protospacer adjacent motif;* **crRNA**: *CRISPR RNA;* **tracrRNA**: *transactivating crRNA*

wird zur Prozessierung der pre-crRNA und zur Erkennung der Ziel-DNA zusätzlich eine transaktivierende RNA (tracrRNA) benötigt, die mit der crRNA eine Basenpaarung eingeht. Jinek et al. ist es gelungen, crRNA und tracrRNA in einer einzigen chimären RNA zusammenzufügen (hier *guideRNA* genannt) und so ein effizientes und vielseitiges Tool zur gezielten Genom-Editierung zu kreieren [36]. Durch endogene DNA-Raparaturprozesse, insbesondere *non-homologous end-joining,* werden Insertionen oder Deletionen begünstigt, die zu einem Gen-Knockout führen [60]. In der vorliegenden Arbeit wurde CRISPR/Cas9 zur Generierung eines Knockouts des CK19 Gens in Cholangiokarzinomzelllinien verwendet.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Trotz weltweiter Anstrengungen zur Bekämpfung von Risikofaktoren für Leberkarzinome, wie viraler Hepatitiden, sind primäre Leberkarzinome noch immer auf Platz sechs der weltweit häufigsten Krebsarten [99]. Die oft späte Diagnosestellung gepaart mit limitierten therapeutischen Möglichkeiten und der Tendenz zu Metastasierung und Rezidiven macht aus Leberkarzinomen außerdem die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache weltweit [99,112]. Das Aufdecken der Mechanismen von Tumorentstehung und -progression ist daher ein wichtiger Schritt, um in Zukunft wirksame Therapien entwickeln zu können.

In HCCs ist die Expression des Cholangiozyten- und Progenitorzellmarkers CK19 mit invasivem Wachstum, einer schlechten Differenzierung und Prognose, postoperativen Rezidiven, Metastasierung und der Expression von Tumorstammzellmarkern assoziiert [29,46,55,56,98,106,115,123]. CK19 hat also nicht nur prognostische Bedeutung, sondern verleiht Tumoren auch einen Stammzellcharakter [40]. Dies hat großes Interesse an CK19 als möglichem Tumorstammzellmarker und an dessen Rolle bei der Entstehung von Leberkarzinomen geweckt.

In dieser Arbeit soll zunächst die CK19 Expression in Lebertumorgewebe aus transgenen Mausmodellen der chronischen Leberentzündung und leberspezifischen *Trp53*-Deletion untersucht werden. Hierbei steht die unterschiedliche Expression von CK19 in Abhängigkeit von der Tumorentität und der Zusammenhang mit der Expression anderer Tumorstammzellmarker im Vordergrund.

Im zweiten Teil des Projekts liegt der Fokus auf dem Einfluss von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomzellen. ICCs sind mit einer schlechten Prognose, häufigen Rezidiven

und Metastasen verbunden und exprimieren in den meisten Fällen CK19 [56,86,111,112,126]. Bisher gibt es wenige und teils widersprüchliche Studien zum Einfluss der CK19-Expression in ICCs [15,62,93,107]. Deshalb wurde in dieser Arbeit mittels CRISPR-Cas9 ein stabiler CK19-Knockout in zwei Cholangiokarzinomzelllinien generiert und deren Malignität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit CK19 Wildtyp Zellen verglichen. Untersucht wurden dabei Proliferation, Migration, die Kolonienbildung im *Soft Agar*, die Bildung von 3D-Tumosphären in serumfreier Umgebung, die Expression von Tumorstammzellmarkern und die Tumorbildung nach Xenotransplantation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte mit Hersteller

Laborgerät	**Bezeichnung**	**Hersteller, Hauptsitz**
Agarosegelkammer	Sub-Cell® GT Cell	BioRad, Hercules (USA)
Bilddrucker	Digital Graphic Printer UP-D890	Sony, Tokio (JPN)
Chemilumineszenz-System	Chemi-Smart 5000	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée (F)
Dampfgarer	MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus (D)
Drehmischer	Rotator SB3	Stuart, Staffordshire (GB)
Einbettmaschine	HistoCore Arcadia H	Leica Biosystems, Wetzlar (D)
Einzelzell-Massenzytometer	Typ Helios (a CyTOF System)	Fluidigm, San Francisco (USA)
Elektrische Pipettierhilfe	EasyPet	Eppendorf, Hamburg (D)
Elektrophoresekammer	HB1214	ThermoHybaid, Frankfurt (D)
Elektrophoresekammer	MiniProtean®II Electrophoresis Cell	BioRad, Hercules (USA)

Elutionsvorrichtung	Eluator™ Vacuum Elution Device	Promega, Madison (USA)
Feinwaage	R200D	Sartorius, Göttingen (D)
Fluoreszenz-Mikroskop	Biorevo BZ9000	Keyence, Osaka (JPN)
Gewebslysierer	Tissuelyser II	Qiagen, Venlo (NL)
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg (D)
High-Speed-Zentrifuge	Sorvall RC 6+	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Histomat	HistoCore PEARL	Leica Biosystems, Wetzlar (D)
Inkubator (Zellkultur)	Thermo Heraeus BBD 6220 CO2-Inkubator	Heraeus, Hanau (D)
Laborwaage	Mettler PM4000	Mettler, Ohio (USA)
Laborwippe	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach (D)
Lichtmikroskop	LH50A	Olympus, Shinjuku, Tokio (JPN)
Magnetrührer	IKAMAG® RCT	IKA-Werk, Staufen im Breisgau (D)
Mikrotom	Microm HM 355S	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Mikrowelle	Microwave 800	Severin, Sundern (D)
Minizentrifuge	Rotilabo®-Mini-Zentrifuge „Uni-fuge“	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Netzgerät Blot-Kammer	EV231	Consort, Turnhout (B)
Netzgerät Gelkammer	PowerPacTM Basic	BioRad, Hercules (USA)
Netzgerät SDS-Gelkammer	EPS 3500XL	Pharmacia, New Jersey (USA)
Neubauer Zählkammer	Zählkammer Neubauer-improved, CE	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen (D)
PCR-Gerät	FlexCycler	Analytik Jena, Jena (D)
pH-Meter	720	WTW, Weilheim (D)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg (D)

Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
qPCR-Gerät	Quant Studio 3 System	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Schüttler	Vibramax 100	Heidolph, Schwabach (D)
Sterilwerkbank	LaminAir HA 2448	Heraeus, Hanau (D)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)
Universalzentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau (D)
UV-Transilluminator mit CCD-Kamera	302 nm	Bachofer, Weilheim (D) Kaiser (D)
UV-Vis-Spektrophotometer Nano Drop	2000c	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Vakuumpumpe	WOB-L 2522	Welch, Concord, Massachusetts (US)
Vakuumvorrichtung	Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Madison (USA)
Vortexer	444-1372	VWR, Radnor (USA)
Wasserbad	Wasserbad 1008	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel (D)
WB-Transfergerät	Semi-Dry-Blotter ‚Pegasus‘	Phase, Lübeck (D)

2.1.2 Gebrauchswaren

Tabelle 2: Verwendete Gebrauchswaren mit Hersteller

Gebrauchsware	Bezeichnung	Hersteller, Hauptsitz
Chirurgisches Einmal-Skalpell	Surgical Disposable Scalpels	Braun, Kronberg im Taunaus (D)
Deckgläschen	24x50 mm	RLangenbrick, Emmendingen (D)
Einbettkassetten	Histosette	Simport, Kanada (USA)
Einmalspritzen 1ml	BD Plastipak	Becton Dickinson, Madrid (S)
FACS-Röhrchen mit Zellenfilterkappe	Corning™ Falcon™ Röhrchen mit Zellenfilterkappe	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Farbcodierer für Kryoröhrchen-Verschlüsse		ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Fettstift	DakoPen	Dako, Glostrup (DNK)
Filterpapier	Chromatographiepapier	Hartenstein, Würzburg (D)
gering anhaftende 24-Wellplatte	Corning® Costar® Ultra-Low Attachment Multiple Well Plate, 24 well, clear flat bottom	Corning Incorporated, Corning (USA)
Glasware		Schott AG, Mainz (D)
Maushaltungskäfig	1285L NEXT	Tecniplast, Buguggiate (I)
Kryoröhrchen	Nunc™ Kryotubes	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Kulturröhrchen	14 ml PP Tube	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
Metallkügelchen		Qiagen, Venlo (NL)
Mikrotomklingen	R35 Types	Feather, Osaka (J)
Objektträger	SuperFrost® Orange SuperFrost® Plus TM	Carl Roth, Karlsruhe (D) RLangenbrick, Emmendingen (D)

Optical Adhesive Film	MicroAmpTM	AppliedBiosystems, Foster City (USA)
Parafilm	Parafilm M Film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
PCR Mikrotiterplatten	MicroAmp® Fast Optical 96-Well	AppliedBiosystems, Foster City (USA)
PCR-Reaktionsgefäß	Multiply® µStrip	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Petrischalen	60x15 mm mit Nocken	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen mit Filter	Biosphere®Plus	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Präparationsbesteck		FST (D)
PVDF-Membran	Immobilon®-P Transfer Membran	Merck Millipore, Darmstadt (D)
Reaktionsgefäße	1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Serologische Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Spritzenfilter	Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht (D)
UV-Vis-Küvette		Sarstedt, Nümbrecht (D)
Zellkulturplatten	6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
Zellsieb	40 µm, 70 µm	Corning Incorporated, Corning (USA)
Zentrifugenflaschen	Nalgene®, 250 ml	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Hersteller

Chemikalie	Hersteller mit Hauptsitz
30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Agarose	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Antigen Unmasking Lösung	Vector, Burlingame (USA)
Bovine serum albumine (BSA), Rinderserum	GE Healthcare, Chalfont St Giles (GB)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
dNTP's	Promega Corporation, Madison (USA)
Entellan®	MerckMillipor, Darmstadt (D)
Eosin	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Ethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Ethanol vergällt	Apotheke Universitätsklinikum Ulm
Ethidiumbromidlösung	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Formaldehyd 37 %	AppliChem, Darmstadt (D)
Formamid	VWR, Radnor (USA)
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Green GoTaq® Flexi Buffer (5x)	Promega Corporation, Madison (USA)
30 % H_2O_2	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hämalaun-Lösung	MerckMillipor, Darmstadt (D)
Immobilon^{TM} Western HRP Substrat (Luminol Reagent + Peroxide Solution)	MerckMillipor, Darmstadt (D)
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinik Ulm
iTaq^{TM} Universal SYBR®Green Supermix	BioRad, Hercules (USA)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
1 kb Plus DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Marker PageRulerTM Prestained Protein Ladder	BioRad, Hercules (USA)
Corning® Matrigel® Matrix high concentration	Corning Incorporated, Corning (USA)
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Milchpulver	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid NaOH	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Nova Red	Vector, Burlingame (USA)
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden (D)
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Darmstadt (D)
Protease-Inhibitor Tablette, complete mini	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel (CH)
Protein Assay Dye reagent concentrate	BioRad, Hercules (USA)

Polyacrylamid 40 % 19:1	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Proteinase K	F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel (CH)
Protein Assay	Bio-Rad, München (D)
RNase AWAY®	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden (D)
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Salzsäure (HCl)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
Taq-Polymerase	Promega Corporation, Madison (USA)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tris Base	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Xylene cyanol	United States Biochemical Corporation, Cleveland (USA)
Xylene	VWR, Radnor (USA)
Hasenserum, (ab7487)	Abcam, Cambridge (GB)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
Gibco™ Opti-MEM™ Reduced Serum Medium	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
LMP-Agarose	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Natriumbikarbonat ($NaHCO_3$)	CarlRoth, Karlsruhe (D)
L-Glutamine	Lonza, Basel (CH)
Gibco™ RPMI 1640 *Medium, powder*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Ampuwa Sterilwasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg (D)

Stripping Puffer	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Na_2EDTA	AppliChem, Darmstadt (D)
Nonidet™ P 40 Substitute	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DOC (Natriumdeoxycholat)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Gibco™ DMEM/F-12, GlutaMAX™ *Supplement*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Gibco™ B-27 *Supplement* (50x), serum-frei	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Rekombinantes humanes FGF-β	Novoprotein, Summit (USA)
Penicillin-Streptomycin	Lonza, Basel (CH)
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Gibco™ FBS (Fetal Bovine Serum), qualified, E.U.-approved, South America origin	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Trypanblau	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
SYTOX™ *Blue Dead Cell Stain*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

2.1.4 Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung

Lösung	**Zusammensetzung**
4 % PFA Fixierlösung	100 ml 37 % Formaldehyd 900 ml ddH_2O 4 g NaH_2PO_4 6,5 g Na_2HPO_4
5x Lämmli-Puffer	10 % SDS 50 % Glycerol 25 % β-Mercaptoethanol

	300 mM Tris (pH 6,8) 0,01 % Bromphenolblau
Eosin working solution	50ml Eosin-Stock-Lösung 150ml 70 % EtOH 1ml Essigsäure
Eosin-Stocklösung	10g Eosin 200ml ddH_2O 800ml 95 % EtOH
Laufpuffer SDS-Gel (10x)	30,3 g Tris base 144,0 g Glycin 100 ml 10 % SDS ad 1 l ddH_2O
Phosphate-Buffered Saline (1x PBS)	8,0g NaCl 0,2g KCl 1,44g Na_2HPO_4 0,24g KH_2PO_4 ad 1 l ddH_2O pH7,2 (2 M HCl)
RIPA Puffer	50 mM TrisHCl pH8 150 mM NaCl 1 % NP-40 0,5 % DOC (10 %) 0,1 % SDS (10 %) ad 1 l ddH_2O
Transferpuffer Western-Blot (10x)	30,3 g Tris base 144,2 g Glycin ad 1 l ddH_2O
Transferpuffer Western-Blot (1x)	500 ml 10x Transfer-Puffer 3500 ml ddH2O 1000 ml Methanol
Tris-Acetate-Puffer TAE (50x)	242,2g Tris

	37,2g Na_2EDTA 600ml ddH_2O pH8,0 (100 % Essigsäure) ad 1 l ddH_2O
Tris-Buffered Saline TBS (10x)	60,5g Tris base 87,6g NaCl ad 1l ddH_2O pH7,5 (37 % HCl)
Tris-Buffered Saline/ 1 % Tween 20 (1x TBS-T)	500ml 10x TBS 4,5l ddH_2O 5ml Tween 20
SDS Stocklösung (10 %)	100g SDS ad 1 l ddH_2O, filtrieren
FACS-Puffer	50 ml PBS 2 ml FBS 5 mM EDTA
LB-Medium ($LB^{Kanamycin}$-Medium)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 l ddH_2O Autoklavieren (+ 30 mg Kanamycinsulfat (in 1 ml ddH2O))
LB-Agar ($LB^{Kanamycin}$-Agar)	3 g Trypton 1,5 g Hefeextrakt 1,5 g NaCl 4,2 g Agar 300 mL ddH_2O Autoklavieren (+ 9 mg Kanamycinsulfat (in 300 µl ddH2O))

2.1.5 Systeme

Tabelle 5: Verwendete Systeme mit Hersteller

Produkt	**Hersteller**
ACCUPrime™ GC-Rich DNA Polymerase: - AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase - 5x AccuPrime™ GC-Rich Buffer A - 5x AccuPrime™ GC-Rich Buffer B - 50mM $MgSO_4$	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
DNeasy® Blood and Tissue Kit (50): - Buffer AE, AL, AW1, AW2 - DNeasy Mini Spin Column - Collection Tubes (2ml) - Proteinase K	Qiagen, Hilden (D)
GoScript™ Reverse Transcription System: - GoScript™ 5X Reaction Buffer - $MgCl_2$ (25 mM) - $Oligo(dT)_{15}$ Primer - Random Primers - PCR Nukleotid Mix - Nuklease-freies Wasser - Recombinant RNasin Ribonuklease Inhibitor - GoScript™ Reverse Transcriptase	Promega, Madison (USA)
Lipofectamine™ 3000 Transfection Kit - Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent - P-3000™ Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

PureYield™ Plasmid Midiprep System - Cell Resuspension Solution (CRA) - Cell Lysis Solution (CLA) - Neutralization Solution (NSB) - Endotoxin Removal Wash - Column Wash - Nuclease-Free Water - PureYield™ Clearing Columns - PureYield™ Binding Columns	Promega, Madison (USA)
QIAshredder - QIAshredder Spin Columns - Collection Tubes, 2 ml	Qiagen, Hilden (D)
RNeasy® Mini Kit: - RNeasy Mini Spin Column - 1,5 ml Collection Tube - RLT Buffer - RW1 Buffer - RPE Buffer - RNAse freies Wasser	Qiagen, Hilden (D)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System: - 2ml Collection Tube - Wizard® SV Minicolumns - Membrane Wash Solution - Membrane Binding Solution - Nuclease-Free Water	Promega, Madison (USA)

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper mit Hersteller und Katalognummer

Erstantikörper [Klon]	Hersteller	Katalognummer
Cytokeratin 19 [M-17]	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)	Sc-33111
Cytokeratin 19 [RCK108]	Abcam, Cambridge (GB)	Ab9221
GAPDH	HyTest Ltd, Turku (Finnland)	5G4
Zweitantikörper	Hersteller	Katalognummer
HRP rabbit anti-goat	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)	81-1620
HRP Horse Anti-Mouse	Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA)	PI-2000

2.1.7 Plasmide und Bakterienstämme

Tabelle 7: Verwendete Plasmide mit *target* ID und Zielsequenz

Plasmidname	***Target* ID**	**Zielsequenz der *guide*RNA (5' → 3')**
pCMV-Cas9-RFP-90	HS0000256190	CCAGTCGTCGGCCACGTCGTCC
pCMV-Cas9-RFP-91	HS0000256191	CGTCGGCCACGTCGTCCTTCGG
pCMV-Cas9-RFP-92	HS0000256192	CCACGTCGTCCTTCGGAGGCCT

Hersteller: Sigma Aldrich, St.Louis (USA)

Tabelle 8: Verwendeter Bakterienstamm mit Genotyp und Hersteller

Bakterienstamm	**Genotyp**	**Hersteller**
E.coli XL10-Gold	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^{q}ZΔM15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]	Stratagene, La Jolla (USA)

2.1.8 Primer

2.1.8.1 Murine Primer

Tabelle 9: Verwendete murine Primer und deren Sequenz

Gen	Primer	Sequenz (5‘ → 3‘)
CD133	mmCD133_fwd mmCD133_rev	GAAAAGTTGCTCTGCGAACC TCTCAAGCTGAAAAGCAGCA
CD24 [81]	mmCD24_fwd mmCD24_rev	CAGGCAAATATGCAAAGGAGC CACATCCCAAATGCTGGGTT
CD44	m-CD44-for (qPCR) m-CD44-rev (qPCR)	GAATGTAACCTGCCGCTACG GGAGGTGTTGGACGTGAC
CD90	mmCD90_fwd mmCD90_rev	GACCAAGGATGAGGGCGACTA GCTTATGCCGCCACACTTGA
CK19	mmCK19_fwd mmCK19_rev	GGACCCTCCCGAGATTACAACCA GCCAGCTCCTCCTTCAGGCTCT
EpCAM	mmEpcam_fwd mmEpcam_rev	AGGGGCGATCCAGAACAACC ATGGTCGTAGGGGCTTTCTC
GP73 [114]	mmGP73_fwd mmGP73_rev	CAGTGTGACGAGCGGATAGA ACTTGTTTCTGGGCACATCC
Osteopontin [33]	mmOPN_fwd mmOPN_rev	TCTGATGAGACCGTCACTGC AGGTCCTCATCTGTGGCATC
RNA Poly-merase II	m-RNA Pol II-for (qPCR) m-RNA Pol II-rev (qPCR)	CATCAACCAGGTGGTACAGC GATTCTGGAACTCAACACTCTCC
Sox9	mmSox9_fwd mmSox9_rev	TGCCCATGCCCGTGCGCGTCAA CGCTCCGCCTCCTCCACGAAGGG

Hersteller: Sigma Aldrich, St.Louis (USA)

2.1.8.2 Humane Primer

Tabelle 10: Verwendete humane Primer und deren Sequenz

Gen	Primer	Sequenz (5‘ → 3‘)
CD133 [117]	HS_CD133-for (qPCR) HS_CD133-rev (qPCR)	CCGCAGGAGTGAATCTTT AGGACTCGTTGCTGGTGA
CD24 [92]	HS_CD24-for (qPCR) HS_CD24-rev (qPCR)	CTCCTACCCACGCAGATTTATTC AGAGTGAGACCACGAAGAGAC
CD44 [117]	HS_CD44_for(qPCR) HS_CD44_rev(qPCR)	AAAGGAGCAGCACTTCAGGA TGTGTCTTGGTCTCTGGTAGC
CK19 (qPCR)	HS_CK19-for2 (qPCR) HS_CK19-rev2 (qPCR)	GCCACTACTACACGACCATCC CAAACTTGGTTCGGAAGTCAT
CK19 (Sequenzierung)	Hs_CK19_for_0_cDNA Hs_CK19_rev.seq1_234	TGAGACCAGGGTTGCTCC AGGAGGACGAGGACACAAAG
EpCAM [117]	HS_EpCAM-for (qPCR) HS_EpCAM-rev (qPCR)	TTCTCAATGCAGGGTCTA CCTTTATCTCAGCCTTCTC
GAPDH	HS_GAPDH-for (qPCR) HS_GAPDH-rev (qPCR)	AAGGTCATCCCTGAGCTGAAC ACGCCTGCTTCACCACCTTCT

Hersteller: Sigma Aldrich, St.Louis (USA)

2.1.9 Software

Tabelle 11: Verwendete Software mit Anbieter

Software	Anbieter
ApE, A Plasmid Editor v2.0.49	M. Wayne Davis
BZ-II Viewer, Biorevo BZ-9000 Software	Keyence, Neu-Isenburg (D)
ChemiCapt	Vilber, Eberhardzell (D)

ensembl genome database project	European Bioinformatics Institute and the Wellcome Trust Sanger Institute [119] https://www.ensembl.org
Graph Pad Prism 6.01	GraphPad Software, La Jolla (USA)
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health (USA)
Microsoft Office 16	Microsoft, Redmond (USA)
Nanodrop 2000 / 2000c software	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PrimerBLAST	National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA) [120] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primer3web v4.1.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge (USA) [108] https://primer3.ut.ee/
QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.4.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
SnapGene Viewer 4.2.3	GSL Biotech LLC, Chicago (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Histologische Verfahren

2.2.1.1 Gewebeaufarbeitung

Das Gewebe aus den transgenen Mausmodellen wurde freundlicherweise von Michael Svinarenko fixiert und eingebettet. Die Tumore aus dem Transplantationsversuch (s. 2.2.4) wurden über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA fixiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zweimal in PBS gewaschen und im Histomat nach folgendem Programm entwässert und in Paraffin eingelegt.

ddH_2O	2 min	
Ethanol 70 %	40 min	45 °C
Ethanol 80 %	40 min	45 °C
Ethanol 95 %	40 min	45 °C
Ethanol 100 %	60 min	45 °C

Ethanol 100 %	60 min	45 °C
Ethanol 100 %	60 min	45 °C
Xylol	60 min	45 °C
Xylol	60 min	45 °C
Xylol	60 min	45 °C
Paraffin	60 min	60 °C
Paraffin	60 min	60 °C
Paraffin	90 min	60 °C

Das Tumorgewebe wurde anschließend mit Paraffin an der Einbettstation in Gewebekassetten eingebettet. Die eingebetteten Tumore wurden über Nacht bei 4 °C gekühlt, bevor am Mikrotom (Microm HM 355S) jeweils 3,5 µm und 5 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden im Wasserbad bei 40 °C geglättet, auf Glasobjektträger aufgezogen und im Trockenschrank über Nacht bei 50 °C getrocknet.

2.2.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wurden die 3,5 µm dünnen Gewebeschnitte verwendet und zunächst zweimal je zehn Minuten lang in Xylol entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Proben dann hydratisiert (2 x 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % Ethanol je 3 min.) und für 30 Sekunden in dH_2O gewaschen. Die Zellkerne wurden eine Minute lang in 100 % Hämatoxylin angefärbt. Durch fünfminütiges Waschen unter fließendem warmem Leitungswasser wurde eine Erhöhung des pH-Wertes und damit der Farbumschlag herbeigeführt. Anschließend wurde das Zytoplasma 30 Sekunden lang in Eosin angefärbt und die Schnitte wurden zwei Minuten lang unter fließendem Wasser gewaschen. In der darauffolgenden aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 % Ethanol je 5 sec., 2 x 100 % Ethanol je 2 min.) wurden die Schnitte dehydratisiert und dann zweimal für je fünf Minuten in Xylol geklärt. Abschließend wurden die Präparate mit dem Eindeckmittel Entellan® und einem Deckglas bedeckt.

2.2.1.3 Immunhistochemische Färbung

Um Zytokeratin 19 im Tumorgewebe nachzuweisen, wurde die indirekte Färbung gewählt. Hierbei bindet der Erstantikörper spezifisch das Antigen, in diesem Fall CK19. Der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelte Zweitantikörper bindet wiederum spezifisch das Fc-Fragment des Erstantikörpers. Das anschließend zugegebene Substrat (hier NovaRED™) wird von der Peroxidase umgesetzt und erzeugt so einen Farbumschlag.

Für die immunhistochemische Färbung wurden 5 µm dünne Schnitte zweimal je 15 Minuten lang in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe hydratisiert (2 x 100 %, 90 %, 80 %, 70 % je 3 min.), sowie 30 Sekunden lang in dH_2O gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Antigene durch Hitze und Zitratpuffer demaskiert bzw. renaturiert. Dafür wurde der Zitratpuffer (Antigen Unmasking Solution) 1:100 in dH_2O verdünnt und 15 Minuten lang im Dampfgarer erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte hinzugefügt und für 35 Minuten im Dampfgarer inkubiert. Nach 20-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurden die Präparate dreimal je fünf Minuten lang in dH_2O gewaschen. Zur Verringerung unspezifischer Signale wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch zehnminütige Inkubation mit 3 % H_2O_2 bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurden die Schnitte fünf Minuten lang in ddH_2O, sowie fünf Minuten lang in PBS gewaschen. Durch die Inkubation der Präparate mit 10 % Hasenserum in PBS (Mausgewebe) bzw. 3 % BSA in PBS (Transplantationsversuch) bei Raumtemperatur für 60 Minuten, wurden unspezifische Antikörperbindungen geblockt.

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper inkubiert (Antikörper mit Verdünnungen s. Tabelle 12). Hier wurde auf jedem Objektträger ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt, der mit dem jeweiligen *Blocking*-Serum ohne Erstantikörper inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die Präparate dreimal in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörper erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Präparate dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen wurden.

Als Substrat für die Meerrettichperoxidase wurde NovaRED™ (Vector) verwendet, wobei die Farbentwicklung beobachtet und die Inkubationszeit davon abhängig zwischen fünf und zwölf Minuten lag. Nach einem fünfminütigen Waschschritt in dH_2O wurden die Zellkerne eine Minute lang in 20 % Hämatoxylin gegengefärbt. Der Farbumschlag des Hämatoxylins wurde durch die Erhöhung des pH-Werts unter fünf Minuten lang fließendem warmem Leitungswasser herbeigeführt. Abschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (70 %, 80 %, 90 % Ethanol für je 5 sec., 2 x 100 % Ethanol für je 5 min.), zweimal für fünf Minuten in Xylol geklärt und mit Entellan® eingedeckt.

Die semiquantitative Auswertung der CK19-Färbung erfolgte nach gängiger Praxis [18,42,48,56,98,106]: Als positiv gewertet wurde eine zytoplasmatische und/oder membranöse Färbung von mindestens 5 % der Tumorzellen von moderater bis starker Intensität.

Schwache Färbungen und/oder Tumorgewebe mit weniger als 5 % gefärbten Tumorzellen wurden dagegen als negativ eingestuft.

Tabelle 12*: Blocking*lösung und Antikörper mit Verdünnungen der CK19-Immunhistochemie nach Zielgewebe

Zielgewebe	Blockierung unspezifischer Bindungen	Erstantikörper (Verdünnung)	Zweitantikörper (Verdünnung)
Maustumore	10 % Hasenserum in PBS	Goat polyclonal anti-CK19 [M-17] (1:250 in 10 % Hasenserum)	HRP rabbit anti-goat (1:500 in 10 % Hasenserum)
Transplantierte humane Tumorzellen	3 % BSA in PBS	Monoclonal mouse anti-human CK19 [RCK108] (1:200 in 3 % BSA)	HRP horse anti-mouse (1:300 in 3 % BSA)

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA aus Tumorgewebe bzw. Tumorzellen wurde mithilfe des RNeasy® Mini Kits nach dem Protokoll des Herstellers gewonnen. Um Kontaminationen mit Fremd-RNA zu verhindern, wurden die Arbeitsfläche und alle Geräte vorher mit RNAse Away® behandelt. Der Lysepuffer wurde vorbereitet, indem je 10 µl β-Mercaptoethanol zu einem Milliliter RLT-Puffer gegeben wurden.

Zur Lyse von Tumorgewebe aus Mäusen wurden ca. 30 mg schockgefrorenes Tumorgewebe auf Trockeneis geschnitten und auf Eis in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol gegeben. Nach Hinzufügen eines sterilen Metallkügelchens wurde das Gewebe ca. zwei Minuten lang mit dem *Tissue Lyser* II bei 25 Hz lysiert.

Zur Lyse von Zellen wurden die gemäß Abschnitt 2.2.3.2 geernteten Zellen auf Eis in 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol resuspendiert.

Sowohl Gewebs- als auch Zelllysat wurden auf QIAshredder Spin Columns in 2 ml Auffanggefäßen gegeben und bei 16000 *g* zwei Minuten lang homogenisiert. Der Überstand wurde in einem sauberen Reaktionsgefäß mit 600 µl 70 % Ethanol vermischt, in zwei Schritten auf eine *RNeasy Mini Spin Column* gegeben und je 20 Sekunden lang bei 9000 *g* zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen und die Säule anschließend mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und zentrifugiert (9000 *g*, 20 sec.). Es folgten zwei weitere

Waschschritte mit je 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei 9000 *g* zuerst für 20 Sekunden, dann für zwei Minuten. Die Säulen wurden auf ein neues Auffanggefäß gesteckt und eine Minuten lang bei 16000 *g* zentrifugiert. Nun wurden die Säulen auf ein frisches Reaktionsgefäß gegeben und eine Minute lang mit 30 µl RNAse freiem Wasser inkubiert. Abschließend wurde die RNA durch Zentrifugation (9000 *g,* 1 min.) eluiert und auf Eis gestellt. Direkt im Anschluss folgte die RNA-Konzentrationsbestimmung. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.2 Messung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration sowie Reinheit von DNA und RNA wurde mit einem NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurde das Gerät mit 1 µl Nuklease-freiem Wasser geeicht und dann die Nukleinsäurekonzentration von 1 µl der Probe durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Zur Beurteilung der Reinheit wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm gebildet. Lag dieser Wert bei RNA-Proben bei ca. 2 und bei DNA-Proben bei ca. 1,8, so wurden die Proben als rein betrachtet.

2.2.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *GoScript™ Reverse Transcription System* von Qiagen durchgeführt. Hierfür wurden je 2 µl RNA mit 0,5 µl Oligo(dT)$_{15}$ Primer und 0,5 µl Random Primer, sowie 2 µl Nuklease-freiem Wasser auf Eis gemischt. Im Heizblock wurden RNA und Primer bei 70 °C fünf Minuten lang denaturiert, anschließend für fünf Minuten auf Eiswasser gekühlt und zehn Sekunden lang in einer Minizentrifuge zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde auf Eis der Reverse-Transkriptions-Mastermix nach folgendem Schema vorbereitet:

Mastermix:	4,0 µl	GoScript™ 5x Reaction Buffer
(für eine Probe)	+ 2,0 µl	MgCl2 (Endkonzentration 2 mM)
	+ 1,0 µl	PCR Nucleotide Mix (Endkonzentration 0,5 mM)
	+ 0,5 µl	Recombinant Rnasin® Ribonuclease Inhibitor
	+ 1,0 µl	GoScript™ Reverse Transcriptase
	+ 6,5 µl	Nuklease-freies Wasser

Je 15 µl Mastermix wurden mit dem RNA-Primer-Ansatz (5 µl) vermischt und im Heizblock nach untenstehendem Zeitplan inkubiert:

cDNA-Synthese-Zeitplan:	Annealing:	5 min.	25 °C
	Extension:	60 min.	50 °C
	Inaktivierung:	15 min.	70 °C
	Bis zur Entnahme		4 °C

Es wurden Verdünnungen im Verhältnis 1:20 mit sterilem Wasser hergestellt und alle Proben und Verdünnungen bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.4 Primerauswahl und -test

Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden entweder den in 2.1.8 zitierten Quellen entnommen oder mithilfe des Primer3 Webtools und der Gensequenzen aus der Gendatenbank *„ensembl genome database project“* ausgewählt. Die Spezifität der Primerpaare wurde mithilfe des Programms *„PrimerBLAST“* überprüft.

Die Validierung der Primer wurde mit einem qPCR-Lauf in verschiedenen Primer- und cDNA-Konzentrationen durchgeführt. Dabei wurde jede Verdünnung ebenso wie die Negativkontrolle in Duplikaten pipettiert. Anhand der Schmelzkurve wurden die Primer auf unspezifische Amplifikationsprodukte getestet. Durch den Vergleich der Ct-Werte bei verschiedenen cDNA-Verdünnungen wurde die Qualität der Primer validiert. Die Einzelschritte der qPCR-Reaktion sind dem folgenden Abschnitt zu entnehmen.

2.2.2.5 quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte im Rahmen der qPCR (*quantitative realtime polymerase chain reaction*) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I. Hierfür wurde der Mastermix auf Eis nach folgendem Protokoll vorbereitet und gut durchmischt:

Mastermix:	5,0 µl	iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix
(für eine Probe)	0,25 µl	Primer forward
	0,25 µl	Primer reverse
	1,5 µl	ddH_2O

In einer 96-Well-PCR-Mikrotiterplatte wurden in jedem Well 3 µl cDNA (1:20) oder ddH_2O vorgelegt und anschließend mit 7µl Mastermix aufgefüllt. Jede Probe wurde dabei in Triplikaten pipettiert. Die Die 96-Well-PCR-Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen und zwei Minuten lang bei 1200 UpM zentrifugiert. Die qPCR wurde nach folgendem Zeitplan im Quant Studio 3 System durchgeführt:

qPCR-Zeitplan:	initiale Denaturierung	2 min	50 °C
		2 min	95 °C
	Denaturierung:	15 sec.	95 °C
	Annealing/Elongation:	1 min.	60 °C

Nach jedem qPCR-Zyklus wurde die Fluoreszenz des SYBR Green I Farbstoffs gemessen, der in der kleinen Furche der Doppelstrang-DNA interkaliert. Zur Überprüfung der Spezifität des Farbstoffs wurde anschließend eine Schmelzkurve erstellt. Nach erneutem Erhitzen für 15 Sekunden auf 95 °C und Abkühlen auf 60 °C für eine Minute wurden die Proben mit einer Geschwindigkeit von 0,075 °C/sec. auf 95 °C erhitzt. Bei Denaturierung des Doppelstrangs wurde eine Änderung der Fluoreszenz detektiert, die auf die Länge des amplifizierten DNA-Stücks schließen lässt.

Die Auswertung wurde mit der ΔΔCt-Methode durchgeführt. Der Ct *(cycle threshold)*-Wert gibt denjenigen Zyklus an, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Vom Ct-Wert des Zielgens wurde der Ct-Wert eines Referenzgens, das in allen Zellen abundant exprimiert wird (humane Proben: GAPDH, murine Proben: RNA-Polymerase II) subtrahiert. Die so erhaltenen ΔCt-Werte der behandelten und der unbehandelten Proben wurden voneinander abgezogen (=ΔΔCt) und die relative Genexpression über eine Exponentialfunktion bestimmt ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$).

2.2.2.6 DNA-Isolierung

Die Isolierung von DNA aus Tumorzellen erfolgte mit dem *DNeasy^{R} Blood & Tissue Kit*. Die Einzelschritte sind dem Herstellerprotokoll zu entnehmen. Es wurden die gemäß Abschnitt 2.2.3.2 geernteten Zellen verwendet. Die Konzentration der eluierten DNA wurde bestimmt (s. 2.2.2.2) und das Material wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 DNA-Amplifikation

Um durch CRISPR-Cas9 induzierte Mutationen auf Ebene der DNA-Basen zu identifizieren, wurden zunächst die modifizierten Abschnitte des CK19 Gens mit dem *ACCUPrime^{TM} GC-Rich DNA Polymerase-Kit* amplifiziert. Dazu wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß alle Komponenten in der unten aufgeführten Reihenfolge gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Die DNA der transfizierten sowie der unbehandelten Zellen wurde zuvor bis zu einer Konzentration von ca. 100 ng/µl mit ddH_2O verdünnt.

1,0 µl	DNA
0,5 µl	Primer forward (Hs_CK19_for_0_cDNA)
0,5 µl	Primer reverse (Hs_CK19_rev.seq1_234)
5,0 µl	5x Puffer A
0,5 µl	GC-Rich DNA Polymerase
17,5 µl	ddH_2O

Nach folgendem Zeitplan wurde die DNA-Amplifikation im Heizblock vorgenommen:

Denaturierung:	3 min.	95 °C	
Denaturierung:	30 sec.	95 °C	} 35 Zyklen
Annealing:	30 sec.	57,5 °C	
Extension:	20 sec.	72 °C	
Finale Extension	5 min.	72 °C	
Bis zur Entnahme		4 °C	

2.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Da die amplifizierten DNA-Stücke eine Länge von ca. 210 bp aufweisen, wurde eine gute Auftrennung des gesuchten Bereichs mit einem 2 % Agarosegel erzielt. Dafür wurden in der Mikrowelle 4 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen 12 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und gemischt. Die Agarose wurde in den Gelschlitten gegossen, die Kämme eingelegt und nach Verfestigung in die mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer gelegt. Je 4 µl eines PCR-Ansatzes wurden mit 4 µl 5x Green GoTaq Puffer und 12 µl ddH_2O vermischt und in eine Geltasche pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 11 µl der 1 kb Plus DNA-Leiter in eine Tasche gegeben. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für ca. 1,5 Stunden. Unter UV-Licht wurden die DNA-Banden durch das interkalierte Ethiumbromid im Gel detektiert und die Größe anhand einer DNA-Leiter bestimmt.

2.2.2.9 DNA-Aufreinigung aus Agarosegel

Für die Aufreinigung der DNA-Amplifikate aus dem Agarosegel wurde das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* verwendet. Um DNA-Degradation vorzubeugen, wurde das Gel möglichst kurz belichtet. Mit einem sterilen Skalpell wurde das entsprechende Gelstück ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Masse des Gelstücks wurde bestimmt und für jeden Milligramm je ein Mikroliter *Membrane Binding Solution* hinzugegeben. Unter regelmäßigem Mischen mit dem Vortexmischer wurde das Gel bei 65 °C im Heizblock aufgelöst. Die Lösung wurde auf eine Minisäule in einem Auffanggefäß gegeben und eine Minute lang inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16000 *g* für eine Minute wurde der

Durchfluss verworfen. In zwei Waschschritten wurde die Säulenmembran zunächst mit 700 µl *Membrane Wash Solution* (16000 *g*, 1 min.) und dann mit 500 µl derselben Lösung (16000 *g,* 5 min.) gereinigt. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Auffanggefäß durch ein neues ersetzt und noch einmal für eine Minute zentrifugiert, damit das Ethanol gänzlich verdampft. Die Minisäule wurde auf ein sauberes Auffanggefäß gesteckt und eine Minute lang mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 16000 *g* für eine Minute wurde die DNA von der Membran gelöst und die DNA Konzentration im Eluat wurde bestimmt (s. 2.2.2.2). Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.2.10 Mutationsdetektion

Um die durch CRISPR-Cas9 induzierten Mutationen im CK19-Gen zu detektieren, wurde der Bereich um die Zielsequenz der *guide*RNA sequenziert. Die dafür eingesetzte Sanger-Sequenzierung wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe CLL der Klinik für Innere Medizin III (Prof. Dr. Stilgenbauer) übernommen und erfolgte mit den CK19 Sequenzierungsprimern Hs_CK19_for_0_cDNA und Hs_CK19_rev.seq1_234. Mithilfe der Programme ApE und SnapGene Viewer wurden Unterschiede in der Basensequenz zwischen Wildtyp Zellen und CK19-Knockout Zellen detektiert.

2.2.2.11 Lyse und Proteinextraktion

Zunächst wurde der Lysepuffer vorbereitet, indem eine Tablette Proteaseinhibitor in 10 ml RIPA-Puffer gelöst und weitere Bestandteile nach folgendem Schema hinzugefügt wurden:

Lysepuffer:	1 ml	RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor
	10 µl	0,1 M Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)
	1 µl	1 M Dithiothreitol (DTT)
	10 µl	0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Die nach Abschnitt 2.2.3.2 geernteten Zellen wurden in 300 µl Lysepuffer resuspendiert und 40 Minuten lang bei 4 °C auf dem Drehmischer lysiert. Das Lysat wurde bei 13000 UpM bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

2.2.2.12 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford Protein Assay bestimmt. Dafür wurden in Vis-Küvetten je 200 µl Bradford Färbelösung in 800 µl ddH_2O verdünnt und fünf Minuten lang mit 1 µl Proteinlösung inkubiert. Da die Proteinkonzentration in Duplikaten gemessen wurde, wurden zwei Küvetten für jede Probe vorbereitet. Um das Gerät zu eichen, wurde die Absorption der Färbelösung ohne Protein bei 595 nm gemessen. Kurz vor dem Messvorgang wurde der Inhalt jeder Küvette nochmals durchmischt. Zur weiteren Untersuchung der Proteine mittels Western Blot wurde der Mittelwert der Proteinkonzentration der Duplikate gebildet.

2.2.2.13 Immunoblot

Der CK19-Knockout wurde zunächst auf Proteinebene mithilfe eines Western Blots nachgewiesen. Dazu wurden Proteine aus behandelten und unbehandelten Zellen zunächst durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend beim eigentlichen *Western Blotting* mit Antikörpern angefärbt.

2.2.2.13.1 SDS-PAGE

Zunächst wurde das 12 % Trenngel nach dem unten aufgeführten Schema vorbereitet, in die Gelvorrichtung gegeben und mit Isopropanol bedeckt 30 Minuten lang getrocknet. Das Isopropanol wurde entfernt und das Sammelgel hergestellt, auf das Trenngel gegeben und nach Einsetzen der Kämme ebenfalls getrocknet.

Tabelle 13: Zusammensetzung des 12 % SDS-Gels (ergibt 2 Gele)

Zusammensetzung	Sammelgel (5 ml) in ml	12 % Trenngel (10 ml) in ml
dH2O	3,085	3,3
30 % Acryl-Bisacrylamide-Lösung	0,83	4
1,0 M Tris-Puffer (pH 6,8)	0,945	
1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8)		2,5
10 % SDS-Lösung	0,05	0,1
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	0,05	0,1
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0,005	0,004

Um ein vergleichbares Bild zu erhalten, sollten von jeder Probe 20 µg Protein aufgetrennt werden. Die benötigte Proteinmenge wurde mithilfe der nach Abschnitt 2.2.2.2 bestimmten Proteinkonzentration ausgerechnet. In PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis wurde nun die berechnete Proteinmenge mit RIPA-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 12 µl pro Ansatz aufgefüllt und mit je 3 µl Lämmli-Puffer gemischt. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und bei 95 °C zehn Minuten lang denaturiert.

Die Gele wurden in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer positioniert, die Kämme entnommen und die Proben sowie einmal 5 µl Proteinmarker vorsichtig in die Taschen gegeben. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 70 V für ca. 2,5 h.

2.2.2.13.2 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-Dry* Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Zuvor wurde die Membran eine Minute lang in Methanol aktiviert und zehn Filterpapiere pro Membran in Transferpuffer eingelegt. Fünf Filterpapiere, das Gel, die Membran und weitere fünf Filterpapiere wurden auf dem Transfergerät zwischen den Elektroden platziert und Luftblasen aus dem Stapel gedrückt. Der Transfer wurde bei 300 mA durchgeführt und dauerte 45 Minuten.

Um unspezifische Antikörperbindungen abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in TBS-T auf dem Schüttler geblockt. Der verdünnte Erstantikörper wurde bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei zehnminütigen Waschschritten in TBS-T folgte die Inkubation des Zweitantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Antikörperverdünnungen sind Tabelle 14 zu entnehmen. Die Detektion der Proteine erfolgte im Chemilumineszenz System nach dreimaligem Waschen in TBS-T und fünfminütiger Inkubation im ECL-Substrat. Zur Belichtung wurde die Membran zwischen zwei Folien gelegt und Luftblasen entfernt.

Als Ladekontrolle bzw. *Housekeeping*-Gen wurde GAPDH verwendet. Zuvor wurde die Membran 15 Minuten lang in *Stripping Buffer* eingelegt, um die vorherigen Antikörper von der Membran zu entfernen, und drei Mal in TBS-T gewaschen. Die GAPDH-Antikörper wurden jeweils eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert (Verdünnungen s. Tabelle 14). Die Waschschritte und die Detektion wurden nach demselben Prinzip durchgeführt wie zuvor beschrieben.

Tabelle 14: Western Blot Antikörper mit Verdünnungen und Belichtungszeit

Zielprotein	Erstantikörper (Verdünnung)	Zweitantikörper (Verdünnung)	Belichtungszeit
CK19	CK19 [RCK108] (1:1000 in 5 % Milch in TBS-T)	Anti-Mouse HRP (1:10000 in 5 % Milch in TBS-T)	2 min
GAPDH (Ladekontrolle)	GAPDH (1:10000)	Anti-Mouse HRP (1:10000)	10 sec

2.2.2.14 Herstellung chemisch kompetenter E.coli mit der $CaCl_2$-Methode

Um Kontaminationen vorzubeugen, wurden die Anlage aller Bakterienkulturen sowie das Ausstreichen von Bakterien unter aseptischen Bedingungen am Bunsenbrenner vorgenommen. Benötigtes LB-Medium wurde autoklaviert, bei Bedarf mit Kanamycin versetzt und bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung der Agar-Platten wurde LB-Agar autoklaviert, bei Bedarf nach Abkühlen auf unter 60 °C Kanamycin hinzugegeben, in Petrischalen gegossen und nach Erstarren bei 4 °C gelagert.

Unbehandelte E.coli vom Stamm XL10-Gold wurden auf einer LB-Agarplatte mit Pipettenspitzen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der bewachsenen Platte wurde am nächsten Tag eine Kolonie in ein Kulturröhrchen mit 2 ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 UpM im Inkubationsschüttler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Vorkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium gegeben und im Inkubationsschüttler (37 °C, 225 UpM) kultiviert. Die optische Dichte wurde bei 600 nm regelmäßig mit dem Spektralphotometer bestimmt, wobei unbeimpftes LB-Medium zum Vergleich eingesetzt wurde. Sobald eine OD^{600} von 0,3 erreicht war, wurde die Bakterienkultur in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 15 Minuten lang auf Eis gestellt. In der vorgekühlten Zentrifuge (4 °C) wurden die Bakterien zehn Minuten lang bei 3000 *g* pelettiert und anschließend in 10 ml 4 °C kaltem 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation auf Eis, wurde sowohl der Zentrifugationsschritt (4 °C, 3000 *g,* 10 min.), als auch die Resuspension in 10 ml $CaCl_2$ wiederholt. Es folgten weitere 15 Minuten auf Eis sowie Zentrifugation (4 °C, 3000 *g,* 5 min.). Die Resuspension erfolgte dieses Mal in 2 ml 4 °C kaltem 100 mM $CaCl_2$ mit 15 % Glycerin. Nach 15 Minuten auf Eis wurden die chemisch kompetenten E.coli XL10-Gold zu je 50 µl in auf Eis vorgekühlten 0,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und rasch in einem Behälter mit Flüssigstickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.15 Transformation von E.coli durch Hitzeschock

Um Plasmide in E.coli einzubringen und so zu vervielfältigen, wurde die Transformation nach der Hitzeschock-Methode gewählt. Dazu wurden pro Plasmid 25 µl chemisch kompetente E.coli des Stamms XL10-Gold zehn Minuten lang auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl Plasmid-DNA (entspricht 20 ng) auf Eis mit den E.coli vermischt und der Ansatz wurde für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Im vorgewärmten Heizblock erfuhren die Bakterien nun bei 42 °C 60 Sekunden lang einen Hitzeschock und wurden im Anschluss zwei Minuten lang auf Eis gekühlt. Damit die Bakterien sich erholen und die auf dem Plasmid codierte Kanamycinresistenz ausbilden können, wurden sie mit 900 µl LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C und 150 UpM im Schüttler kultiviert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 13000 UpM in der Tischzentrifuge, wurden 800 µl des Überstands verworfen und die Bakterien im restlichen Überstand resuspendiert. Diese Suspension wurde mit einigen sterilen Metallkugeln auf einer mit Kanamycin versetzten LB-Agarplatte verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformationsrate wurde aus der Zahl der Kolonie bildenden Einheiten (CFU) pro µg Plasmid-DNA berechnet und betrug bei über 100 angewachsenen Kolonien jeweils über 5000 cfu / µg Plasmid-DNA.

Um die transformierten Bakterien für längere Zeit zu lagern, wurden aus Vorkulturen Glycerin-Dauerkulturen hergestellt. Dafür wurde eine Kolonie über Nacht bei 37 °C und 225 UpM in 2 ml $LB^{Kanamycin}$-Medium inkubiert. 500 µl der Kultur wurden in einem Kryoröhrchen 1:1 mit 500 µl autoklaviertem 50 % Glycerin in ddH_2O vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.16 Isolierung von Plasmid-DNA durch *Midi Prep*

Für die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das PureYield™ Plasmid Midiprep System verwendet und das zugehörige Herstellerprotokoll befolgt. Zunächst wurde eine Vorkultur in 2 ml $LB^{Kanamycin}$-Medium angelegt und zehn Stunden lang bei 37 °C und 225 UpM inkubiert. Die Vorkultur wurde überimpft in einen Erlenmayerkolben mit 250 ml $LB^{Kanamycin}$-Medium und unter denselben Bedingungen über Nacht kultiviert. Gemäß dem Herstellerprotokoll wurden alle Lösungen vorbereitet und die Kulturen in Zentrifugenflaschen zehn Minuten lang bei 3000 *g* pelettiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte nach Resuspension in 6 ml *Resuspension Solution* durch Mischen mit 6 ml *Cell Lysis Solution* sowie dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach gutem Durchmischen mit 10 ml *Neutralization Solution* wurde das Lysat für 15 Minuten bei 15000 *g* zentrifugiert.

Der Überstand, der die DNA enthält, wurde auf eine Reinigungssäule gegeben, die gemäß Protokoll auf eine Vakuumvorrichtung gesteckt wurde. Durch das Vakuum wurde die Flüssigkeit durch Reinigungs- und Bindesäule gezogen. Die Bindesäule wurde nun unter Vakuumanwendung nacheinander mit 5 ml *Endotoxin Removal Wash* und 20 ml *Column Wash Solution* gereinigt und zwei Minuten lang getrocknet und von Ethanol befreit. Für die Elution der DNA wurde die Bindesäule gemäß Herstellerangaben auf die Elutionsvorrichtung mit 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Mit 400 µl Nuklease-freiem Wasser wurde die Bindesäule eine Minute lang inkubiert und die DNA dann durch einminütige Vakuumanwendung in das Reaktionsgefäß eluiert. Die DNA-Konzentration wurde gemäß Abschnitt 2.2.2.2 gemessen und die DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Die folgenden Versuche wurden an den humanen Cholangiokarzinomzelllinien SZ-1 und TFK-1 durchgeführt. TFK-1 Zellen wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ; Deutschland) erworben. SZ-1 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Nisar P. Malek und Dr. Ruben R. Plentz (Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturmedium (RPMI-1640 mit 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin) bei 37 °C und 5 % CO_2-Gehalt bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Inkubator. 1x PBS wurde aus 10x PBS durch Verdünnung mit ddH_2O hergestellt und autoklaviert. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

2.2.3.1 Passagieren der Zellen

Nach drei bis fünf Tagen erreichten die Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen 70-90 % Konfluenz und wurden passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen in 10 ml PBS gewaschen und zur Ablösung der Zellen vier bis fünf Minuten lang mit 2 ml 1 x Trypsin bei 37 °C inkubiert. Resuspendiert wurden die Zellen in vorgewärmtem Zellkulturmedium. Zur besseren Vereinzelung der Zellen wurde das Medium auf- und abpippetiert und auf neue Zellkulturschalen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 aufgeteilt. Zuletzt wurde Zellkulturmedium bis zum Erreichen von 10 ml Gesamtvolumen pro Schale hinzugefügt.

2.2.3.2 Ernten der Zellen

Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin erfolgte ein Zentrifugationsschritt (1200 UpM, 5 min.). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml PBS gelöst und auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. In der vorgekühlten Tischzentrifuge (4 °C) wurden die Zellen pelettiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun bei -80 °C aufbewahrt oder weiterverwendet zur Isolierung von Proteinen oder Nukleinsäuren.

2.2.3.3 Kryokonservierung von Zellen

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden die subkonfluenten bis konfluenten Zellen zunächst mit Trypsin vom Schalenboden gelöst (s. 2.2.3.1). Die Zellsuspension wurde in FBS-haltigem Medium zum Inaktivieren des Trypsins aufgenommen und einem Zentrifugenröhrchen fünf Minuten lang bei 1200 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 750 µl kaltem Einfriermedium, bestehend aus 90 % FBS und 10 % DMSO, resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einem vorgekühlten Einfrierbehälter über Nacht bei -80 °C gekühlt und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt.

Zur Weiterkultivierung wurden die Kryoröhrchen ein bis zwei Minuten lang im Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner gefrorener Rest zu sehen war. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und es wurde langsam 5 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium hinzugefügt. Nach fünfminütiger Zentrifugierung bei 1200 UpM wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturschale ausplattiert.

2.2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die resuspendierten Zellen nach der Lösung mit Trypsin (s. 2.2.3.1) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 50 µl der Zellsuspension entnommen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen nicht am Boden des Gefäßes abgesetzt haben. Die entnommenen Zellen wurden nun 1:1 mit Trypanblau verdünnt, um die nicht viablen Zellen zu markieren. Nach guter Durchmischung wurden 10 µl der Suspension zwischen Neubauer Zählkammer und Deckglas gegeben ohne Luftblasen mit einzuschließen. Die vier Eckquadranten wurden unter dem Lichtmikroskop mit dem Handzähler ausgezählt, wobei jeweils Zellen an und auf der linken und oberen Begrenzung mitgezählt wurden. Zellen auf der rechten und unteren Begrenzung, ebenso wie mit Trypanblau gefärbte

Zellen, wurden dagegen nicht berücksichtigt. Das arithmetische Mittel der Quadrate wurde gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor (2) multipliziert. Da ein Quadrant von 0,1 µl Flüssigkeit bedeckt wird, ergibt die Multiplikation des Ergebnisses mit 10^4 die Zellzahl pro Milliliter. Die für den jeweiligen Versuch benötigte Menge konnte aus diesem Ergebnis abgeleitet werden.

2.2.3.5 Transfektion mit Lipofectamine™ 3000

Um einen stabilen Knockout von CK19 herbeizuführen, wurde mittels CRISPR/Cas9 ein Doppelstrangbruch in der Exonsequenz des CK19-Gens induziert. Es wurden drei CRISPR-Cas9-*all-in-one* Plasmide von Sigma-Aldrich verwendet. Die Plasmide enthalten die genetische Information für die *guide*-RNA, die Nuklease Cas9 sowie ein RFP (rot fluoreszierendes Protein). Die Zielsequenzen der *guide*RNA befinden sich im ersten Exon des humanen Zytokeratin 19 – Gens.

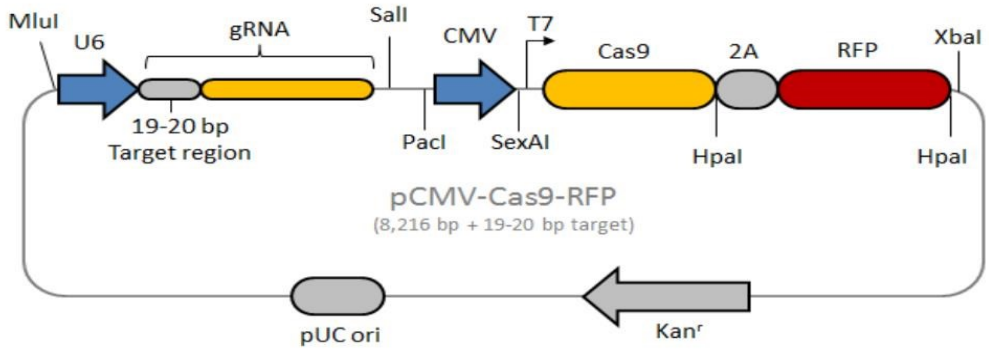

Abbildung 6: Plasmidkarte der CRISPR-Cas9 Plasmide

MluI, SalI, PacI, SexAI, HpaI, HpaI, XbaI: Restriktionsschnittstellen der jeweiligen Enzyme; **U6**: humaner U6 Promotor; **CMV**: Cytomegalovirus-Promotor; **T7**: durch T7-RNA-Polymerase aktivierbarer Promotor; **gRNA**: guideRNA; **Cas9**: Caspase9; **2A**: Peptidverbindung; **RFP**: *red fluorescent protein* / rot fluoreszierendes Protein; **pUC ori**: *origin of replication* / Replikationsursprung; **Kan^r**: Kanamycinresistenzgen. Quelle: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/262/320/crisprbul.pdf

Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion mit dem Lipofectamine 3000 Reagent. Alle benötigten Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt. Die benötigte Menge der einzelnen Komponenten ist Tabelle 15 zu entnehmen. Um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 % zu erreichen, wurden 24 Stunden zuvor in einer 6-Well-Zellkulturplatte entsprechend viele Zellen mit je 3 ml Zellkulturmedium ausgesät (s. Tabelle 15). Durch Schwenken in Achterbewegungen wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. Am nächsten Tag wurde das alte Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und je 1 ml frisches Medium in jedes Well gegeben. Dann wurden je 125 µl Opti-MEM-Medium pro Ansatz in Reaktionsgefäßen vorgelegt und Ansatz A durch Zugabe von Lipofectamine hergestellt sowie drei Sekunden lang mit dem Vortexmischer gut durchmischt.

Ebenso wurde Ansatz B nach Zugabe jeder Komponente (Plasmid-DNA und P-3000 Reagens) zu Opti-MEM-Medium gründlich durchmischt.

Tabelle 15: Transfektion mit Lipofectamine™ 3000: Zellzahl und Zusammensetzung der Ansätze nach Zelllinie

Zelllinie	Zellzahl pro Well	Ansatz A pro Well	Ansatz B pro Well
TFK-1	0,7 x 10^6	Opti-MEM: 125 µl Lipofectamine 7,5 µl	Opti-MEM: 125 µl Plasmid-DNA: 5 µg P-3000 (2 µl/µg DNA): 10 µl
SZ-1	0,9 x 10^6	Opti-MEM: 125 µl Lipofectamine 3,75 µl	Opti-MEM: 125 µl Plasmid-DNA: 2 µg P-3000 (2 µl/µg DNA): 4 µl

Pro Well wurden nun 125 µl Ansatz A und 125 µl Ansatz B gut durchmischt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die DNA-Lipofectamine-Mischung tropfenweise zu den Zellen gegeben wurde. Nach 24 Stunden im Inkubator wurde das Medium abgenommen und je 2 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium in jedes Well gegeben.

2.2.3.6 Einzelzell-Sorting der transfizierten Zellen

Das *Sorting* der Zellen fand zwei Tage nach der Transfektion statt. Zunächst wurde die Aktivität des RFP mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des Cy3 Anregungsfilters überprüft. Als Vergleich dienten hierbei unbehandelte Zellen. Vorbereitend wurde in jeweils zwei 96-Well-Zellkulturplatten pro Zelllinie und Plasmid konditioniertes und frisches Zellkulturmedium im Verhältnis 1:1 (je 50 µl) vorgelegt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und fünf Minuten lang mit je 0,5 ml Trypsin pro Well im Inkubator gelöst. Nach Zugabe von je 3 ml Zellkulturmedium pro Well wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1200 UpM 5 min.). Die Zellen wurden in je 5 ml frisch hergestelltem FACS-Puffer (1 x PBS m. 2 % FBS u. 5 mM EDTA) resuspendiert und nochmals abgefugt (1200 UpM 5 min.). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Um die Zellen gut zu vereinzeln, wurden sie über den Filterdeckel in Rundboden-Röhrchen gegeben und der Filter mit jeweils 500 µl FACS-Puffer nachgespült. Die Röhrchen wurden umgehend auf Eis gestellt und je 0,5 µl SYTOX™ *Blue Dead Cell Stain* zur Markierung toter Zellen zugegeben.

Das Einzelzell-*Sorting* wurde freundlicherweise in der FACS Corefacility von der Arbeitsgruppe molekulare Virologie am FACS Aria II (BD Biosciences) durchgeführt. Um die korrekten Schwellenwerte am Zytometer einstellen zu können, wurden untransfizierte, ansonsten gleich behandelte Zellen der beiden Zelllinien mitgeführt.

2.2.3.7 Kultivierung der transfizierten Zellen

Sechs Tage nach der Zellsortierung wurden in jedes Well 100 µl Zellkulturmedium hinzugefügt. In einem Well jeder 96-Well-Zellkulturplatte wurden unbehandelte Zellen ausgesät, um später das Mikroskopieren zu erleichtern. Ab Tag 7 nach der Sortierung wurden die Platten regelmäßig unter dem Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung auf Zellwachstum kontrolliert. Bei Subkonfluenz wurde das alte Medium abgenommen, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin im Inkubator vom Plattenboden gelöst (Inkubationszeit 7-10 min.). Nach Resuspension in Zellkulturmedium wurden die Zellen in eine 48-Well-Zellkulturplatte umgesetzt. Bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die Zellen nach dem gleichen Prozedere in die 24-Well-Zellkulturplatte umgesetzt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis die 10 cm – Zellkulturplatte erreicht war. Die benötigten Mengen der Lösungen hierfür sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Mengenangaben der Zellkulturlösungen nach Plattenformat

Plattenformat	Zellkulturmedium	PBS	Trypsin
96-Well-Zellkulturplatte	200 µl	100 µl	50 µl
48-Well-Zellkulturplatte	400 µl	200 µl	100 µl
24-Well-Zellkulturplatte	1 ml	500 µl	200 µl
12-Well-Zellkulturplatte	2 ml	1 ml	400 µl
6-Well-Zellkulturplatte	3 ml	1,5 ml	500 µl

2.2.3.8 Wachstumskurven

Pro Well wurden je 50.000 Zellen in 24-well-Zellkulturplatten in einem ml Zellkulturmedium ausgesät. Zur besseren Vereinzelung wurden die Zellen zuvor mit 200 µl Pipettenspitzen auf- und abpipettiert und durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gegeben. Nach jeweils ein bis fünf Tagen Wachstum im Inkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen, ca. zehn

Minuten bei 37 °C mit Trypsin inkubiert und gemäß Abschnitt 2.2.3.4 gezählt. Drei Tage nach Aussäen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

2.2.3.9 Migrationsassay

In 6-Well-Zellkulturplatten wurden Zellen zwei Tage lang bis zum Erreichen von Konfluenz kultiviert. Mit einer 200 µl Pipettenspitze wurde nun mittig ein Kratzer in jedem Well gemacht, sodass ein zellfreier Spalt im Zellrasen entstand. Hierbei wurde darauf geachtet, die Pipettenspitze senkrecht zu halten und mit gleichbleibender Geschwindigkeit sowie konstantem Druck zu ziehen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und vorgewärmtes Zellkulturmedium hinzugefügt. Pro Zelllinie wurden je drei Kratzer ausgewertet, indem sie bei zweifacher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop in ganzer Länge abfotografiert wurden. Pro Kratzer wurden je fünf repräsentative Bilder ausgewählt und deren Breite mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ an zehn Stellen pro Bild ausgemessen. Nach 24 sowie 48 Stunden wurden in gleicher Weise Fotos gemacht und die Breite der Kratzer an derselben Stelle wie zu Zeitpunkt null ausgemessen. Für jedes Foto wurde der Mittelwert der gemessenen Strecken gebildet und nach folgender Formel verrechnet:

$$\text{bedeckte Fläche nach 24/48 h in \%} = \frac{\text{Spaltbreite 0h} - \text{Spaltbreite 24/48 h}}{\text{Spaltbreite 0 h}} \times 100$$

2.2.3.10 Soft Agar Assay

Mit dem Ziel, die Fähigkeit von Tumorzellen zu untersuchen, ohne Kontakt zueinander oder zu einer beschichteten Oberfläche Kolonien zu bilden, wurden die Zellen in weichem Agar (*Soft Agar)* ausgesät und deren Wachstum beobachtet. Dafür wurde vorbereitend 1 % LMP-Agarose (*Low Melting Point* / niedriger Schmelzpunkt) in Ampuwa Sterilwasser aufgelöst und autoklaviert. Außerdem wurde zweifach konzentriertes Zellkulturmedium hergestellt durch Auflösen von 2 g RPMI-1640-Pulvermedium sowie 0,4 g Natriumbikarbonat in 100 ml Ampuwa Sterilwasser. Das 2x Medium wurde durch einen Spritzenfilter gegeben und unter der Sterilbank mit 2 ml Penicillin-Streptomycin sowie 20 ml FBS ergänzt.

Pro Zelllinie wurde eine 6-Well-Zellkulturplatte mit Soft Agar beschichtet. Dazu wurde 1x LMP-Agar in der Mikrowelle 1-2 Minuten lang verflüssigt und in einem Wasserbad unter Temperaturkontrolle bei 42 °C warm gehalten. Um einfach konzentriertes Medium in 0,5 % LMP-Agar herzustellen, wurde 1 % LMP-Agar im Verhältnis 1:1 mit

2x Zellkulturmedium vermischt und jeweils 1,5 ml der Lösung in jede Well gegeben. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und über Nacht bei 4 °C verfestigt.

Am nächsten Tag wurden die Platten im Inkubator 30 Minuten lang vorgewärmt, während die Zellen vorbereitet und gezählt wurden (s. 2.2.3.4). Um eine Endkonzentration von 10.000 Zellen / ml 0,5 % Agar zu erhalten, wurden je 90.000 Zellen pro Zelllinie in 4,5 ml 2x Zellkulturmedium resuspendiert. Zur besseren Vereinzelung wurden die Zellen zuvor durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 42 °C im Wasserbad 1:1 mit geschmolzenem 1x LMP-Agar vermischt. In jedes Well der beschichteten Platten wurde je 1 ml der Zell-Agar-Mischung gegeben und die Platten wurden eine Stunde lang unter der Sterilbank verfestigt. Zuletzt wurden in jedes Well 200 µl 1x Zellkulturmedium gegeben, um den Agar vor dem Austrocknen zu schützen. Alle 3-4 Tage wurden erneut 100 µl 1x Zellkulturmedium hinzugefügt.

Nach 3 Wochen wurden pro Zelllinie 4-6 Wells ausgewertet. Von der gesamten Fläche jedes Wells wurden bei zweifacher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop Fotos gemacht. An fünf repräsentativen Bildern pro Well wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ die Anzahl sowie die Größe der Zellkolonien ausgemessen. Dabei wurden Kolonien ab einer Größe von 1600 μm^2 als solche betrachtet.

2.2.3.11 Sphere Formation Assay

Bei diesem Versuch wird die Fähigkeit von Tumorzellen beobachtet, in serumfreier und nicht-adhärenter Umgebung 3D-Tumorsphären zu bilden. Dabei wurde darauf geachtet, die Zellen mittels Zellsiebs sowie Auf- und Abpipettierens gut zu vereinzeln und mehrere Waschschritte einzufügen, um Spuren von FBS zu eliminieren.

Die mit Trypsin gelösten und in Zellkulturmedium resuspendierten Zellen (s. 2.2.3.1) wurden mit der 1 ml Glaspipette mit aufgesteckter 200 µl Pipettenspitze auf- und abpipettiert und in einem Zentrifugenröhrchen bei 1200 UpM fünf Minuten lang pelettiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 5 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (1200 UpM 5 min.). Nach einem weiteren Waschschritt in PBS wurden die Zellen durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gegeben und die Zellzahl bestimmt (s. 2.2.3.4). Je 30.000 Zellen pro Zelllinie wurden entnommen, in einem frischen Zentrifugenröhrchen pelettiert (1200 UpM 5 min.) und der Überstand verworfen. Die Resuspension erfolgte in

3 ml *Sphere-Assay*-Medium, dessen Zusammensetzung dem folgenden Schema zu entnehmen ist:

Sphere-Assay-Medium:	DMEM/F-12, GlutaMAX™ *Supplement*	500 ml
	B-27 *Supplement* (50x), serum-frei	10 ml
	Rekombinantes humanes FGF-β	5 µg
	Penicillin-Streptomycin	10 ml

In einer gering anhaftenden 24-Well-Zellkulturplatte (*Ultra Low Attachment Plate)* wurden pro Well 5.000 Zellen in 500 µl *Sphere-Assay*-Medium ausgesät und gut verteilt. Alle zwei Tage wurden 100 µl des Mediums in jedes Well hinzugefügt und die Zellen täglich durch auf- und abpipettieren verteilt.

Nach drei Tagen wurden unter dem Lichtmikroskop bei zweifacher Vergrößerung Bilder gemacht, wobei darauf geachtet wurde, die gesamte Fläche jedes Wells abzufotografieren. Mithilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ wurden die Tumorsphären gezählt, mit der PC-Maus umrandet und ausgemessen. Ab einer Fläche von 1600 μm^2 (entspricht einem Durchmesser von ca. 45 µm) wurde eine Sphäre als solche definiert.

2.2.4 Transplantationsversuch

Für die subkutane Transplantation von Tumorzellen wurden 15 12 - 14 Wochen alte NOD-*scid*-γ-Mäuse (NOD.*Cg-Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ) verwendet.

2.2.4.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen und nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und der Tierschutz-Versuchstierverordnung gehalten. Der Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Aktenzeichen 35/9185.81-3 Tierversuchsnummer 1175. Bei 24 °C, 57 % Luftfeuchtigkeit und einem Tag/Nachtrhythmus von 14 h / 10 h erhielten die Mäuse Wasser und Nahrung *ad libitum.* Die Käfige wurden einzeln belüftet mit 60 ACH *(air change per hour* – Luftaustausche pro Stunde) und alle 7 Tage gewechselt. Alle Arbeiten mit den Tieren wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.4.2 subkutane Transplantation von Tumorzellen

Zunächst wurden pro Zelllinie ca. 8 Mio. Tumorzellen geerntet. Dazu wurden ca. 100 ml Zellkulturmedium durch einen Spritzenfilter gegeben, ca. 10 ml des filtrierten Mediums bei

4 °C gekühlt und der Rest im Wasserbad vorgewärmt. Die über Nacht bei 4 °C aufgetaute Matrigel Matrix wurde vorsichtig auf Eis 1:1 mit gekühltem 1x PBS vermischt und bei 4°C kalt gestellt. Je ein bis zwei konfluente Platten pro Zelllinie wurden mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin im Inkubator vom Plattenboden gelöst. Nach Resuspension im vorgewärmten und filtrierten Zellkulturmedium wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben gezählt und je 8 Mio. Zellen bei 1200 UpM fünf Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 800 µl des kalten Mediums auf Eis resuspendiert. 750 µl der Suspension wurden auf Eis vorsichtig mit derselben Menge Matrigel in PBS vermischt.

Kurz vor der Injektion wurden die Zellen im Matrigel-Zellkulturmedium-Gemisch noch einmal gut durchmischt. Mit einer gekühlten Einmalspritze wurden jedem Tier an insgesamt 4 Stellen am Rücken je 500.000 Zellen in 100 µl des Gemischs subkutan injiziert. Matrigel enthält zahlreiche Proteine der Extrazellulärmatrix sowie Wachstumsfaktoren und bildet bei 37 °C ein Hydrogel, das nach ca. einer Woche abgebaut wird.

2.2.4.3 Analyse der Tiere und Gewebeentnahme

Die Mäuse wurden täglich kontrolliert und wöchentlich die Tumoren abgetastet und deren Größe gemessen. 3 Wochen nach Transplantation wurden die Tiere durch den Betreuer der Arbeit mit CO_2 betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Tumore wurden entnommen und innere Organe nach Metastasen untersucht. Die entnommenen Tumore wurden ausgemessen, gewogen und auf Eis in zwei Teile geschnitten. Je ein Teil des Gewebes wurde in Einbettkassetten in 4 % PFA fixiert, während die andere Hälfte auf Trockeneis schockgefroren wurde und zur weiteren Analyse bei -80 °C in Kryoröhrchen gelagert wurde.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Graphen wurde mit „Graph Pad Prism 6“ vorgenommen. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD (Standardabweichung) angegeben. Zur Auswertung statistischer Unterschiede zweier Gruppen wurde unter Annahme einer nichtparametrischen Verteilung der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt. Eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

Wie in der Einleitung dargelegt, ist eine Untergruppe CK19-positiver hepatozellulärer Karzinome mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet. Im Gegensatz dazu wird im Großteil der intrahepatischen Cholangiokarzinome CK19 exprimiert. Zum Zusammenhang zwischen CK19-Expression und der Malignität von Cholangiokarzinomen gibt es bislang wenige Studien, die keinen eindeutigen Effekt erkennen lassen.

Der Einfluss von CK19 auf die Malignität von Leberkarzinomen wurde in dieser Arbeit zunächst in Lebertumorgewebe von transgenen Mauskohorten der Hepatokarzinogenese untersucht. Hierbei wurde die CK19-Expression in Abhängigkeit von der Tumorentität und der Zusammenhang mit der Expression weiterer Stammzellmarker beleuchtet. In einem zweiten Teil wurde der Einfluss von CK19 auf die Malignität in Cholangiokarzinomen untersucht. Hierfür wurde ein stabiler CK19-Knockout in Cholangiokarzinomzelllinien induziert und deren Malignität sowohl *in vitro* als auch in Xenotransplantationsversuchen mit den parentalen CK19-Wildtyp- Cholangiokarzinomzelllinien verglichen.

3.1 Untersuchung der CK19-Expression in Lebertumoren transgener Mäuse

Im ersten Teil der Arbeit wurde die CK19-Expression in Lebertumoren abhängig von Tumorentität und in Zusammenhang mit der Expression weiterer Tumorstammzellmarker untersucht. Hierfür wurde Tumorgewebe aus bereits vorliegenden transgenen Mausmodellen der Hepatokarzinogenese auf Basis von chronischer Leberentzündung und leberspezifischem *Trp53*-Verlust untersucht. Eine detaillierte Beschreibung der Mausmodelle ist Abschnitt 1.2 zu entnehmen. In bereits publizierten Ergebnissen der AG Lechel konnte gezeigt werden, dass eine chronische Leberentzündung auf Basis einer konstitutiv aktiven IKK2 zur Entstehung von überwiegend HCCs führt, während es durch einen zusätzlichen leberspezifischen *Trp53*-Verlust zu einer höheren Tumorlast und einem Shift hin zu ICCs kommt [101]. Eine embryonale leberspezifische *Trp53*-Deletion ohne Leberentzündung führte dagegen zur Entstehung von überwiegend gemischt differenzierten Tumoren (s. Abschnitt 1.2.5) [39]. In dieser Arbeit wurde die CK19-Proteinexpression in murinem Lebertumorgewebe mittels Immunhistochemie und die mRNA-Expression von *Ck19* und weiteren Stammzellmarkern mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt.

3.1.1 Erhöhte CK19-Proteinexpression in ICCs und HCC-CCs von Mäusen mit leberspezifisch deletiertem *Trp53*

Zur Beurteilung der CK19-Expression auf Proteinebene wurden Gewebeschnitte von Maustumoren immunhistochemisch angefärbt. Es wurden HCCs und ICCs aus Mäusen mit chronischer Leberentzündung und leberspezifischer *Trp53*-Deletion im Alter von vier Wochen (CAIKK2 p53 -/- 4 Wo.), sowie gemischt differenzierte Tumore (HCC-CC) aus der Kohorte mit embryonaler *Trp53*-Deletion beurteilt. Als positiv gewertet wurde eine Färbung von mindestens 5 % der Tumorzellen von moderater bis starker Intensität. Zur Abgrenzung von Tumor- und Lebergewebe wurden zusätzlich H&E-Färbungen angefertigt. Hier zeigten sich die typischen Tumormorphologien mit großkernigen neoplastischen Hepatozyten bei HCCs und drüsenartig angeordneten Zellen mit viel Bindegewebe bei ICCs. Die HCC-CCs zeigten Anteile beider Tumorentitäten (s.Abb. 7).

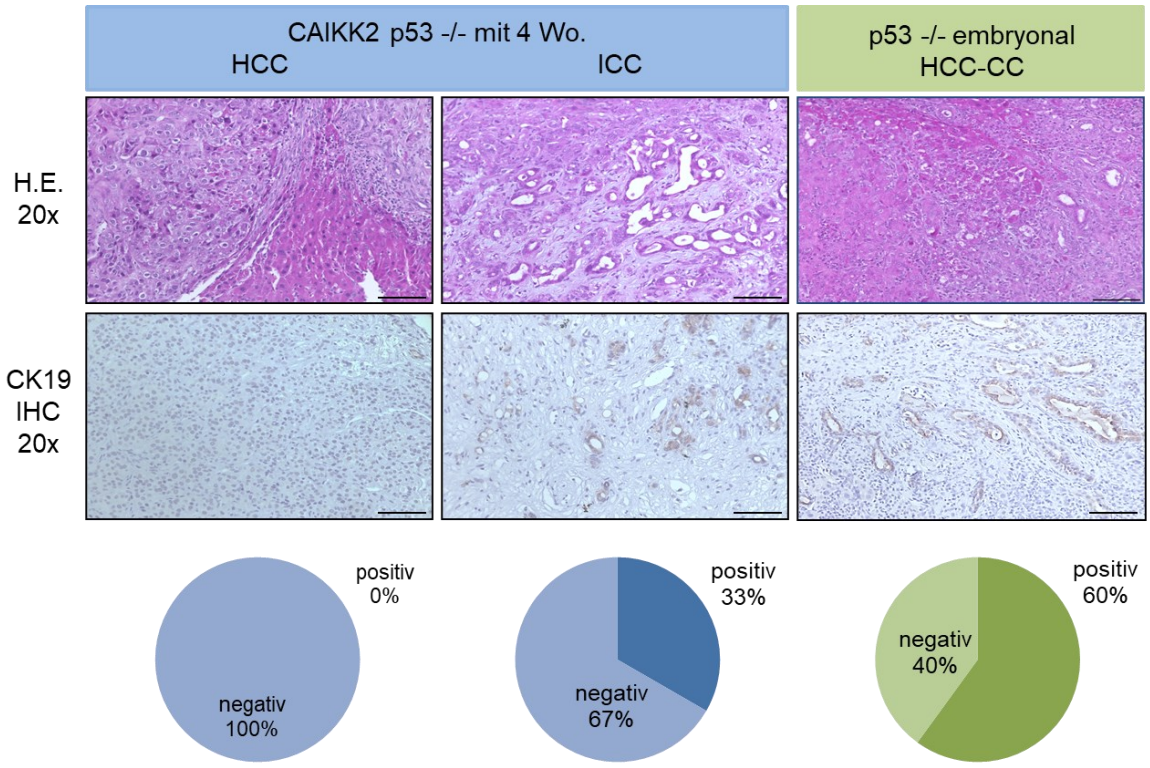

Abbildung 7: Erhöhte CK19-Proteinexpression in ICCs und HCC-CCs von Mäusen mit leberspezifischem Trp53-Verlust

Exemplarische Ausschnitte aus Hämatoxylin-Eosin-Färbungen sowie CK19-Immunhistochemie in 20facher Vergrößerung. Es wurde Tumorgewebe von Mäusen aus der CAIKK2 p53 -/- 4 Wo. Kohorte (HCC und ICC) sowie der p53 -/- embryonal Kohorte (HCC-CC) verwendet. Die CK19-Färbung wurde semiquantitativ ausgewertet: Bei über 5 % gefärbten Zellen sowie moderater bis starker zytoplasmatischer/membranöser Färbung wurde das Gewebe als positiv gewertet. **HCC**: Hepatozelluläres Karzinom; **ICC**: Intrahepatisches Cholangiokarzinom; **HCC-CC**: Kombiniertes hepato- und cholangiozelluläres Karzinom. Messbalken: 100 µm. n = 5 – 6

In der immunhistochemischen Färbung konnte eine vermehrte CK19-Expression bei den ICCs und den gemischt differenzierten Tumoren im Vergleich zu den HCCs beobachtet werden. Im HCC-Gewebe waren nur sehr vereinzelt schwach CK19-positive Gallengänge zu finden. Im angrenzenden Lebergewebe fanden sich gelegentlich angefärbte Gallengangsproliferate. Im Gegensatz dazu zeigten zwei der sechs untersuchten ICCs und drei der fünf gemischt differenzierten Tumore eine moderate membranöse und/oder zytoplasmatische Färbung (s. Abb. 7). Bei den gemischt differenzierten Tumoren waren nur die ICC-Anteile CK19-positiv, während in den HCC-Anteilen keine CK19-Färbung beobachtet wurde.

3.1.2 Erhöhte *Ck19*-mRNA-Expression in gemischt differenzierten Tumoren von Mäusen mit leberspezifisch deletiertem *Trp53*

Durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die *Ck19*-mRNA-Expression in Lebertumorgewebe unterschiedlicher Tumorentitäten verglichen. Dazu wurde Tumorgewebe aus verschiedenen transgenen Mauskohorten verwendet, deren Genotyp Abbildung 2 zu entnehmen ist. Verglichen wurden HCCs aus Mäusen mit leberspezifischer Entzündungsantwort (CAIKK2), HCCs und ICCs aus Mäusen mit Leberentzündung und später leberspezifischer *Trp53*-Deletion (CAIKK2 p53-/- mit 4 Wo.), ICCs aus Mäusen mit Leberentzündung und früher *Trp53*-Deletion (CAIKK2 p53-/- embryonal) sowie HCC-CCs aus Mäusen mit früh deletiertem *Trp53* ohne Leberentzündung (p53-/- embryonal).

Eine signifikante Erhöhung der relativen *Ck19*-mRNA-Expression im Vergleich zu Lebergewebe der Kontrollmäuse konnte in den gemischt differenzierten Tumoren der p53-/- embryonal Kohorte beobachtet werden (s. Abb. 8A). Eine geringe Erhöhung der *Ck19*-Expression in HCCs und ICCs der Kohorten mit chronischer Leberentzündung und Trp53-Verlust war nicht signifikant.

3.1.3 Korrelation der *Ck19*-Expression mit der Expression der hepatischen Progenitor-/ Stammzellmarker *Cd24* und *Cd133*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen *Ck19* und weiteren hepatischen Progenitor- oder Stammzellmarkern herzustellen, wurde die mRNA-Expression verschiedener Marker in denselben Tumorproben untersucht. Insbesondere *Cd24* (Abb. 8B1) und *Cd133* (Abb. 8B2), aber auch *Cd90* (Abb. 8B3) und *Epcam* (Abb. 8B4) waren ähnlich wie *Ck19* in den gemischt differenzierten Tumoren signifikant stärker exprimiert.

Im Gegensatz zu *Ck19* war die Expression der untersuchten Marker auch in Tumoren anderer Entitäten und Kohorten signifikant erhöht im Vergleich zu Lebergewebe aus Kontrollmäusen. Einige Marker (*Epcam*, *Cd44*, Osteopontin (*Spp-1*), *Sox9*) waren in Tumoren, die auf Basis einer induzierten Entzündungsantwort auftreten (CAIKK2) stärker exprimiert als in den HCC-CCs der Kohorte mit *Trp53*-Deletion alleine (s. Abb. 8B4-B7).

In Korrelationsanalysen der oben beschriebenen qPCR-Daten konnte ein deutlicher und signifikanter Zusammenhang der *Ck19*-mRNA-Expression mit der mRNA-Expression von *Cd24* (s. Abb. 9A: r = 0,63) und *Cd133* (s. Abb. 9AbbildungB: r = 0,54), sowie ein schwacher signifikanter Zusammenhang mit der *Cd44*- (s. Abb. 9C: r = 0,38) und der *Epcam*-mRNA-Expression (s. Abb. 9D: r = 0,43) festgestellt werden. Hierfür wurden die ermittelten relativen mRNA-Expressionslevel in Leber- und Leberkarzinomgewebe transgener Mauskohorten nach Spearman miteinander korreliert. Zwischen der *Ck19*-Expression und der Expression von *Cd90*, Osteopontin und *Sox9* konnte kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden (s. Abb. 9E-G).

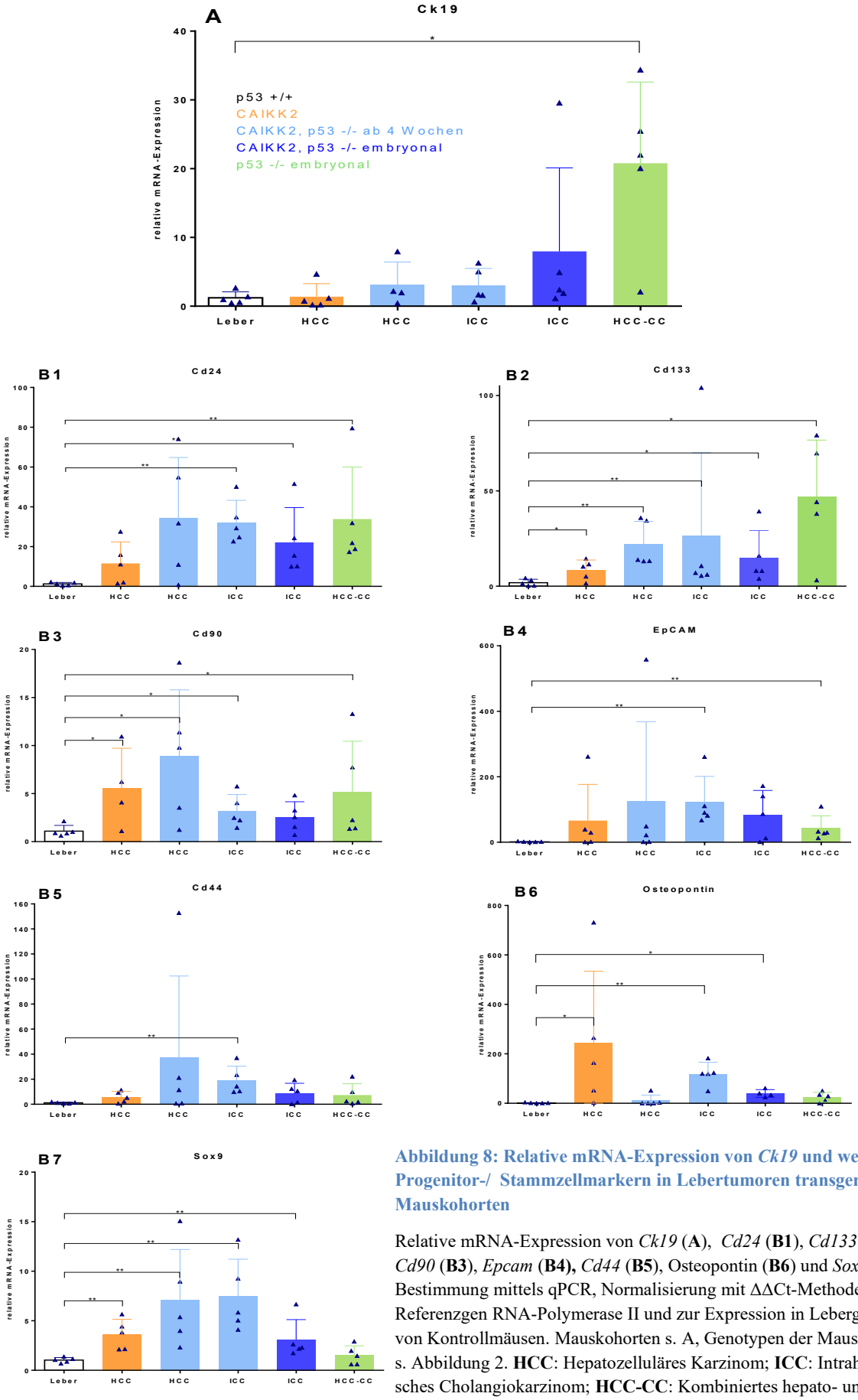

Abbildung 8: Relative mRNA-Expression von *Ck19* und weiteren Progenitor-/ Stammzellmarkern in Lebertumoren transgener Mauskohorten

Relative mRNA-Expression von *Ck19* (**A**), *Cd24* (**B1**), *Cd133* (**B2**), *Cd90* (**B3**), *Epcam* (**B4**), *Cd44* (**B5**), Osteopontin (**B6**) und *Sox9* (**B7**). Bestimmung mittels qPCR, Normalisierung mit ΔΔCt-Methode zum Referenzgen RNA-Polymerase II und zur Expression in Lebergewebe von Kontrollmäusen. Mauskohorten s. A, Genotypen der Mauskohorte s. Abbildung 2. **HCC**: Hepatozelluläres Karzinom; **ICC**: Intrahepatisches Cholangiokarzinom; **HCC-CC**: Kombiniertes hepato- und cholangiozelluläres Karzinom. Darstellung einzelner Datenpunkte sowie Mittelwerte ± SD. Test nach Mann-Whitney. Signifikanzniveau bei

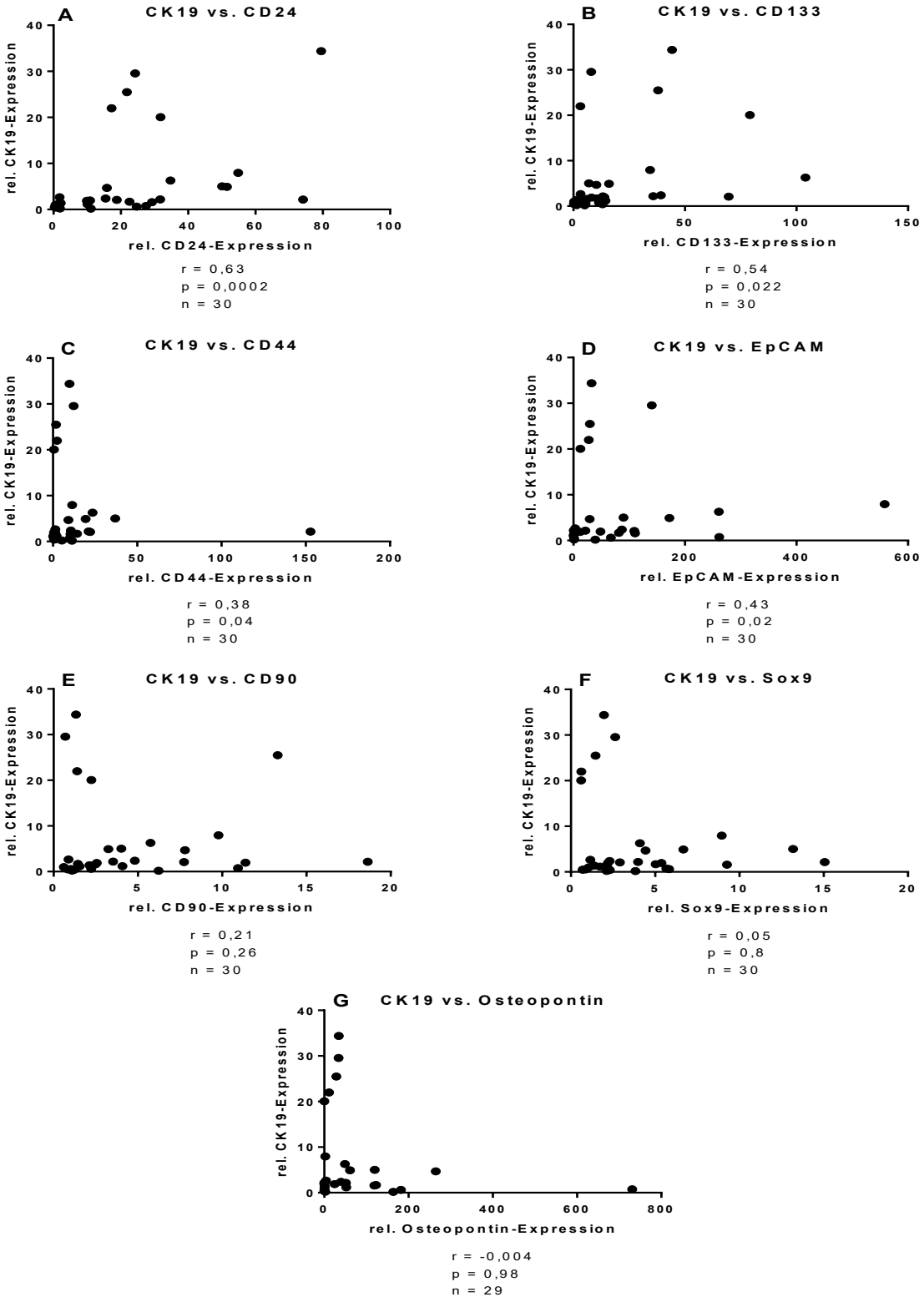

Abbildung 9: Spearman-Korrelationen der mRNA-Expression von *Ck19* und der hepatischen Progenitor-/ Stammzellmarker *Cd24* (A), *Cd133* (B), *Cd44* (C), *Epcam* (D), *Cd90* (E), *Sox9* (F) und Osteopontin (G) in Leber- und Leberkarzinomgewebe transgener Mäuse

Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qPCR bestimmt und mit der ΔΔCt-Methode zum Referenzgen RNA-Polymerase II sowie zur Expression in Lebergewebe von Kontrollmäusen normalisiert. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen der mRNA-Expression in Leber- und Leberkarzinomgewebe unterschiedlicher Entitäten und Mauskohorten aus Abbildung 8. Die verwendeten Mauskohorten sind Abbildung 8A zu entnehmen, für die Genotypen der Mauskohorten s. Abbildung 2. Der Rangkorrelationskoeffizient r und die Signifikanz p wurden nach Spearman ermittelt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$. n = 29-30

3.2 Der Einfluss von CK19 in Cholangiokarzinomzelllinien

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von CK19 auf die Malignität in Cholangiokarzinomen untersucht. Hierfür wurde in einer extrahepatischen (TFK-1) und einer intrahepatischen (SZ-1) CC-Zelllinie mittels CRISPR-Cas9 ein stabiler *CK19*-Knockout induziert und deren Malignität *in vitro* und *in vivo* mit Wildtyp-Zellen verglichen.

3.2.1 Induktion eines stabilen *CK19*-Knockouts in den Cholangiokarzinomzelllinien SZ-1 und TFK-1 mittels CRISPR/Cas9

Um einen stabilen Knockout des *CK19*-Gens herbeizuführen, wurden CRISPR-Cas9-*all-in-one*-Plasmide in die Cholangiokarzinomzelllinien SZ-1 und TFK-1 eingebracht. Die Plasmide enthalten sowohl die genetische Information für die *guide*RNA, die spezifisch am ersten *CK19*-Exon bindet, als auch für die Nuklease Cas9, die mithilfe der *guide*RNA gezielt DNA-Doppelstrangbrüche induziert (s. Abschnitt 1.4). Die Transfektion wurde mittels Lipofektion mit dem Lipofectamine 3000 Reagent durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit einem FACS-Sorter (=*fluorescence-activated cell sorting*) einzeln sortiert und kultiviert, bis von jedem Zellklon ausreichend Material zur Western-Blot-Analyse gewonnen werden konnte.

Insgesamt konnten zwölf Klone der transfizierten TFK-1 Zellen und 25 Klone der SZ-1 Zellen kultiviert werden. Davon wurden ein Klon der Zelllinie TFK-1 und zwei Klone der Zelllinie SZ-1 identifiziert, die im Western Blot

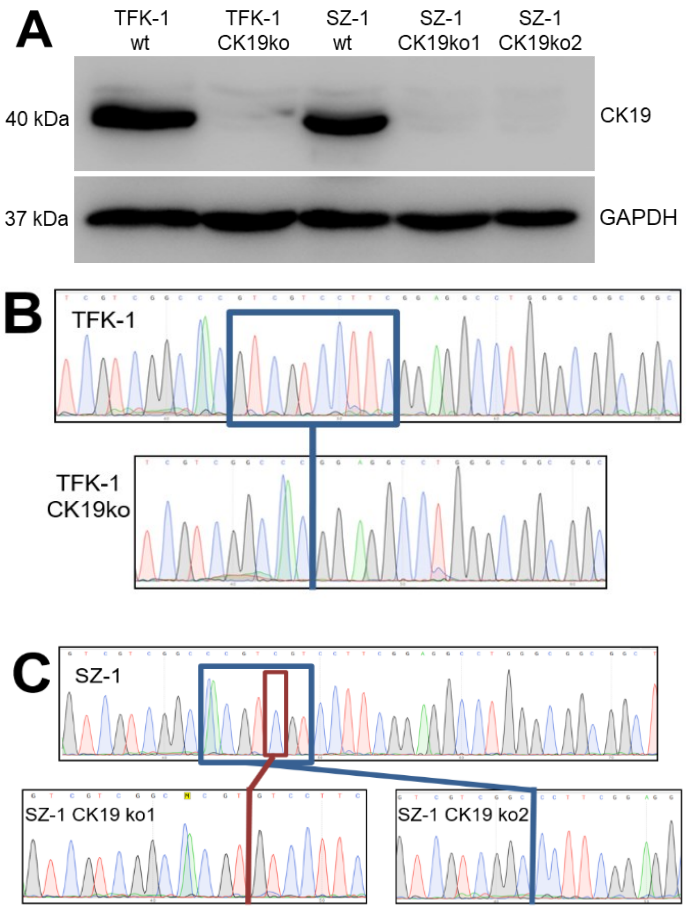

Abbildung 10: Induktion eines stabilen CK19-Knockouts in TFK-1 und SZ-1 Zellen

A: CK19-Proteinexpression der TFK-1 und SZ-1 Wildtyp (wt) und *CK19*-Knockout-Klone (*CK19*ko). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet; **B, C**: Sanger-Sequenzierunngen der TFK-1 (B) und SZ-1 (C) Wildtyp und *CK19*ko-Klone. Die markierten Abschnitte umfassen Basen, die in den *CK19*ko-Zellen deletiert sind.

keine CK19-Proteinexpression zeigten (s. Abb. 10A). Nur eines der drei Plasmide war in der Lage, einen CK19-Verlust zu induzieren (pCMV-Cas9-RFP-92). Die Bestätigung des Knockouts auf molekularer Ebene erfolgte durch Sanger-Sequenzierung der CRISPR-Zielsequenzen (Sequenzen der einzelnen Klone s. Anhang). Im Vergleich der Sequenzen zeigten sich bei den *CK19*ko-Klonen Deletionen verschiedener Länge, die im Downstreambereich zu einer Generierung von Stopcodons und somit zum vorzeitigen Transkriptionsabbruch führen. Beim TFK-1 *CK19*ko Klon kam es durch CRISPR-Cas9 zur Deletion von zehn Basenpaaren und zum Stopcodon 196 bp nach Beginn der codierenden Sequenz (s. Abb. 10B). Die Deletion im SZ-1 *CK19*ko1 Klon umfasste ein Basenpaar und führte zum Translationsstop nach 244 bp, während beim SZ-1 *CK19*ko2 Klon acht Basenpaare fehlten und das Stopcodon nach 430 bp zustande kam (s. Abb. 10C).

3.2.2 Der Einfluss von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomzellen

Im Folgenden wurde der Einfluss des *CK*19-Knockouts auf die Malignität der Tumorzellen mithilfe verschiedener Untersuchungen analysiert. Unterschiedliche Eigenschaften der Zellen wurden betrachtet: Die Proliferation, die Migration, die Kolonienbildung im *Soft Agar*, die Bildung von Tumorsphären, die Expression hepatischer Stammzellmarker und das *in vivo* Wachstum nach subkutaner Transplantation in immunkompromittierte Mäuse.

3.2.2.1 Proliferation

Zur Beurteilung der Proliferation wurden Wachstumskurven generiert. Dazu wurden die Zellen nach je ein bis fünf Tagen Wachstum in der Neubauer-Kammer gezählt und über die Zeit aufgetragen. Wie Abbildung 11 zu entnehmen ist, hatte der *CK19*-Knockout keinen Einfluss

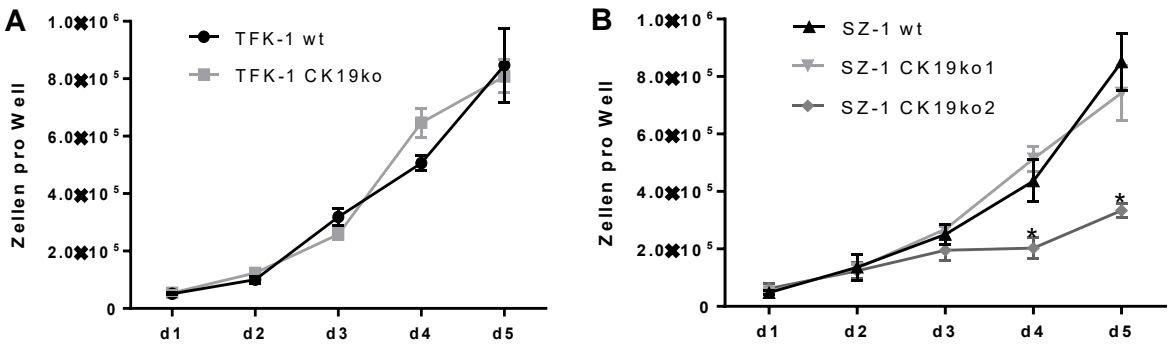

Abbildung 11: Einfluss des *CK19*-Knockouts auf die Proliferation von SZ-1 (A) und TFK-1 (B) Zellen

Anzahl der Zellen pro Well nach ein (d1) bis 5 (d5) Tagen Wachstum. An Tag 0 wurden je 50.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD. Der Vergleich wurde nach Mann-Whitney getestet. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. * = $p < 0{,}05$. n = 3.

auf die Proliferation der TFK-1 Zellen, ebenso wie eines SZ-1 CK19ko Klons (SZ-1 CK19ko1). Die SZ-1 CK19ko2 Zellen proliferierten nach vier und fünf Tagen signifikant langsamer als die SZ-1 Wildtyp Zellen.

3.2.2.2 Migration

Der Einfluss der CK19-Expression auf die Migration wurde mittels *Scratch Wound Assay* analysiert. In den konfluenten Zellrasen wurden mit einer Pipettenspitze Kratzer gemacht und deren Breite zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h ausgemessen. Es wurden zu allen drei Zeitpunkten je fünf Bilder von je drei Wells pro Zelllinie in zweifacher Vergrößerung gemacht. Jedes Bild wurde an 10 Stellen ausgemessen, der Mittelwert für jedes Foto gebildet und ins Verhältnis zur Kratzerbreite zum Zeitpunkt 0 h gesetzt. Bei den TFK-1 Zellen führte der *CK19*-Knockout zu signifikant schnellerer Migration, was sich in ca. 10 % dünneren Kratzern nach 24 und 48 Stunden im Vergleich zu den Wildtyp Zellen zeigte (s.Abb. 12).

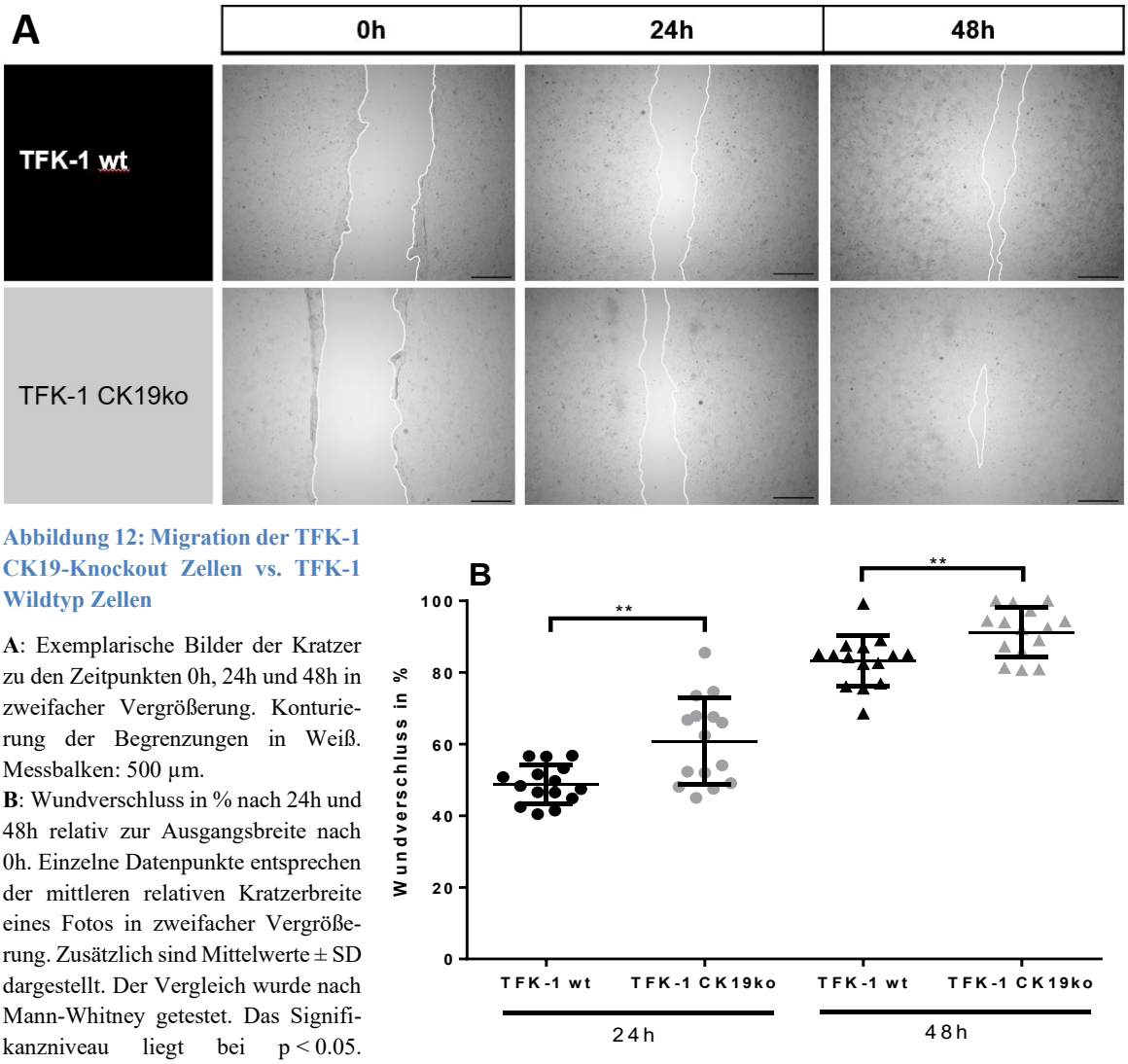

Abbildung 12: Migration der TFK-1 CK19-Knockout Zellen vs. TFK-1 Wildtyp Zellen

A: Exemplarische Bilder der Kratzer zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h in zweifacher Vergrößerung. Konturierung der Begrenzungen in Weiß. Messbalken: 500 µm.
B: Wundverschluss in % nach 24h und 48h relativ zur Ausgangsbreite nach 0h. Einzelne Datenpunkte entsprechen der mittleren relativen Kratzerbreite eines Fotos in zweifacher Vergrößerung. Zusätzlich sind Mittelwerte ± SD dargestellt. Der Vergleich wurde nach Mann-Whitney getestet. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. ** = $p < 0{,}01$. $n = 15$

Dagegen ist das Bild der SZ-1 Zellen uneinheitlich (s.Abb. 13). Ein *CK19*-Knockout-Klon (SZ-1 *CK19*ko1) zeigte nach 48 Stunden eine schnellere Migration, während der zweite *CK19*-Knockout-Klon (SZ-1 *CK19ko*2) verglichen mit den unbehandelten Zellen zu beiden Zeitpunkten signifikant langsamer migrierte.

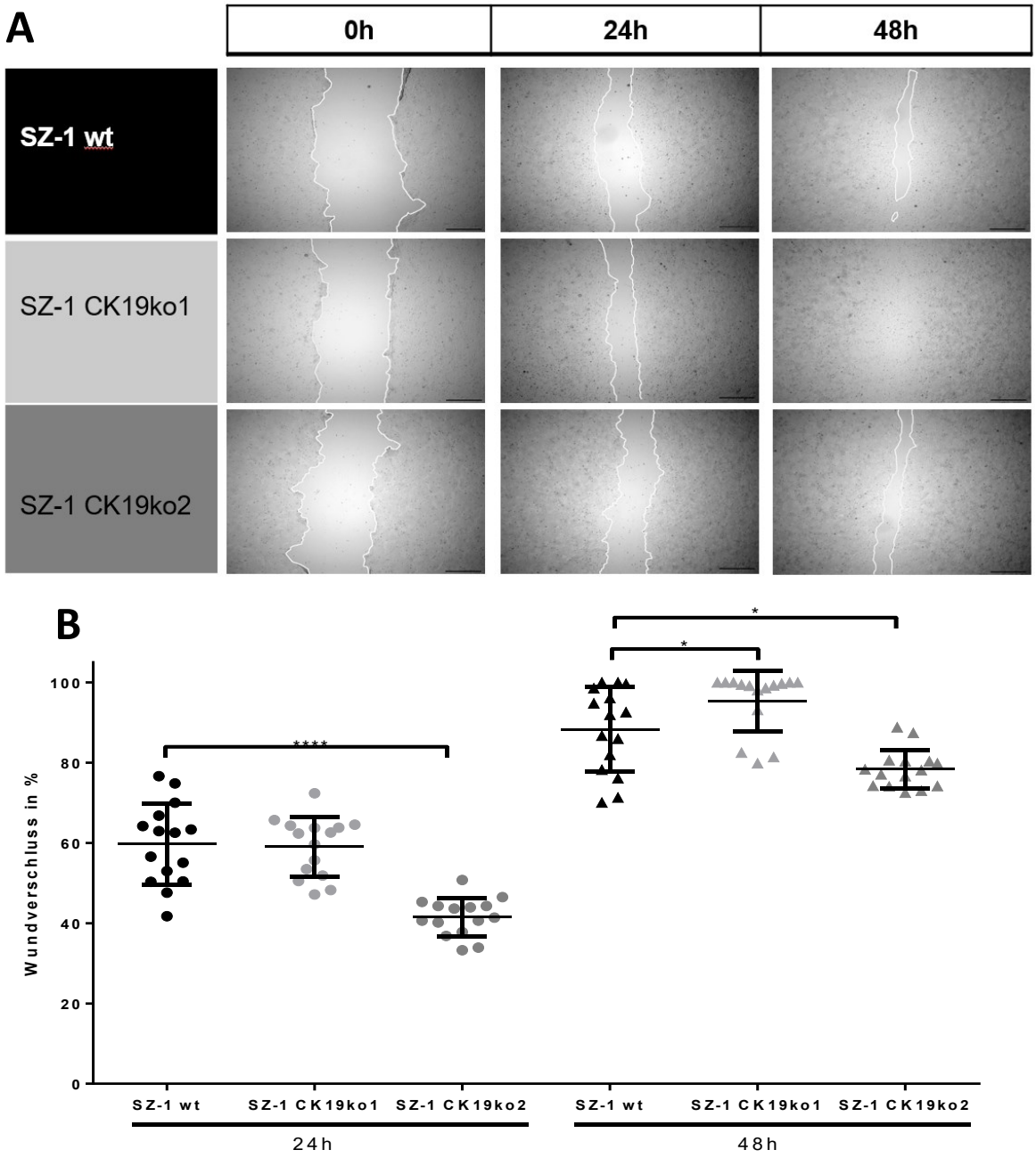

Abbildung 13: Migration der SZ-1 *CK19* Knockout Zellen vs. SZ-1 Wildtyp Zellen

A: Exemplarische Bilder der Kratzer zu den Zeitpunkten 0h, 24h und 48h in zweifacher Vergrößerung. Konturierung der Begrenzungen in Weiß. Messbalken: 500 µm.
B: Wundverschluss in % nach 24h und 48h relativ zur Ausgangsbreite nach 0h. Einzelne Datenpunkte entsprechen der mittleren relativen Kratzerbreite eines Fotos in zweifacher Vergrößerung. Zusätzlich sind Mittelwerte ± SD dargestellt. Der Vergleich wurde nach Mann-Whitney getestet. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. * = $p < 0,05$, **** = $p < 0,0001$. n = 15

3.2.2.3 Bildung von Kolonien im Soft Agar

Die Fähigkeit von Zellen, ohne Kontakt zu extrazellulärer Matrix zu wachsen wurde mit dem *Soft Agar Assay* evaluiert. Dabei verhindert eine Beschichtung mit einem Medium-Agar-Gemisch den Kontakt der Zellen zum Plattenboden. Die vereinzelten Zellen wurden in einem Agar-Zellkulturmedium-Gemisch auf der Agarschicht ausgesät und nach drei Wochen fotografiert. Die gebildeten Kolonien pro Sichtfeld wurden mit *ImageJ* gezählt und ausgemessen.

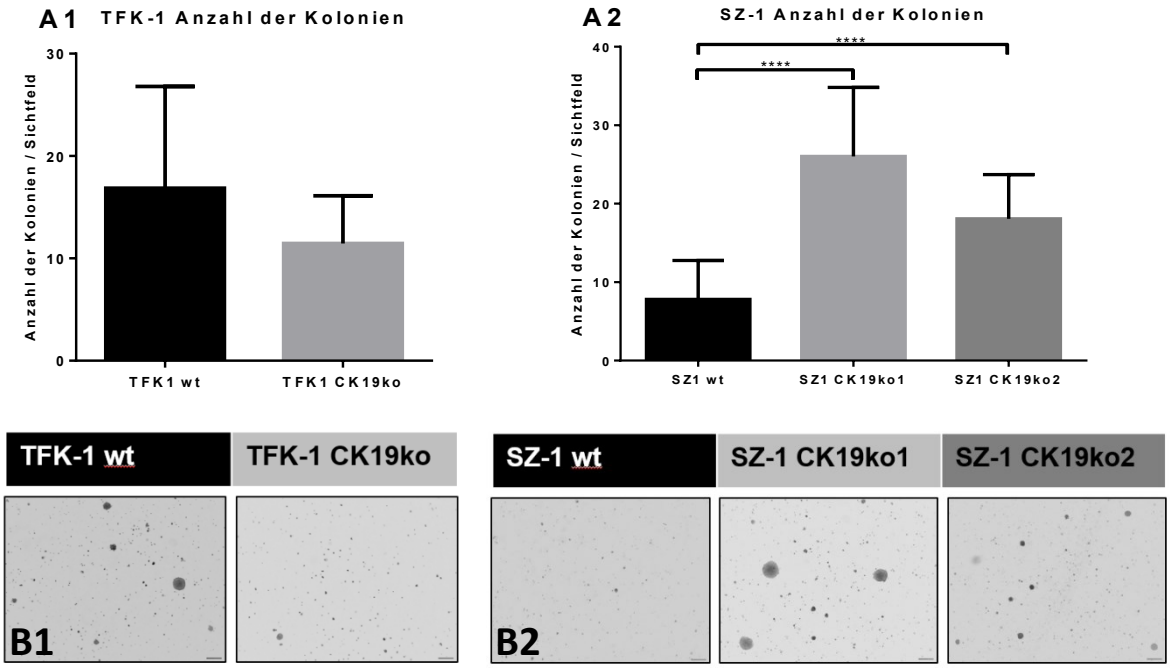

Abbildung 14: Einfluss des *CK19*-Knockouts auf die Kolonienbildung von TFK-1 und SZ-1 Zellen im Soft Agar

A1, A2: Anzahl der Kolonien pro Sichtfeld der TFK-1 (A1) und SZ-1 (A2) *CK19*ko vs. Wildtyp Zellen nach drei Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD. Der Vergleich wurde nach Mann-Whitney getestet. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. **** = $p < 0{,}0001$. n=20-30. **B1, B2:** Repräsentative Bilder der Kolonien nach drei Wochen Wachstum im Soft Agar in zweifacher Vergrößerung, Messbalken: 500 µm.

Die TFK-1 *CK19*ko Zellen bildeten weniger Kolonien im Vergleich mit den TFK-1 Wildtyp Zellen, wenn auch der Unterschied nicht signifikant ausfiel (s. Abb. 14A1). Bei den SZ-1 Zellen führte der *CK19*-Knockout dagegen zur Bildung von signifikant mehr Kolonien im *Soft Agar* (s. Abb. 14A2).

3.2.2.4 Bildung von 3D-Tumorsphären im *Sphere Formation Assay*

Die Fähigkeit der Zellen, in nicht-adhärenter und serumfreier Umgebung 3D-Tumorsphären zu bilden, wurde mit dem *Sphere Formation Assay* untersucht. Dafür wurden nach mehrfachem Waschen und Vereinzelung je 5.000 Zellen pro Well einer gering anhaftenden 24-

Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach drei Tagen Wachstum in serumfreiem und mit FGF-β und B-27 *Supplement* versetztem Medium wurden die Sphären gezählt und gemessen.

Auf die Anzahl der Tumorsphären pro Well hatte der *CK19*-Knockout weder bei den TFK-1 noch bei den SZ-1 Zellen einen signifikanten Einfluss (s. Abb 15A1, A2). Bezüglich der Größe der Tumorsphären fiel auf, dass die TFK-1 *CK19*ko Zellen größere Tumorsphären bildeten als TFK-1 Wildtyp Zellen. Während es bei den TFK-1 Wildtyp Zellen fast keine Sphären mit einem Durchmesser von über 200 µm gab, nahmen diese beim TFK-1 *CK19*ko Klon einen Anteil von über 6 % ein (s. Abb 15B1). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei den SZ-1 Zellen zeigte ein *CK19*-Knockout-Klon eine ähnliche Größenverteilung wie die Wildtyp Zellen, während der zweite ko-Klon (SZ-1 *CK19*ko2) deutlich kleinere Sphären bildete. Bei diesem Klon gab es fast keine Sphären mit einem Durchmesser von über 150 µm und 88 % der Sphären hatten eine Größe unter 100 µm im Vergleich mit ca. 60 % beim Wildtyp. Auch der Median des Durchmessers der Sphären war bei den SZ-1

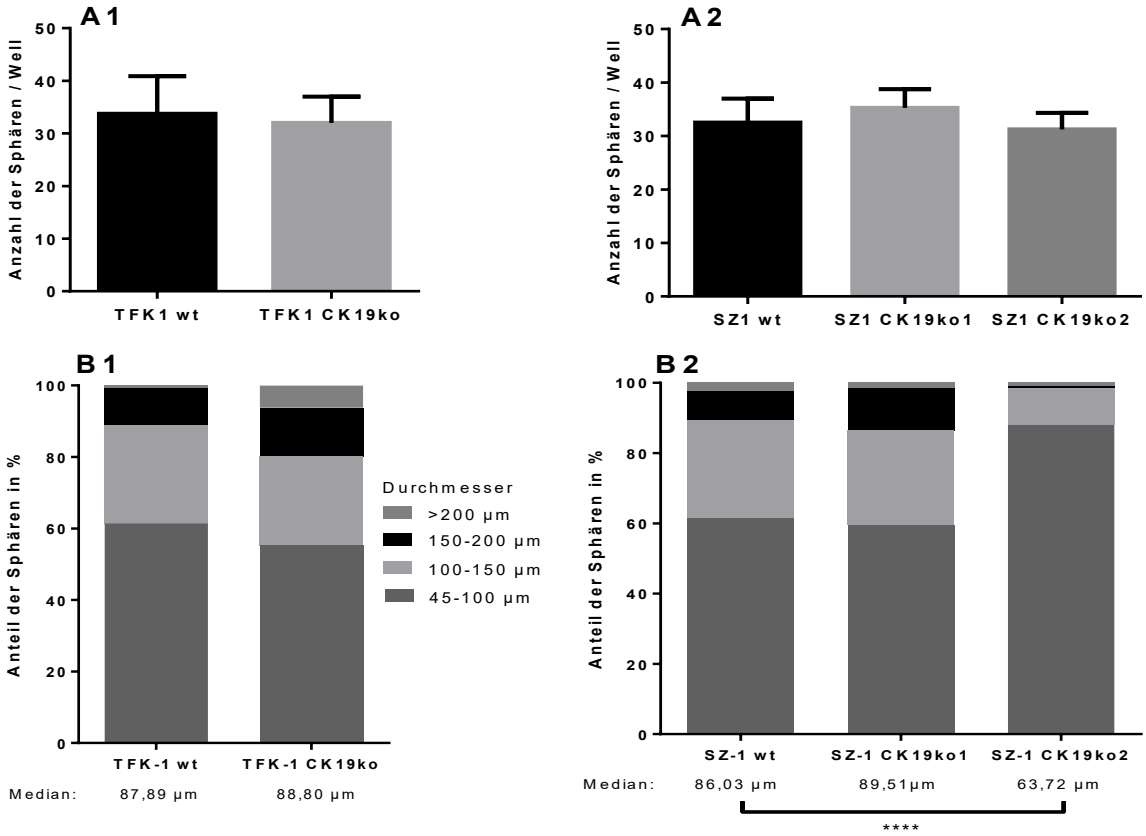

Abbildung 15: Einfluss des *CK19*-Knockouts auf die Bildung von Tumorsphären von TFK-1 und SZ-1 Zellen

A1, A2: Anzahl der Sphären/Well der TFK-1 (A1) und SZ-1 (A2) *CK19*ko vs. Wildtyp (wt) Zellen nach drei Tagen. Es wurden je 5.000 Zellen/Well ausgesät. Dargestellt sind Mittelwerte + SD. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. n = 3 - 4. **B1, B2:**. Anteil der Sphären verschiedener Größen in % der Gesamtmenge an Sphären der TFK-1 (B1) und SZ-1 (B2) *CK19*ko vs. Wildtyp (wt) Zellen. Ab einem Durchmesser von 45 µm wurden Sphären als solche berücksichtigt. Die Größeneinteilung nach Durchmesser ist B1 zu entnehmen. Zusätzlich ist der Median des Durchmessers der Sphären in µm angegeben. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. **** = $p < 0{,}0001$. n = 96 - 141

*CK19*ko2 Zellen signifikant niedriger als beim SZ-1 Wildtyp (s. Abb 15B2). In Abhängigkeit von der Zelllinie und dem Klon zeigten sich also unterschiedliche Auswirkungen des *CK19*-Knockouts auf die Bildung von Tumorsphären.

3.2.2.5 Expression von Progenitor-/Stammzellmarkern

Der Einfluss von CK19 auf die Expression der Progenitor-/Stammzellmarker *CD24*, *CD44*, *CD133* und *EpCAM* wurde mittels qPCR untersucht. Die in Triplikaten bestimmten mRNA-Expressionslevel von *CK19*, *CD24*, *CD44*, *CD133* und *EpCAM* wurden gemittelt und nach der ΔΔCt-Methode zum Referenzgen *GAPDH* und zum Wildtyp normalisiert.

Der *CK19*-Knockout durch CRISPR-Cas9 in den Zelllinien TFK-1 und SZ-1 konnte noch einmal auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen war in den Knockout-Zellen kaum *CK19*-mRNA nachweisbar. Bezüglich der Expression der Stammzellmarker fand sich in den TFK-1 Zellen kein Unterschied zwischen *CK19* Wildtyp und Knockout (s. Abb. 16A). Bei den SZ-1 Zellen waren für einige Marker geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen zu erkennen. Die relative *CD24*-Expression war im *CK19*ko2 Klon ca. doppelt so hoch wie im Wildtyp, während sich beim *CK19*ko1 Klon kaum ein Effekt zeigte (s. Abb. 16B). Die *CD44*-Expression war dagegen im *CK19*ko2 Klon geringer als im Wildtyp oder im *CK19*ko1 Klon. Für *CD133* sah man nur leichte, dafür aber unterschiedliche Effekt. In den *CK19*ko1 Zellen war die *CD133*-Expression herabreguliert, im *CK19*ko2 Klon dagegen leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Auf die *EpCAM*-Expression zeigte sich kein Effekt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *CK19*-Knockout in den TFK-1 Zellen keinen Einfluss auf die Expression von Stammzellmarkern hatte, während sich bei den SZ-1 Zellen eine geringe und unterschiedliche Expressionsänderung der Marker *CD24, CD44* und *CD133* abhängig vom Knockout-Klon zeigte.

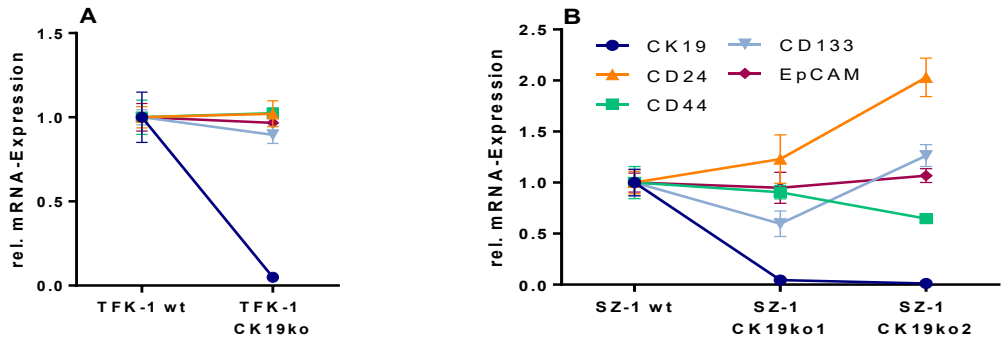

Abbildung 16: Einfluss von CK19 auf die Expression von hepatischen Progenitor-/Stammzellmarkern in TFK-1 (A) und SZ-1 Zellen (B)

Die mRNA-Expression wurde für jede Zellinie in Triplikaten bestimmt und nach der ΔΔCt-Methode zum Referenzgen *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) und zu den jeweiligen Wildtypzellen normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte der Triplikate ± SD. Farbkodierung siehe Legende.

3.2.2.6 Subkutane Transplantation in NOD-Scid-γ-Mäuse

Die Fähigkeit der CC-Zellen zur Tumorinitiierung *in vivo* wurde durch subkutane Transplantation in immunkompromittierte NSG-Mäuse (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) untersucht [94]. Der Versuchsablauf ist Abbildung 17 zu entnehmen. Vor der Transplantation wurden die Zellen mit Matrigel versetzt, das eine Verteilung der Zellen verhindern soll und diverse Extrazellulärmatrixproteine und Wachstumsfaktoren enthält. An je vier Stellen am Rücken der Mäuse wurden je 500.000 Tumorzellen subkutan injiziert. Die Tiere wurden regelmäßig auf Tumorbildung untersucht. Nach drei Wochen wurden die Tumore entnommen, gewogen und ausgemessen.

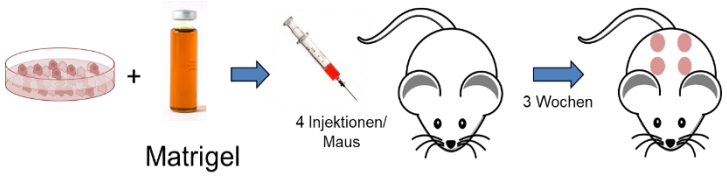

Abbildung 17: subkutane Transplantation von Tumorzellen

Zellen wurden geerntet, mit Matrigel versetzt und je 4x 500.000 Zellen in den Rücken von NSG-Mäusen injiziert. Nach drei Wochen wurden die Tiere analysiert und die Tumore entnommen.

Alle untersuchten Zelllinien, sowohl TFK-1 und SZ-1 Wildtyp als auch die jeweiligen *CK19*-Knockout-Klone, führten bereits nach einer Woche zur Bildung tastbarer Tumore. Im Vergleich der Größe und des Gewichts der Tumore nach drei Wochen zeigten sich unterschiedliche Einflüsse je nach Zelllinie. Während der *CK19*-deletierte Klon bei den TFK-1 Zellen kleinere und leichtere Tumore bildete (s. Abb. 18 A1, B1, C1), zeigten beide SZ-1 *CK19*ko-Klone ein stärkeres Tumorwachstum (s. Abb. 18 A2, B2, C2). Aufgrund der großen Varianz der Tumorgrößen waren die Unterschiede nicht signifikant. Makroskopisch wurden keine Tumormetastasen in Abdomen oder Thorax der Tiere festgestellt.

Repräsentativ wurden von einigen Tumoren Hämatoxylin-Eosin- und immunhistochemische Färbungen gegen CK19 angefertigt. Die H&E-Färbungen zeigten eine starke eosinophile Färbung der Extrazellulärmatrix. Die rundlichen Tumorzellen bildeten von Bindegewebe und Extrazellulärmatrix durchzogene Nester und Stränge, ein tubuläres Wachstumsmuster war nicht zu erkennen. Vor allem zentral waren nekrotische Bereiche mit pyknotischen oder fehlenden Zellkernen zu sehen. In der Immunhistochemie war bei den *CK19*-Knockout Klonen keine CK19-Proteinexpression nachweisbar. Die Wildtypzellen zeigten ein membranöses Färbungsmuster, wobei auch ungefärbte Zellverbände zu finden waren (s. Abb. 18 D1, D2). In den nekrotischen Bereichen der Wildtypzellen fiel eine diffuse und nukleäre Färbung auf.

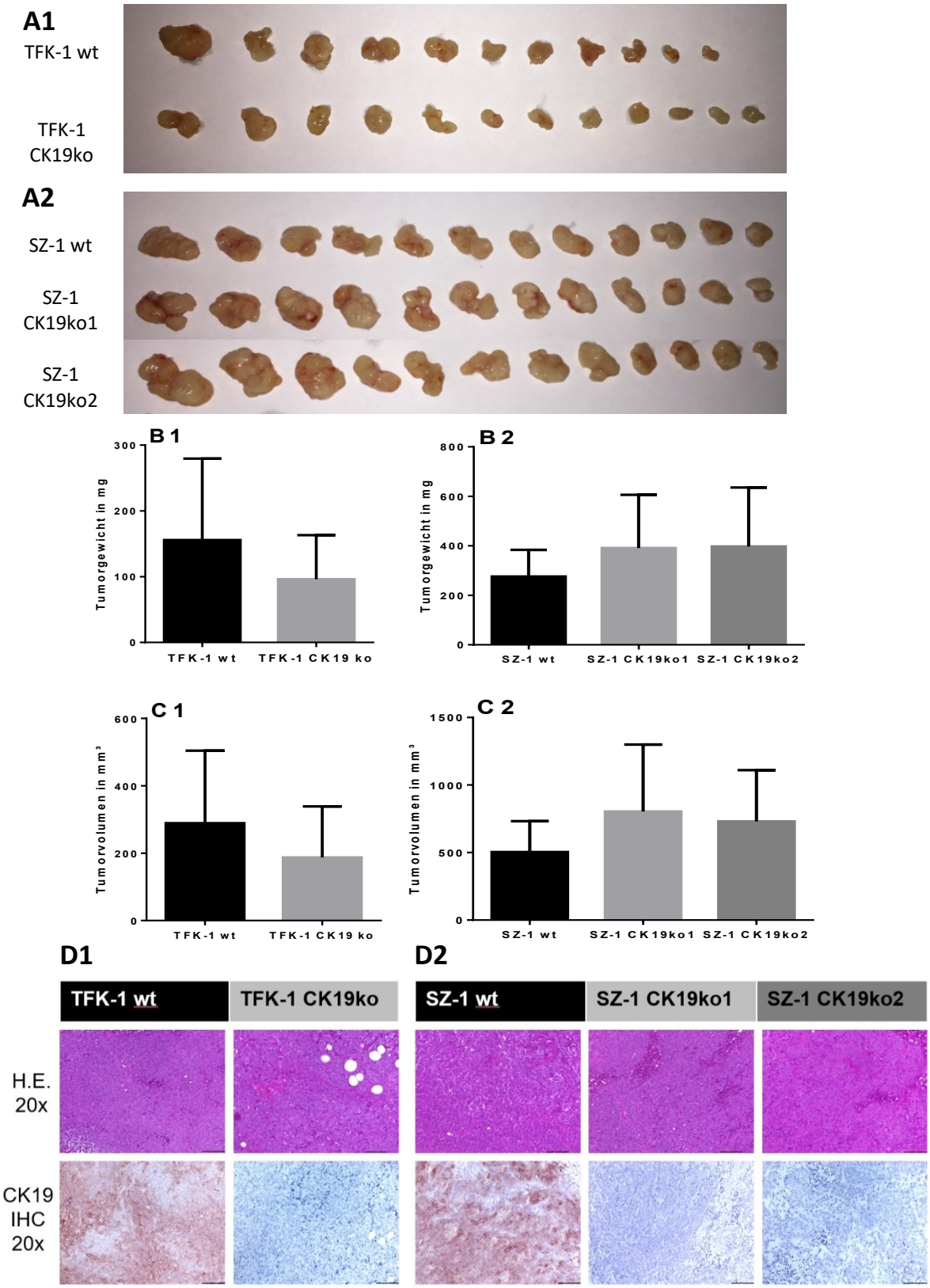

Abbildung 18: subkutane Transplantation von TFK-1 und SZ-1 *CK19*ko und Wildtyp Zellen in NOD-*scid*-γ-Mäuse

A1, A2: Makroskopischer Größenvergleich der Tumore der TFK-1 (A1) und SZ-1 (A2) *CK19*-Knockout (*CK19*ko) vs. Wildtyp (wt) Zellen nach drei Wochen Wachstum. Am Rücken von je drei Tieren pro Zelllinie wurden je 4 x 500.000 Zellen in Matrigel injiziert. **B1, B2:** Vergleich des Tumorgewichts in mg nach Zellklon. **C1, C2:** Vergleich des Tumorvolumens in mm^3 nach Zellklon. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0.05$. Dargestellt sind Mittelwerte + SD. n = 11 - 12. **D1, D2:** Exemplarische Bilder der Transplantationstumore in Hämatoxylin-Eosin-Färbung und CK19-Immunhistochemie in 20facher Vergrößerung. Messbalken: 100 µm

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die CK19-Expression wurde zunächst in Leberkarzinomgewebe aus transgenen Mauskohorten der Hepatokarzinogenese auf Basis von chronischer Entzündung und leberspezifischer *Trp53*-Deletion untersucht. Dabei stand die CK19-Expression in Abhängigkeit von der Tumorentität im Fokus. In HCCs konnte keine signifikante Erhöhung der CK19-Expression festgestellt werden. Die ICCs zeigten in der Immunhistochemie eine gering erhöhte CK19-Expression, während die Ergebnisse der qPCR nicht signifikant waren. Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene konnte eine erhöhte CK19-Expression in gemischt-differenzierten Tumoren aus Mäusen mit leberspezifischem *Trp53*-Verlust festgestellt werden. Die *CK19*-mRNA-Expression korrelierte dabei mit der Expression der hepatischen Progenitor-/Stammzellmarker *Cd24* und *Cd133*.

Zur Untersuchung des Einflusses von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomen wurde mittels CRISPR-Cas9 ein stabiler *CK19*-Knockout in zwei Cholangiokarzinomzelllinien induziert und die *CK19*-Knockout-Klone mit den Wildtypzellen in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchen verglichen. Hierbei ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse je nach Assay und Zelllinie. Bei den TFK-1 Zellen migrierten *CK19*-Knockout-Zellen schneller und bildeten anteilig mehr größere Tumorsphären. Im *Soft Agar Assay* und im Xenotransplantationsversuch formten die TFK-1 *CK19*ko Zellen dagegen tendenziell weniger Kolonien und kleinere Tumore als TFK-1 Wildtyp Zellen. Im Gegensatz zu den TFK-1 Zellen konnte man bei den SZ-1 *CK19*-Knockout Zellen bei den beiden letztgenannten Versuchen die Bildung von mehr Kolonien und größeren Tumoren beobachten. Bezüglich Proliferation, Migration und Sphärenbildung verhielten sich die beiden SZ-1 *CK19*-Knockout Klone unterschiedlich. Während ein Klon sich in den drei Eigenschaften kaum vom Wildtyp unterschied, zeigte der zweite Klon (SZ-1 *CK19*ko2) eine langsamere Proliferation und Migration und kleinere Tumorsphären als die SZ-1 Wildtyp Zellen.

4.2 Untersuchung der CK19-Expression in Lebertumorgewebe transgener Mauskohorten

4.2.1 Transgene Mauskohorten der Hepatokarzinogenese auf Basis von leberspezifischer Entzündung und *Trp53*-Verlust

Zur Untersuchung der CK19-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten wurde Tumorgewebe verschiedener publizierter transgener Mauskohorten untersucht [39,101]. Die

transgenen Mausmodelle basieren auf einer leberspezifischen Entzündungsreaktion durch eine IKK2-vermittelte NF-κB-Aktivierung und einer leberspezifischen *Trp53*-Deletion. Eine NF-κB-Überexpression wurde bei den meisten chronischen Lebererkrankungen beobachtet, die zu Leberkarzinomen führen, darunter die alkoholische und nicht-alkoholische Steatohepatitis, virale Hepatitiden und die primär biliäre Zirrhose [80,101]. *TP53*-Mutationen sind sowohl in HCCs als auch in ICCs häufige Mutationen und mit einer schlechten Prognose assoziiert [45,113]. *TP53*-Mutationen zeigen eine Häufung bei bestimmten Risikofaktoren, wie Hepatitis B, Aflatoxin B1 und Parasitenbefall [45,112]. NF-κB-Aktivierung und p53-Dysfunktion sind somit zwei charakteristische Merkmale der Hepatokarzinogenese und insbesondere die Kombination beider Mechanismen im Mausmodell bietet ein realitätsnahes Modell zur Untersuchung der Tumorentstehung in der Leber.

Da die verschiedenen Mauskohorten unterschiedliche Tumorentitäten bildeten (s. 1.2.5), war es nicht möglich, HCCs, ICCs und HCC-CCs aus derselben Kohorte zu untersuchen. So wurden aus der CAIKK2 p53 -/- 4 Wo. Kohorte nur HCCs und ICCs untersucht, während die HCC-CCs der p53 -/- embryonal Kohorte entnommen wurden. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss also nicht nur die Tumorentität, sondern auch der Genotyp der Mäuse beachtet werden.

4.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung der CK19-Expression wurden HCCs und ICCs aus Mäusen mit chronischer Leberentzündung und später *Trp53*-Deletion, sowie gemischt differenzierte Tumore (HCC-CC) aus Mäusen mit embryonalem Trp53-Verlust beurteilt. Die Quantifizierung der CK19-Immunhistochemie erfolgte nach gängiger Praxis unter Annahme einer Positivität bei moderater bis starker Färbung von mindestens 5 % der Tumorzellen [18,42,48,56,98,106]. Diese Art der Auswertung hat den Vorteil, dass sowohl Intensität als auch Anzahl der positiven Zellen berücksichtigt werden können. Limitierend ist jedoch die Subjektivität im Vergleich zur Auswertung mithilfe eines Bildverarbeitungsprogramms. Zu beachten ist auch die geringe n-Zahl von 5 – 6.

Während in ICCs und HCC-CCs jeweils 33 % bzw. 60 % der Tumore eine erhöhte CK19-Proteinexpression zeigten, waren alle HCCs CK19-negativ. Das deckt sich mit Ergebnissen vieler Studien, in denen der Großteil der HCCs kein CK19 exprimierte [18,29,40,90,121]. In Untersuchungen humaner HCCs waren 8 – 35 % der Tumore CK19-positiv und mit schlechtem Gesamtüberleben nach Resektion, invasivem Wachstum, Metastasierung und

Rezidiven verbunden [18,29,40,46,55,90,123]. Die fehlende CK19-Expression spricht somit für einen wenig aggressiven Phänotyp der hier untersuchten HCCs.

4.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zum Vergleich der Expression von CK19 und weitere hepatischer Tumorstammzellmarker auf mRNA-Ebene wurde Lebertumorgewebe unterschiedlicher Entitäten und transgener Mauskohorten mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) untersucht. Verglichen wurden HCCs aus Mäusen mit leberspezifischer Entzündungsantwort (CAIKK2), HCCs und ICCs aus Mäusen mit Leberentzündung und später leberspezifischer *Trp53*-Deletion (CAIKK2 p53-/- mit 4 Wo.), ICCs aus Mäusen mit Leberentzündung und früher *Trp53*-Deletion (CAIKK2 p53-/- embryonal) sowie HCC-CCs aus Mäusen mit früh deletiertem *Trp53* ohne Leberentzündung (p53-/- embryonal). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde als Kontrolle ausschließlich Lebergewebe der p53+/+ Kontrollmäuse verwendet. Wie bei der immunhistochemischen Untersuchung der Proben konnten auch hier nicht alle Tumorentitäten aus allen Mauskohorten untersucht werden. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen also Entität und Mauskohorte gleichermaßen berücksichtigt werden. Die Untersuchung aller Tumorentitäten aus allen Mauskohorten und eine Normalisierung zu Lebergewebe aus der jeweiligen Kohorte würde differenziertere Ergebnisse liefern. Dies war jedoch nicht möglich, da in den verschiedenen Kohorten unterschiedliche Tumorspektren auftraten. Ein weiterer limitierender Faktor ist die geringe n-Zahl von fünf Tumoren pro Gruppe. Unter Berücksichtigung dieser Limitationen kann mit diesem Versuch dennoch eine Aussage zur CK19-Expression in verschiedenen Tumorentitäten vor dem Hintergrund chronischer Leberentzündung und leberspezifischem Trp53-Verlust, sowie zum Zusammenhang mit der Expression weiterer Tumorstammzellmarker getroffen werden.

Im Vergleich der Ergebnisse von Immunhistochemie und qPCR, fallen Unterschiede in der *Ck19*-Expression bei den Tumoren der CAIKK2 p53 -/- 4 Wochen Kohorte auf. In der qPCR konnte weder in HCCs noch in ICCs dieser Kohorte eine signifikant erhöhte *Ck19*-Expression festgestellt werden. Die mRNA-Expressionslevel beider Entitäten waren auf einem ähnlich niedrigen Level. Im Gegensatz dazu waren in der Immunhistochemie keine HCCs, aber 33 % der ICCs derselben Kohorte CK19-positiv, obwohl dieselben Tumore in qPCR und IHC untersucht wurden. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte in der Art der Auswertung liegen. Während bei der qPCR die Expression quantitativ bestimmt wurde, wurde bei der IHC eine deutlich subjektivere semiquantitative Auswertung gewählt. Zudem ist

bekannt, dass die mRNA-Konzentration von Genen nur bedingt mit der Proteinkonzentration korreliert [63]. Dafür werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht. IRES (interne ribosomale Eintrittsstellen) oder regulatorische Elemente, an die Proteine oder *non-coding* RNA binden können, regulieren beispielsweise die Translation [63]. Auch die relative Verfügbarkeit von Ribosomen in der Zelle oder Veränderungen der Protein-Halbwertszeit und des Proteintransports aus der Zelle können zu unterschiedlichen Konzentrationen von mRNA und Protein führen [63].

4.2.4 Geringe CK19-Expression in ICCs als Ausdruck einer hepatozytären Abstammung oder Tumordedifferenzierung

Auffällig war, dass nur 33 % der ICCs eine CK19-Färbung zeigten. Auch auf mRNA-Ebene war nur eine geringe und nicht signifikante Erhöhung der *Ck19*-Expression in den ICCs im Vergleich zu Lebergewebe aus Wildtyp-Kontrollmäusen zu erkennen. Dies steht im Kontrast zur weit verbreiteten Verwendung von CK19 als relativ spezifischem und sensitivem Marker für ICCs [35]. In verschiedenen Studien wurde in 70 – 100 % der humanen ICCs eine immunhistochemische Positivität für CK19 festgestellt [15,86,93,126]. Lediglich in einer Studie mit relativ kleiner Stichprobe exprimierten nur 44 % der ICCs CK19, wobei eine Positivität erst ab einer Färbung von 10 % der Tumorzellen angenommen wurde [53].

Eine mögliche Erklärung für die geringe CK19-Expression ist die Entstehung der CK19-negativen ICCs aus Hepatozyten, die im Allgemeinen kein CK19 exprimieren [35,59]. Lange Zeit wurde ausschließlich eine cholangiozytäre Abstammung von ICCs aufgrund der drüsenartigen Morphologie der Karzinome und der Expression biliärer Marker angenommen. Mittels *lineage-tracing* wurde im Mausmodell die Entwicklung von ICCs aus Cholangiozyten belegt [30]. Neuere Studien konnten eine Entstehung von ICCs durch Transdifferenzierung von Hepatozyten nachweisen [91]. Hill et al. beobachteten die Entstehung von ICCs durch *Kras*- und *Trp53*-Mutationen sowohl aus Cholangiozyten als auch aus Hepatozyten [32]. Die ähnliche klinische Präsentation und gemeinsamen Risikofaktoren von HCCs und *small duct* ICCs lassen auch beim Menschen einen gemeinsamen Krankheitsprozess und möglicherweise sogar eine gemeinsame Urspungszelle vermuten [2,129]. Der aktuelle Konsens geht deshalb von multiplen Ursprungszellen für ICCs aus, darunter Cholangiozyten, Hepatozyten und hepatische Progenitorzellen [32,111,112]. Die geringe CK19-Expression in den hier untersuchten ICCs könnte auf einen unterschiedlichen zellulären Ursprung abhängig vom CK19-Status hindeuten: CK19-positive ICCs aus Cholangiozyten oder

hepatischen Progenitorzellen, CK19-negative ICCs aus Hepatozyten. Insbesondere vor dem Hintergrund der *Trp53*-Deletion erscheint diese These wahrscheinlich. Hill et al. konnten zeigen, dass TP53 die Reprogrammierung von Hepatozyten zu Cholangiozyten hemmt [32]. Im Umkehrschluss könnte die *Trp53*-Deletion im hier verwendeten Mausmodell die Reprogrammierung von Hepatozyten zu Cholangiozyten erleichtern. Das Zusammenspiel von *Trp53*-Deletion und NF-κB-Aktivierung kann die konsekutive Entstehung von CK19-negativen ICCs aus Hepatozyten erklären. NF-κB fördert über anti-apoptotische Signale und eine inflammatorische Mikroumgebung eher die Tumorpromotion und weniger die Tumorinitiation [80]. Zur Verifizierung dieser Hypothese wären Abstammungsuntersuchungen der Tumore mittels *lineage tracing* in den untersuchten Mausmodellen notwendig.

Eine andere Erklärung für die geringe CK19-Expression der ICCs wäre ein Verlust der CK19-Expression im Rahmen der Dedifferenzierung von ICCs. Die Entstehung von ICCs aus Cholangiozyten wird aufgrund morphologischer und immunhistochemischer Eigenschaften angenommen und wurde mittels *lineage-tracing* nachgewiesen [30]. Obwohl die Mehrheit der ICCs CK19 exprimiert, sind je nach Untersuchung bis zu 23 % der Tumore CK19-negativ [15,86,93,126]. Es ist allgemein bekannt, dass Karzinome nicht zwangsweise die molekulare Signatur und Markerexpression ihrer Ursprungszelle beibehalten [48,121]. Durch Akkumulation von Mutationen und Interaktion mit der Tumorumgebung können sich Expressionsmuster im Laufe der Karzinogenese ändern und den Verlust der CK19-Expression erklären [45,48]. Einen Hinweis hierfür liefern Shimonishi et al., die in gut differenzierten ICCs eine höhere CK19-Expression beobachteten als in schlechter differenzierten ICCs [93]. Welchen Einfluss CK19 auf die Malignität und Differenzierung von Cholangiokarzinomzellen hat, wurde im zweiten Teil der Arbeit an Zelllinien untersucht.

4.2.5 Erhöhte CK19-Expression in gemischt differenzierten Tumoren transgener Mäuse mit leberspezifisch deletiertem *Trp53*

Sowohl in der immunhistochemischen Färbung als auch in der qPCR fiel eine erhöhte CK19-Expression in den gemischt differenzierten Tumoren (HCC-CCs) aus Mäusen mit embryonaler leberspezifischer *Trp53*-Deletion auf. Immunhistochemisch zeigten 60 % der untersuchten Tumore eine moderate Färbung von mindestens 5 % der Tumorzellen, wobei nur die biliär differenzierten Tumoranteile CK19-positiv waren. In der qPCR sah man eine signifikant erhöhte CK19-mRNA-Expression in gemischt differenzierten Tumoren im Vergleich zu Lebergewebe aus p53+/+ Cre-Kontrollmäusen. Das hier untersuchte Mausmodell

der leberspezifischen *Trp53*-Deletion wurde bereits publiziert und führt zur Entstehung von gemischt-differenzierten Tumoren, die sowohl den Hepatozytenmarker Albumin als auch CK19 und den Progenitorzellmarker A6 exprimierten [39].

Unsere Ergebnisse sind weitgehend im Einklang mit Studien an chinesischen Patienten, bei denen 80 – 91 % der HCC-CCs immunhistochemisch positiv für CK19 waren. Da HCC-CCs selten auftreten, sind die untersuchten Patientenkohorten eher klein (n=15-34) [110,126-128]. Lediglich eine französische Studie erreichte eine Stichprobengröße von 48, von denen alle Tumore CK19-positiv waren [13]. Hier waren jedoch keine näheren Informationen zur Auswertung der Färbung in Erfahrung zu bringen. Die Vergleichbarkeit der Studien ist durch unterschiedliche Cut-Offs der CK19-Färbung und teils uneinheitliche Definitionen der gemischt-differenzierten Tumore zusätzlich erschwert.

Auffallend waren die große Standardabweichung und Streuung der *CK19*-mRNA-Expression in den HCC-CCs. Eine mögliche Erklärung ist die Verteilung der CK19-Expression in gemischt differenzierten Tumoren. Üblicherweise exprimieren die CC-Anteile und die Zellen der Übergangszone CK19, während die HCC-Anteile CK19-negativ sind [8,35,97]. Da das Verhältnis der jeweiligen Komponenten variieren kann, wäre es denkbar, dass Tumore mit hohem HCC-Anteil eine geringere *CK19*-Expression in der qPCR zeigen, obwohl die CK19-Expression im ICC-Anteil ähnlich hoch ist wie in den restlichen Tumoren. Das würde auch erklären, warum immunhistochemisch 40 % der HCC-CCs als CK19-negativ eingestuft wurden. In der IHC kommt limitierend hinzu, dass der getroffene Tumoranschnitt die beiden Anteile (HCC und ICC) nicht immer repräsentativ für den gesamten Tumor darstellen kann, wodurch die Ergebnisse verfälscht sein würden.

4.2.5.1 Erhöhte CK19-Expression in HCC-CCs als Ausdruck einer möglichen Abstammung von hepatischen Progenitorzellen

Bei der Interpretation der CK19-Expression in HCC-CCs stellt sich die Frage, ob CK19 lediglich ein Ausdruck biliärer Differenzierung des ICC-Teils ist oder ob es sich dabei um einen Stamm-/Progenitorzell-Phänotyp der Tumore handeln könnte. In gesundem Lebergewebe wird CK19 in Cholangiozyten und in hepatischen Progenitorzellen exprimiert, die sowohl zu Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten differenzieren können [59]. In HCCs ist die Expression von CK19 mit schlechter Differenzierung, postoperativen Rezidiven und Metastasierung assoziiert [55,106,115,123]. Viele Autoren bezeichnen CK19 daher als hepatischen Progenitorzellmarker, der HCCs einen Stammzellphänotyp verleihe [29,40,46].

Aufgrund der schlechten Prognose von HCC-CCs mit Tendenz zu Rezidiven und Metastasen und der bilinealen Differenzierung der Tumore, wird von vielen Forschern die Entstehung aus hepatischen Progenitorzellen als wahrscheinlich angesehen [13,128]. Für die Entstehung von HCC-CCs aus Progenitorzellen spricht auch, dass in neueren Studien die Klonalität beider Tumoranteile nachgewiesen wurde. Wang et al. untersuchten HCC- und ICC-Anteile von gemischt differenzierten Tumoren mittels *Whole Exome Sequencing* und fanden zwar eine gewisse Heterogenität, aber auch eine beträchtliche Anzahl überlappender Mutationen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen gemeinsamen zellulären Ursprung zurückzuführen sei [110]. Zhao et al. beobachteten in beiden Tumoranteilen wenig Unterschied bezüglich des Verlusts der Heterozygotie, sowie eine simultane Expression von Hepatozyten- und Cholangiozytenmarkern in beiden Tumoranteilen in der Mehrzahl der Tumore [128]. Die Expression von hepatischen Tumorstammzellmarkern in HCC-CCs wurde in vielen Studien beobachtet und unterstützt einen Progenitorzellursprung [8,13]. Tschaharganeh et al. liefern ein Modell, das die Entstehung der CK19-positiven HCC-CCs im hier untersuchten Mausmodell der leberspezifischen *Trp53*-Deletion erklären würde. *In vitro* und in Mausversuchen führte der *Trp53*-Verlust zur Dedifferenzierung von Hepatozyten zu Progenitor-ähnlichen Zellen, die durch weitere Mutationen maligne entarteten [104]. In Ergebnissen der AG Lechel führte der leberspezifische *Trp53*-Verlust altersabhängig zur Bildung von mehr Kolonien gemischter Differenzierung aus isolierten hepatischen Progenitorzellen [39]. Zudem sind *TP53*-Mutationen in humanen HCCs nicht nur mit einem schlechteren Überleben, sondern auch mit einer stammzellähnlichen Genexpression assoziiert [113]. Es ist auch bekannt, dass p53 neben seinen Funktionen in der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptose, die Differenzierung embryonischer Stammzellen induziert und deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung hemmt [39,45,61]. Eine ähnliche Wirkung von p53 auf die Differenzierung von hepatischen Progenitorzellen wäre denkbar und würde die Entstehung der CK19-positiven gemischt differenzierten Tumore aus HPCs in Mäusen mit leberspezifischem *Trp53*-Verlust erklären.

4.2.5.2 Erhöhte CK19-Expression in HCC-CCs als Ausdruck der zellulären Plastizität von Hepatozyten

Die Tatsache, dass nicht alle gemischt differenzierten Tumore CK19 exprimierten und dass die Expression nur in den biliär differenzierten Anteilen beobachtet wurde, spricht jedoch gegen einen HPC-Ursprung der hier untersuchten Tumore. Eine Entstehung des CK19-

positiven biliär differenzierten Tumoranteils durch Dedifferenzierung von entarteten Hepatozyten wäre eine wahrscheinlichere Erklärung. Einen Hinweis auf die Entwicklung von HCC-CCs aus HCCs liefert eine Studie von Zen et al.. Sie beobachteten, dass HCCs nach TACE (transarterielle Chemoembolisation) vermehrt Anteile gemischter Differenzierung und eine erhöhte Expression von Progenitorzellmarkern zeigten, darunter CK19 [124]. Im hier untersuchten Mausmodell fehlt zwar ein externer chemischer Reiz, mit NF-κB ist jedoch ein wichtiger proinflammatorischer Signalweg aktiv, der zu chronischer Inflammation und Leberfibrose führt [101]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das molekulargenetische Profil von HCC-CCs dem von HCCs sogar in den biliär differenzierten Anteilen ähnelt [38]. Eine Transdifferenzierung maligne entarteter Hepatozyten zu Cholangiozyten könnte auch durch den *Trp53*-Verlust bedingt sein. Dass eine Reprogrammierung von Hepatozyten zu Cholangiozyten durch *Trp53*-Verlust möglich ist, wurde bereits nachgewiesen [32]. In einer früheren Publikation der AG Lechel wurden aus dem hier untersuchten Mausmodell einzelne *Trp53* -/- Hepatozyten gewonnen und in primärer Zellkultur die Bildung von gemischt differenzierten Kolonien und eine erhöhte Proliferation beobachtet [39].

Die enorme Regenerationsfähigkeit der Leber nach Resektion oder Transplantation wird vor allem durch die Selbstreplikation von Hepatozyten gewährleistet, aber auch hepatische Progenitorzellen und sogar Cholangiozyten tragen bei starker Leberschädigung über die Konversion zu Hepatozyten zur Regeneration von Lebergewebe bei [16,17,73,84]. Diese Plastizität der hepatischen Zelllinien findet sich auch bei der Entstehung primärer Leberkarzinome wieder. So können ICCs aus Cholangiozyten, Hepatozyten und HPCs entstehen [30,32,91,104]. Für HCCs wurde die Entwicklung aus Hepatozyten und HPCs nachgewiesen [73,104]. Die begrenzte Studienlage zu gemischt differenzierten Tumoren weist auf einen HPC- oder Hepatozytenursprung hin [38,39,124]. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass die Differenzierung von entarteten Leberzellen während der Hepatokarzinogenese von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, wie dem Mutationsprofil oder der Mikroumgebung. So kann es zur Entstehung unterschiedlicher Tumorentitäten aus derselben Zellart kommen, was wiederum bedeutet, dass eine Tumorentität aus verschiedenen Ursprungszellen entstehen kann. Obwohl die stark erhöhte CK19 Expression in der qPCR einen Stammzellphänotyp der gemischt differenzierten Tumore vermuten lässt, kann die CK19 Expression hier eher auf die Transdifferenzierung entarteter Hepatozyten in Richtung eines biliären Phänotyps zurückgeführt werden. Besonders die Tatsache, dass nur glanduläre Anteile CK19-positiv waren und nicht alle untersuchten Tumore eine Expression zeigten, unterstützt diese

Annahme. Ein Progenitor- oder Stammzellursprung kann jedoch insbesondere vor dem Hintergrund der *Trp53*-Deletion nicht ausgeschlossen werden. Hierfür wären weitere Untersuchungen notwendig, die HCC- und ICC-Anteile der gemischt differenzierten Tumore bezüglich des molekulargenetischen Profils oder der Expression von Stamm-/Progenitorzellmarkern vergleichen.

4.2.6 Zusammenhang der CK19-Expression mit hepatischen Progenitor-/ Stammzellmarkern

Mittels qPCR wurde die Expression von *Cd24*, *Cd44*, *Cd90*, *Cd133*, *Epcam*, *Sox9* und Osteopontin bestimmt, die in der Literatur als Marker hepatischer Tumorstammzellen beschrieben wurden [10,41,64,68,69,81]. Dabei zeigten *Cd24*, *Cd133*, *Cd90* und *Epcam* ähnlich wie *Ck19* eine signifikant höhere Expression in HCC-CCs aus Mäusen mit leberspezifischem *Trp53*-Verlust im Vergleich zu Lebergewebe gesunder Mäuse. Viele Marker (*Cd44*, *Epcam*, Osteopontin, *Sox9*) waren jedoch in Tumoren, die auf Basis einer induzierten Entzündungsantwort in der Leber auftraten, stärker exprimiert als in den HCC-CCs der Kohorte mit *Trp53*-Deletion alleine und verhielten sich dahingehend invers zu CK19. Um diesen Zusammenhang genauer zu beschreiben, wurden Korrelationsanalysen der CK19-Expression mit der Expression der Marker durchgeführt. Es bestätigte sich eine signifikante starke Korrelation der *Ck19*-Expression mit der Expression von *Cd24* und *Cd133*.

Die relative mRNA-Expression der Marker im Vergleich zu Lebergewebe aus Kontrollmäusen erlaubt eine Interpretation der qPCR-Ergebnisse unter Berücksichtigung der Tumorentität und der Mauskohorte. Ein Zusammenhang mit der *Ck19*-Expression lässt sich nur grob beschreiben. Der Vergleich der Expressionen mittels Spearman-Korrelation kann einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von *Ck19* und anderen Markern objektivieren. Außerdem werden die mRNA-Expressionslevel einzelner Tumorproben miteinander in Zusammenhang gebracht, sodass die Heterogenität der Tumore innerhalb der Gruppen besser berücksichtigt werden kann. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen die Expressionslevel nach Gruppen und die Korrelationsanalysen gleichermaßen berücksichtigt werden.

4.2.6.1 Korrelation von CK19 und den Tumorstammzellmarkern CD133 und CD24

CD133, auch Prominin-1 genannt, ist ein 5-Transmembranprotein, das in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird und in verschiedenen soliden Karzinomen als Marker für

Tumorstammzellen fungiert, darunter in Kolonkarzinomen und Hirntumoren [70,76,96]. Auch in HCCs wurde eine Subpopulation von CD133-positiven Zellen identifiziert, die Eigenschaften von Tumorstammzellen aufweisen [52,66]. Eine erhöhte CD133-Expression ist in HCCs mit schlechtem Gesamtüberleben, Rezidiven, schlechter Differenzierung und Invasivität assoziiert [52,68]. In gesundem Lebergewebe wird CD133 ähnlich wie CK19 von Cholangiozyten und hepatischen Progenitorzellen exprimiert [100,122,124]. Eine Korrelation von CD133 und CK19 wurde in humanen HCCs bereits beschrieben [29,46]. Zudem führte ein *CK19*-knockdown in einer HCC-Zelllinie zur Reduktion der *CD133*-Expression [29]. In gemischt differenzierten Karzinomen beobachteten Coulouarn et al. eine erhöhte Expression von *CK19*, *EpCAM* und *CD133* [13]. Während in unseren Untersuchungen an murinem Tumorgewebe verschiedener Entitäten nur ein schwacher Zusammenhang zwischen CK19 und EpCAM hergestellt werden konnte (r = 0,43), war die Korrelation zwischen CK19 und CD133 deutlicher (r = 0,54).

Eine stärkere Korrelation der Expressionslevel ergab sich mit *Cd24* (r = 0,63). CD24 ist ein GPI-verankertes Glykoprotein und ist auf der Oberfläche hämatopoetischer Zellen und neuraler Progenitor-/Stammzellen zu finden [9,20]. In verschiedenen Tumoren wird CD24 exprimiert und ist häufig mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet, wie in Ovarial-, Mamma- und Pankreaskarzinomen [49]. In der Leber wird CD24 von hepatischen Progenitorzellen exprimiert und ist in HCCs mit einer schlechten Differenzierung, Chemoresistenz gegenüber Sorafenib, schneller Proliferation, Metastasierung und schlechtem Gesamtüberleben nach Resektion assoziiert [34,65,81,116]. Lee et al. identifizierten CD24 als Marker tumorinitiierender Zellen der Leber und schreiben CD24 eine wichtige Rolle für die Selbsterneuerung, Differenzierung und Metastasierung von HCCs zu [54]. Eine Assoziation von CD24 und CK19 wurde in Leberkarzinomen bislang nicht festgestellt. Qiu et al. beobachteten bei der Isolation muriner hepatischer Progenitorzellen anhand von CD24 eine erhöhte Expression von CK19 und anderen Progenitorzellmarkern in der CD24-positiven Zellpopulation [81].

Eine Assoziation mit Metastasierung, Rezidiven und Chemoresistenz in HCCs brachte CK19 die Bezeichnung als *stemness-related marker* und bei manchen Autoren sogar als Tumorstammzellmarker ein [29,40,46]. Sowohl CD24 als auch CD133 werden ähnlich wie CK19 in hepatischen Progenitorzellen und Tumorstammzellen von HCCs exprimiert [52,54,66,81,100]. Der Zusammenhang der beiden Marker mit der CK19-Expression könnte

somit ein Hinweis auf einen Progenitorzellursprung der CK19-positiven Tumore sein. In gesundem Lebergewebe werden CD133 und CD24 ähnlich wie CK19 auch in Cholangiozyten exprimiert, CD24 jedoch nur sehr schwach [81,100,122]. Die Expression von CD133 und CD24 ist somit nicht zwangsweise auf die Existenz von Tumorstammzellen oder die Entstehung aus HPCs zurückzuführen, sondern kann auch Ausdruck einer biliären Differenzierung der Tumore sein. Untersuchungen der Marker-Expression auf Proteinebene könnten dieser Frage auf den Grund gehen und die qPCR-Ergebnisse verifizieren. Im Vergleich der einzelnen Tumorgruppen fiel außerdem auf, dass *Cd24* und *Cd133* genau wie andere untersuchte Progenitor-/Stammzellmarker in mehreren Tumorentitäten signifikant mehr exprimiert wurden, während die *Ck19*-Expression nur in den gemischt differenzierten Karzinomen höher war. Somit scheint die Expression der Marker abhängig von Tumorentität und Mauskohorte unterschiedlich reguliert zu werden.

4.2.6.2 Heterogene Expression von Tumorstammzellmarkern in verschiedenen Tumorentitäten und Mauskohorten

Die unterschiedlichen Expressionsmuster der Stammzellmarker abhängig von Tumorentität und Mauskohorte unterstreichen die Heterogenität der hier untersuchten Karzinome. Zudem sah man auch innerhalb der Gruppen deutliche Unterschiede, zu erkennen an den großen Standardabweichungen. Flores-Téllez et al. beschreiben die Koexistenz heterogener Tumorstammzellpopulationen mit unterschiedlichem Phänotyp nebeneinander [25]. Eine Interkonversion verschiedener Stammzellpopulationen untereinander, sowie zwischen Tumorstammzellen und nicht-Tumorstammzellen sei wahrscheinlich, insbesondere vor dem Hintergrund der zellulären Plastizität von Lebergewebe [25]. Diese Interkonversion und damit die Expression verschiedener Stammzellmarker werde beeinflusst von EMT (epithelial-mesenchymale Transition), epigenetischen Veränderungen, Chemotherapeutika und der Mikroumgebung [25,68,67,124]. In den hier untersuchten Mausmodellen könnte die NF-κB-vermittelte chronische Entzündung über die Veränderung der Mikroumgebung zu einem anderen Expressionsmuster führen als in Kohorten mit *Trp53*-Deletion alleine. Dass es im hier verwendeten Mausmodell der NF-κB-Aktivierung zu Änderungen der Mikroumgebung in Form von Leberfibrose und *Ectopic Lymphoid Structures* (ELS) kommt, wurde in bereits publizierten Ergebnissen der AG Lechel nachgewiesen [101]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die unterschiedlichen Expressionsmuster der Tumorstammzellmarker in den hier untersuchten Lebertumoren auf heterogene Subpopulationen von Tumorstammzellen in

Abhängigkeit von Tumorentität und Mauskohorte hinweisen. Die Aufklärung der Mechanismen von Entstehung und Interkonversion der Tumorstammzellen ist essentiell für die Entwicklung nachhaltiger Tumortherapien bei Leberkarzinomen. Eine detailliertere Untersuchung der Markerexpression auf Proteinebene und ggf. Isolierung mutmaßlicher Tumorstammzellen könnte weitere Erkenntnisse bringen.

4.3 Der Einfluss von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomzellen

Im ersten Teil der Arbeit fiel auf, dass die untersuchten ICCs transgener Mäuse wenig CK19 exprimierten, obwohl CK19 ein relativ spezifischer Marker für Cholangiokarzinome ist [53,62]. Je nach Studie sind lediglich 0 – 23 % der ICCs CK19-negativ [15,86,93,126]. Welchen Einfluss die Unterschiede in der CK19-Expression auf Cholangiokarzinome haben, ist umstritten. Shimonishi et al. beobachteten eine erhöhte CK19-Expression in gut differenzierten ICCs im Vergleich zu schlechter differenzierten ICCs, was auf einen Verlust der CK19-Expression im Verlauf der Dedifferenzierung von HCCs hinweist [93]. In einer kleineren Stichprobe fanden Demarez et al. jedoch keinen Zusammenhang [15]. Andere Autoren assoziierten CK19 in ICCs mit einer schlechten Prognose. Liu et al. beschreiben ein schlechteres Überleben und häufigere Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit ICCs, die viel CK19 exprimierten [62]. Ebenso war das lösliche CK19-Fragment CYFRA 21-1 im Serum von ICC-Patienten mit Tumorprogression und schlechtem Outcome assoziiert [107]. Im Gegensatz zu HCCs, bei denen CK19 konsistent mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, ist die Studienlage zu CK19 in Cholangiokarzinomen ungenügend und uneindeutig.

4.3.1 Induktion eines stabilen *CK19*-Knockouts in CC-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9

In den Cholangiokarzinomzelllinien TFK-1 und SZ-1 wurde mittels CRISPR-Cas9 ein stabiler *CK19*-Knockout generiert. Die Zelllinie TFK-1 wurde ursprünglich aus einem extrahepatischen Cholangiokarzinom eines japanischen Patienten gewonnen [88]. Die SZ-1 Zelllinie entstammt einem intrahepatischen Cholangiokarzinom und wurde freundlicherweise von Prof. Nisar Malek zur Verfügung gestellt [125]. CRISPR-Cas9-*all-in-one* Plasmide wurden durch Lipofektion in die Zellen eingebracht und diese mit einem Massenzytometer einzeln sortiert. Mittels Western Blot Analyse, qPCR und Sanger-Sequenzierung wurden ein TFK-1 Zellklon und zwei SZ-1 Klone identifiziert, in denen CK19 erfolgreich deletiert wurde.

Durch den Einsatz von CRISPR-Cas9 und das anschließende *Single cell sorting* ist es uns gelungen, stabile *CK19*-Knockout-Klone zu generieren. Diese Methode hat mehrere Vorteile gegenüber dem häufig verwendeten Gen-*Silencing* mittels RNA-Interferenz: Zum einen konnten wir statt eines *knockdowns* mit verbleibender Restaktivität einen kompletten Knockout von *CK19* induzieren. Außerdem war der Knockout stabil, was die Untersuchung der Zellen über einen längeren Zeitraum ohne ein Wiederaufflammen der CK19-Expression ermöglichte [28]. Der Einsatz von *all-in-one*-Plasmiden, die die genetische Information von *guide*RNA und Cas9 enthalten, hat gegenüber der Verwendung von zwei Vektoren den Vorteil, dass die Cas9-Nuklease nur vorübergehend exprimiert wird und so *off-target*-Effekte minimiert werden [28]. Nichtsdestotrotz ist bekannt, dass es durch CRISPR/Cas9 zu unbeabsichtigten Veränderungen des Genoms kommen kann, da die *guide*RNA positionsabhängig *mismatches* toleriert [27]. Zudem wurden die Zellen durch Einzel-Zell-*Sorting* und die Verwendung von Lipofektamin Stress ausgesetzt [28]. Lipofektion führte in Studien zur Induktion von Hitzeschockproteinen, Stressgenen und Genen, die in den Zellmetabolismus, die Zellzykluskontrolle und pro-apoptotische Signalwege involviert sind [24].

4.3.2 Untersuchung der Malignität von Cholangiokarzinomzellen in Abhängigkeit von CK19

Die *CK19*-Knockout- und parentalen *CK19*-Wildtyp-Zellen wurden anhand von Experimenten untersucht, die verschiedene Aspekte der Malignität von Krebszellen evaluieren. Es wurden Wachstumskurven über fünf Tage generiert, um die Proliferationskapazität zu untersuchen, die mit Tumorpromotion und -progression zusammenhängt [22]. Zudem scheint CK19 in epithelialen Zellen eine zentrale Rolle bei der Bildung apikaler Zellpolarität und Mikrovilli zu haben [89]. Wir vermuteten deshalb eine Inhibierung der Zellmigration in CK19-deletierten Zellen, die wir im *Scratch Wound Assay* untersuchten. Dafür wurden dem konfluenten Zellrasen mit einer Pipettenspitze „Wunden“ zugefügt und deren Verschluss über 48 Stunden beobachtet. Die so provozierte Migration epithelialer Zellschichten findet auch im Rahmen von Tumormetastasierung statt [37]. Des Weiteren ist die Kolonienbildung ohne Kontakt zu einer festen Oberfläche oder extrazellulärer Matrix ein wichtiger Schritt maligner Transformation und Metastasierung und kann mittels *Soft Agar Assay* untersucht werden [6,102]. Dafür wurden Zellkulturplatten mit einem Medium-Agar-Gemisch beschichtet und vereinzelte Zellen in Medium-Agar-Gemisch darauf gegeben. Nach drei Wochen wurden die Kolonien ausgezählt.

Tumorstammzellen verfügen über die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien und sind resistent gegenüber Chemotherapeutika [25]. Daher wird den Tumorstammzellen oder auch tumorinitiierenden Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung, dem Fortschreiten sowie der Entwicklung von Rezidiven und Metastasen vieler Krebsarten zugeschrieben [14,25]. In HCCs ist CK19 mit einem Stammzell-Phänotyp assoziiert und wurde als Tumorstammzellmarker bezeichnet [29,40,46]. Die Assoziation einer hohen CK19-Expression mit Metastasierung und schlechter Prognose lässt in ICCs einen ähnlichen Zusammenhang vermuten [62]. Andererseits könnten CK19-negative Cholangiokarzinome auch im Rahmen der Dedifferenzierung auftreten und die Annahme eines aggressiveren Stammzell-Phänotyps begünstigen. Welchen Einfluss CK19 auf den Stammzellcharakter von Cholangiokarzinomzellen hat, wurde in dieser Arbeit mit verschiedenen Versuchen analysiert. Im *Sphere Formation Assay* wurde die Bildung von 3D-Tumorsphären aus vereinzelten Zellen in nicht-adhärenter und zusätzlich serumfreier Umgebung beobachtet. Nach drei Tagen wurden sowohl Anzahl als auch Größe der Sphären ausgewertet. Dies lässt Rückschlüsse auf ein Stammzell-ähnliches Verhalten der untersuchten Zellen zu [79]. Ein möglicher Stammzellphänotyp wurde zudem durch die Bestimmung der mRNA-Expression von Tumorstammzellmarkern mittels qPCR analysiert. Es wurden Marker ausgewählt, die in ICCs bereits genutzt wurden um Tumorstammzellen zu isolieren: CD24, CD44, CD133 und EpCAM [69]. Von vielen Autoren wird die subkutane Transplantation von Tumorzellen in Tiermodellen als Goldstandard zur Evaluation von Stammzelleigenschaften angesehen [25]. Hierbei kann die Fähigkeit von Tumorzellen zur Tumorinitiierung *in vivo* beobachtet werden. Häufig erfolgt die Injektion in immunkompromittierte NOD-Scid-γ-Mäuse, die sowohl Defekte der adaptiven als auch der angeborenen Immunität aufweisen [94]. Vor der Transplantation wurden die Zellen mit Matrigel-Matrix versetzt, die eine Verteilung der Zellen verhindern soll und diverse Extrazellulärmatrixproteine und Wachstumsfaktoren enthält. Die Tumorzellen in Matrigel wurden subkutan in den Rücken von NOD-Scid- γ-Mäuse injiziert. Nach drei Wochen wurden die gebildeten Tumore entnommen, gewogen und ausgemessen sowie histologisch evaluiert mittels H.E-Färbung und CK19-Immunhistochemie.

4.3.2.1 Unterschiedliche Effekte des CK19-Knockouts auf Proliferation, Migration, Sphärenbildung und Stammzellmarkerexpression in SZ-1 Zellen

Es fielen nicht nur Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien TFK-1 und SZ-1 auf, die im nächsten Abschnitt erörtert werden sollen, sondern auch Unterschiede zwischen den

beiden SZ-1 *CK19*ko-Klonen. Während sich der SZ-1 *CK19*ko1 Klon bezüglich Proliferation, Tumorsphärenbildung und der Expression von Tumorstammzellmarkern ähnlich verhielt wie die Wildtypzellen und nur etwas schneller migrierte, sah man beim SZ-1 *CK19*ko2 Klon eine langsamere Proliferation nach vier und fünf Tagen, eine langsamere Migration, kleinere Tumorsphären und eine erhöhte *CD24*-Expression im Vergleich zum Wildtyp. Die Diskrepanz im Verhalten der beiden *ko*-Klone kann methodisch bedingt sein. Denkbar wären *off-target* Effekte durch CRISPR-Cas9, also unbeabsichtigte Doppelstrangbrüche an Stellen im Genom der Krebszellen, die essentiell für die Zellproliferation sind. Die langsamere Proliferation kann sowohl die Ergebnisse des *Scratch Wound Assays* als auch die Größe der Tumorsphären im *Sphere Formation Assay* beeinflussen [37]. Die Größe der Sphären reflektiert nicht allein den Stammzellphänotyp, sondern wird von weiteren Faktoren beeinflusst, wie der Proliferationskapazität und der Sensibilität für Wachstumsfaktoren [79]. Der ähnliche zeitliche Rahmen der Versuche (Proliferationsassay 1 – 5 Tage, *Scratch Wound Assay* 3 – 4 Tage nach Aussäen, *Sphere Formation Assay* 3 Tage) unterstützt einen Zusammenhang.

CD24 ist in Cholangiokarzinomen mit Tumorprogress und schlechtem Gesamtüberleben assoziiert [43]. *In vitro* konnte in einer CD24-positiven Subpopulation von CC-Zellen eine erhöhte Chemoresistenz, Adhäsion, Motilität und Migration beobachtet werden, während die Proliferation unverändert war [43]. Die erhöhte *CD24*-Expression im langsamer migrierenden SZ-1 *CK19*ko2 Klon widerspricht dieser Studie, wobei einige Limitationen die Aussagekraft unserer Ergebnisse einschränken. Zum einen war die relative *CD24*-mRNA-Expression im *CK19*ko2 Klon mit einer Verdopplung im Vergleich zum Wildtyp nur gering erhöht. Zum anderen kann die gehemmte Proliferation eine mögliche schnellere Migration im *Scratch Wound Assay* überlagert haben. Eine Untersuchung der *CD24*-Expression auf Proteinebene würde die qPCR-Ergebnisse verifizieren. In Anbetracht der geringen Unterschiede der Expressionslevel wurde hierauf verzichtet.

4.3.2.2 Unterschiedliche Effekte des CK19-Knockouts auf die Malignität von intra- und extraheptischen Cholangiokarzinomzellen

Bezüglich der Anzahl der Tumorsphären im *Sphere Formation Assay* und der Expression von Stammzellmarkern waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den *CK19*-deletierten Klonen und den Wildtyp-Zellen zu erkennen. *CD24* und *CD133*, die in Tumorgewebe transgener Mäuse mit der *CK19*-Expression korrelierten, scheinen in

Cholangiokarzinomzellen unabhängig von CK19 reguliert zu werden. Auch die Proliferationskapazität unterschied sich nur bei einem SZ-1 *CK19*ko Klon vom Wildtyp (s. Abschnitt 3.2.2.1). In vielen Versuchen zeigten sich zwar Unterschiede durch den CK19-Knockout, jedoch verhielten sich die CK19-deletierten Zellen in den jeweiligen Zelllinien konträr zueinander. Während beide SZ-1 *CK19*ko Klone signifikant mehr Kolonien im *Soft Agar* und tendenziell größere Tumore im Transplantationsversuch bildeten, sah man bei den TFK-1 CK19ko Zellen tendenziell weniger Kolonien im *Soft Agar* und kleinere Tumore nach Xenotransplantation. Im Gegensatz dazu migrierten die TFK-1 *CK19*ko Zellen schneller im *Scratch Wound Assay* und bildete anteilig mehr große Tumorsphären als die Wildtyp-Zellen, während der SZ-1 *CK19* ko1 Klon nur geringfügig schneller migrierte.

Die oft gegensätzlichen Effekte des *CK19*-Knockouts auf die Malignität der Tumorzellen deuten auf Unterschiede zwischen den hier untersuchten Zelllinien hin. Tatsächlich wurde die gut charakterisierte Zelllinie TFK-1 aus einem extrahepatischen Cholangiokarzinom isoliert, während SZ-1 einem intrahepatischen Cholangiokarzinom entstammt [88,125]. Cholangiokarzinome werden nach der anatomischen Lokalisation unterteilt in intrahepatische und extrahepatische Cholangiokarzinome. Eine makroskopische Klassifikation anhand des Wachstumsmusters unterscheidet zwischen dem expansiv wachsenden *mass-forming (MF)* Typ, dem periduktal-infilitrierenden (PI) Typ und dem *intraductal-growing* (intraduktal wachsender) *(IG)* Typ [75]. Auch Mischformen können vorkommen, wie der MF-PI Typ. Während ECCs üblicherweise dem PI oder IG-Typ entsprechen, zeigen ca. 65 % der ICCs ein *mass-forming* Muster und ca. 25 % einen gemischten MF-PI Typ [44,109]. Nakanuma et al. etablierten für konventionelle ICCs zudem eine histologische Einteilung in *small duct* und *large duct* ICCs, die Überschneidungen mit der makroskopischen Klassifikation hat [75]. *Small duct* ICCs entsprechen hauptsächlich dem MF-Typ und entstammen den peripheren kleinen intrahepatischen Gallengängen, HPCs oder Hepatozyten. Risikofaktoren für die Entstehung des *small duct* ICCs sind chronische Hepatitis und Leberzirrhose [2,75]. *Large duct* ICCs entstehen in den großen Gallengängen und den assoziierten peribiliären Drüsen und zeigen makroskopisch ein PI- oder IG-Wachstum. Auch die Risikofaktoren PSC und Hepatolithiasis unterscheiden sich vom *small duct* ICC [2,75]. Zusammenfassend kann man sagen, dass sich ein beträchtlicher Anteil der ICCs substantiell von ECCs unterscheidet bezüglich Risikofaktoren, Wachstumsmuster und Entstehungsmechanismus. Das unterschiedliche Verhalten der hier untersuchten Zelllinien als Antwort auf den CK19-Verlust könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Zelllinien unterschiedlichen Untergruppen

angehören. Dies verdeutlicht die Heterogenität von Cholangiokarzinomen und insbesondere die Unterschiede zwischen ECCs und ICCs. Eine detaillierte Beschreibung der Tumorproben, aus denen die Zelllinien gewonnen wurden, wäre für eine exakte Zuteilung zu CC-Untergruppen nötig.

4.3.2.3 Schnellere Migration in TFK-1 Zellen durch CK19-Knockout

Der signifikant schnellere Wundverschluss der TFK-1 *CK19*ko Zellen steht im Gegensatz zu Untersuchungen von CK19-*knockdown* Zellen aus HCCs. In Publikationen zeigten diese unabhängig von der Proliferation ein weniger invasives Verhalten [29,103]. In weiteren Studien war die CK19-Expression in HCCs *in vitro* nicht nur mit schnellerer Migration bzw. invasiverem Verhalten, sondern zusätzlich mit einer schnelleren Proliferation assoziiert [42,121]. Die Vermutung, dass CK19 als Zellstrukturprotein wichtig sei für die Migration in Cholangiokarzinomzellen, hat sich in unseren Versuchen nicht bestätigt. CK19 scheint in der ECC-Zelllinie TFK-1 eher einen gegenteiligen Effekt zu haben. Da ECCs am ehesten von CK19-exprimierenden Gallengangszellen ausgehen, entfernen sich die Tumorzellen durch den CK19-Verlust weiter vom Phänotyp ihrer mutmaßlichen Ursprungszelle. Das scheint zumindest bezüglich der Migration ein stärkeres malignes Potential nach sich zu ziehen.

4.3.2.4 Stärkere Tumor-initiierende Kapazität durch CK19-Verlust in SZ-1 Zellen

Die signifikanten Ergebnisse im *Soft Agar Assay,* unterstützt von einer ähnlichen Tendenz im Xenotransplantationsversuch, sprechen in den SZ-1 Zellen für eine stärkere Tumor-initiierende Kapazität durch den Verlust von CK19. Lediglich die Anzahl und Größe der Sphären im *Sphere Formation Assay* ließ keinen konsistenten Effekt erkennen. Trotz sorgfältiger Vereinzelung und behutsamem Umgang mit den Platten kann nicht ausgeschlossen werden, dass es hierbei zu Zellaggregation kam. Das schränkt die Aussagekraft des *Sphere Formation Assays* ein. Bei Kawai et al. war der Einfluss von CK19 in der HCC-Zelllinie Huh7 entgegengesetzt zu unseren Ergebnissen: FACS-isolierte CK19-positive Zellen bildeten *in vitro* und *in vivo* mehr Kolonien bzw. Tumore im Vergleich zu CK19-negativen Zellen [40]. Zwar haben mehrere Autoren die Ähnlichkeit von ICCs und HCCs herausgestellt und vermuten einen gemeinsamen Ursprung und Entstehungsmechanismus der beiden Entitäten [2,32,91,129]. Das geringere maligne Potential der CK19-positiven SZ-1 Wildtyp Zellen ist jedoch konträr zu Erkenntnissen über den Effekt von CK19 in HCCs. Bezüglich des Einflusses von CK19 auf die Malignität scheint es also Unterschiede zwischen HCCs und ICCs zu

geben. Interessant wäre die Untersuchung des CK19-Einflusses in verschiedenen gut charakterisierten oder primären ICC-Zelllinien, die aus unterschiedlichen ICC-Untergruppen (*small duct* und *large duct* ICC) gewonnen wurden.

4.3.2.5 Partieller CK19-Verlust nach Xenotransplantation von Cholangiokarzinomzellen

In immunhistochemischen Färbungen der Transplantationstumore waren die Tumore aus CK19-deletierten Zellen erwartungsgemäß CK19 negativ. Bei den Tumoren der Wildtypzellen fiel auf, dass es neben zahlreichen membranös gefärbten CK19-positiven Zellen auch immer wieder CK19-negative Zellverbände gab. CK19-positive CC-Zellen können demnach sowohl in CK19-positive als auch in CK19-negative CC-Zellen differenzieren. Gleiches konnten Kawai et al. in FACS-isolierten HCC-Zellen *in vitro* und *in vivo* feststellen [40]. Die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien ist neben Selbsterneuerung und Chemoresistenz ein wichtiges Charakteristikum von Tumorstammzellen [14]. Die Untersuchung weiterer Stammzelleigenschaften, wie die Tumor-initiierenden Eigenschaften im *Sphere Formation Assay* und nach Xenotransplantation oder die Expression von Tumorstammzellmarkern ergab jedoch keine eindeutigen Hinweise auf einen Stammzellphänotyp der CK19-positiven Zellen. Es ist denkbar, dass der CK19-Verlust durch Interaktionen mit Matrigel hervorgerufen wurde. Matrigel entspricht in seiner Zusammensetzung ungefähr der Basalmembranmatrix und enthält unter anderem Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykan, Entactin und zahlreiche Wachstumsfaktoren (FGF, TGF-β, EGF u.a.) [5,47]. Es imponiert in der H&E Färbung stark eosinophil, bildet bei Körpertemperatur ein Hydrogel und verhindert so den Abbau der Tumorzellen [5,47]. Zusätzlich beschleunigt es das Tumorwachstum und unterstützt die Beibehaltung eines undifferenzierten und invasiven Phänotyps von Krebszellen [5,85]. In Untersuchungen humaner Brustkrebszellen wurde gezeigt, dass verschiedene Arten von Basalmembran-Matrices, darunter auch Matrigel, die Zellmorphologie, die Expression von Oberflächenmarkern und den Differenzierungsstatus von Krebszellen verändern können [85]. Bei Wachstum auf Matrigel nahmen die Brustkrebszellen eine runde Form an und bildeten weniger Protrusionen [85]. Auch die mit Matrigel transplantierten CC-Zellen in unseren Versuchen bildeten eine rundliche Form. CK19 ist in Epithelzellen in die Organisation des apikalen Zytoskeletts und die Bildung von Mikrovilli involviert [89]. Ein Verlust der CK19-Expression durch komplexe Interaktionen mit Extrazellulärmatrix-Proteinen aus Matrigel, einhergehend mit einer Änderung der Zellmorphologie, ist denkbar. Weitergehende Untersuchungen der Zellmorphologie und der

Expression von Zytoskelettproteinen könnten hier Erkenntnisse bringen. Es gilt jedoch zu bedenken, dass mit unserem Versuch keine sichere Aussage über den genauen Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens CK19-negativer Zellen getroffen werden kann. Da hier keine isolierten Zellen transplantiert wurden, kann der CK19-Verlust bereits vorher im Laufe der Passagierung aufgetreten sein.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse dieser Arbeit nur schwache Indizien für CK19 als Tumorstammzellmarker in Leberkarzinomen der hier untersuchten Mausmodelle und Cholangiokarzinomzelllinien. Zu diesen Indizien gehört die Differenzierung CK19-positiver CC-Zellen zu CK19-negativen Zellen nach Xenotransplantation, die erhöhte CK19-Expression in gemischt differenzierten Tumoren vor dem Hintergrund der *Trp53*-Deletion in transgenen Mausmodellen und die Korrelation der CK19-Expression mit den Tumorstammzellmarkern CD24 und CD133 in Mausmodellen der Hepatokarzinogenese. Ein eindeutiger Effekt von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomen konnte nicht beobachtet werden.

Vielmehr ergeben sich aus der Untersuchung der CK19-Expression in Leberkarzinomgewebe transgener Mauskohorten Hinweise auf die Entstehung der Karzinome aus Hepatozyten. Die auffallend geringe CK19-Expression in ICCs und die immunhistochemische Färbung ausschließlich biliär differenzierter Anteile der HCC-CCs sprechen für einen hepatozytären Ursprung. Die Ergebnisse verdeutlichen die zelluläre Plastizität von Hepatozyten vor dem Hintergrund von Trp53-Verlust und chronischer Leberentzündung. Für eine wirksame Unterbindung von Tumorentstehung und -progression ist ein tiefergehendes Verständnis der Mechanismen nötig, die zu Entartung und Transdifferenzierung von Hepatozyten führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Heterogenität von Leberkarzinomen, die Forscher und Ärzte weltweit vor große Herausforderungen stellen. Diese Heterogenität bezieht sich zum einen auf die mutmaßliche Existenz verschiedener Populationen von Tumorstammzellen im untersuchten murinen Tumorgewebe in Abhängigkeit von Tumorentität und Genotyp. Da Tumorstammzellen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Metastasen

und Rezidiven zugeschrieben wird, ist deren Identifizierung und gezieltes therapeutisches Angreifen essentiell für eine nachhaltige Tumortherapie.

Zum anderen veranschaulichen die Untersuchungen an CK19-Knockout Zellen die Heterogenität von Cholangiokarzinomen. Der unterschiedliche Effekt des CK19-Knockouts auf intra- und extrahepatische CC-Zellen sowie der Vergleich mit Ergebnissen aus HCCs in der Literatur machen deutlich, dass sich Leberkarzinome und insbesondere Cholangiokarzinome bezüglich des Einflusses von CK19 voneinander unterscheiden. Die vielfältigen Risikofaktoren und molekular-genetischen Eigenschaften, sowie Unterschiede bezüglich geographischer Verteilung, Tumormorphologie und klinischem Verhalten haben bereits zu einer detaillierteren Unterteilung intrahepatischer Cholangiokarzinome geführt [75,109]. Im Rahmen personalisierter Tumormedizin wird man in Zukunft für eine effektive Tumortherapie ganze Panels an molekularen Veränderungen und Tumorstammzellmarkern bestimmen und in Zusammenschau mit klinischen Faktoren betrachten müssen. Nur so wird man der Heterogenität von Leberkarzinomen Rechnung tragen können, um Aussagen über die individuelle Prognose zu machen und eine gezielte Tumortherapie zu ermöglichen. Zuvor ist jedoch eine genaue Charakterisierung molekularer Marker und eine Einschätzung der prognostischen Bedeutung nötig.

5 Zusammenfassung

Leberkrebs ist weltweit die sechsthäufigste Krebsart und die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache. Mit schlechter Prognose, limitierten therapeutischen Möglichkeiten und häufig auftretenden Metastasen und Rezidiven stellen Leberkarzinome Ärzte und Forscher weltweit vor eine Herausforderung. Zu den Leberkarzinomen gehören das von Hepatozyten ausgehende hepatozelluläre Karzinom (HCC), das intrahepatische Cholangiokarzinom (ICC) und die seltenen gemischt differenzierten Karzinome (HCC-CC), die Anteile sowohl hepatozellulärer als auch cholangiozellulärer Differenzierung aufweisen. Der Großteil der HCCs und eine Untergruppe der ICCs entsteht auf dem Boden von Leberfibrose und -zirrhose, meist hervorgerufen durch virale Hepatitiden, alkoholische oder nicht-alkoholische Steatohepatitis. *Trp53*-Mutationen gehören zu den häufigsten Mutationen in Leberkarzinomen. Die Kombination von chronischer Leberentzündung und leberspezifischem *Trp53*-

Verlust in einem transgenen Mausmodell bietet deshalb ein realitätsnahes Modell zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese und wurde bereits von der AG Lechel publiziert.

Das Intermediärfilament Zytokeratin 19 (CK19) wird in gesundem Lebergewebe von Cholangiozyten und hepatischen Progenitorzellen (HPC) exprimiert. Als Reaktion auf Leberschäden können HPCs sowohl zu Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten differenzieren. Die Assoziation einer CK19-exprimierenden Untergruppe von HCCs mit einer schlechten Prognose und der Expression weiterer Tumorstammzellmarker hat CK19 die Bezeichnung als *stemness-related marker* eingebracht. Einige Autoren vermuten die Entstehung der aggressiveren CK19-positiven HCCs aus hepatischen Progenitorzellen. Im Gegensatz zu HCCs ist der Großteil der ICCs und gemischt-differenzierten Karzinome CK19-positiv.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zunächst die CK19-Expression in Leberkarzinomgewebe aus transgenen Mauskohorten der Hepatokarzinogenese auf Basis einer NF-κB-vermittelten chronischen Entzündung und leberspezifischer *Trp53 (transformation related protein 53)* -Deletion untersucht. Dabei stand die CK19-Expression in Abhängigkeit von der Tumorentität und der Zusammenhang mit der Expression hepatischer Tumorstammzellmarker im Fokus. Während die CK19-Expression in ICCs nur auf Proteinebene gering erhöht war, konnte sowohl in der Immunhistochemie als auch in der qPCR (quantitative Polymerase-Kettenreaktion) eine erhöhte CK19-Expression in gemischt-differenzierten Tumoren aus Mäusen mit leberspezifischem Trp53-Verlust festgestellt werden. Die immunhistochemische Färbung ausschließlich biliär differenzierter Tumoranteile lässt eine Entstehung der HCC-CCs aus transformierten Hepatozyten vermuten. Die geringe CK19-Expression der ICCs weist ebenfalls auf einen Hepatozytenursprung hin, was die zelluläre Plastizität von Hepatozyten vor dem Hintergrund chronischer Inflammation und Trp53-Verlusts verdeutlicht.

Die CK19-mRNA-Expression in Leberkarzinomen transgener Mäuse korrelierte mit der Expression der hepatischen Progenitor-/ Stammzellmarker CD24 (*cluster of differentiation 24*) und CD133 (*cluster of differentiation 133*), was als Hinweis auf einen Stammzellphänotyp der CK19-positiven HCC-CCs gesehen werden kann. Die unterschiedliche Expression weiterer Tumorstammzellmarker relativiert dies jedoch und kann als Ausdruck der Heterogenität von Tumorstammzellpopulationen in Leberkarzinomen gesehen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von CK19 auf die Malignität von Cholangiokarzinomen untersucht. Hierfür wurde mittels CRISPR/Cas9 *(Clustered regularly*

interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9) erfolgreich ein stabiler CK19-Knockout in einer intrahepatischen und einer extrahepatischen Cholangiokarzinomzelllinie induziert und die CK19-Knockout-Klone mit den Wildtypzellen verglichen. Untersucht wurden dabei Proliferation, Migration, die Kolonienbildung im *Soft Agar*, die Bildung von 3D-Tumorsphären in serumfreier Umgebung und die Expression von Tumorstammzellmarkern. Auch *in vivo* wurde die Tumorbildung nach Xenotransplantation untersucht. Zusammenfassend ergab sich kein eindeutiger Effekt des CK19-Knockouts auf die Malignität von Cholangiokarzinomzellen. Die unterschiedlichen Ergebnisse in Abhängigkeit der untersuchten Zelllinie verdeutlichen die Heterogenität von Cholangiokarzinomen. Einige Autoren machen diese Heterogenität für die schlechte Prognose und limitierten therapeutischen Möglichkeiten von ICCs verantwortlich und haben bereits differenziertere Klassifikationen von ICCs angestoßen. Eine detaillierte Unterteilung von Leberkarzinomen und insbesondere Cholangiokarzinomen anhand molekular-genetischer Eigenschaften, Tumormorphologie, Entstehungsmechanismen und klinischen Faktoren im Sinne einer personalisierten Tumormedizin wird in Zukunft notwendig sein, um der Heterogenität von Leberkarzinomen gerecht zu werden und eine nachhaltige Tumortherapie gewährleisten zu können.

6 Literaturverzeichnis

Literatur

1. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, Cicin I, Merle P, Chen Y, Park J-W, Blanc J-F, Bolondi L, Klümpen H-J, Chan SL, Zagonel V, Pressiani T, Ryu M-H, Venook AP, Hessel C, Borgman-Hagey AE, Schwab G, Kelley RK (2018) Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. The New England Journal of Medicine, 379: 54–63
2. Aishima S, Oda Y (2015) Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 22: 94–100
3. Bader BL, Magin TM, Hatzfeld M, Franke WW (1986) Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. EMBO J, 5: 1865–1875
4. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R (2004) Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. Clin Biochem, 37: 529–540
5. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I (2011) Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. Int J Cancer, 128: 1751–1757
6. Borowicz S, van Scoyk M, Avasarala S, Karuppusamy Rathinam MK, Tauler J, Bikkavilli RK, Winn RA (2014) The soft agar colony formation assay. J Vis Exp: e51998
7. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki J-P, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng A-L, Llovet JM, Finn RS, LeBerre M-A, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G (2017) Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet, 389: 56–66
8. Brunt E, Aishima S, Clavien P-A, Fowler K, Goodman Z, Gores G, Gouw A, Kagen A, Klimstra D, Komuta M, Kondo F, Miksad R, Nakano M, Nakanuma Y, Ng I, Paradis V, Nyun Park Y, Quaglia A, Roncalli M, Roskams T, Sakamoto M, Saxena R, Sempoux C, Sirlin C, Stueck A, Thung S, Tsui WMS, Wang X-W, Wee A, Yano H, Yeh M, Zen Y, Zucman-Rossi J, Theise N (2018) cHCC-CCA: Consensus terminology for primary liver carcinomas with both hepatocytic and cholangiocytic differentation. Hepatology, 68: 113–126

9. Calaora V, Chazal G, Nielsen PJ, Rougon G, moreau H (1996) mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. Neuroscience, 73: 581–594
10. Cao L, Fan X, Jing W, Liang Y, Chen R, Liu Y, Zhu M, Jia R, Wang H, Zhang X, Zhang Y, Zhou X, Zhao J, Guo Y (2015) Osteopontin promotes a cancer stem cell-like phenotype in hepatocellular carcinoma cells via an integrin-NF-κB-HIF-1α pathway. Oncotarget, 6: 6627–6640
11. Chougule P, Sumitran-Holgersso S (2012) Cytokeratins of the Liver and Intestine Epithelial Cells During Development and Disease. In: Hamilton G (Hrsg.) Cytokeratins - tools in oncology. InTech, S. 15–32
12. Chu P G & Weiss L M Keratin expression in human tissues and neoplasms, 40: 403–439
13. Coulouarn C, Cavard C, Rubbia-Brandt L, Audebourg A, Dumont F, Jacques S, Just P-A, Clément B, Gilgenkrantz H, Perret C, Terris B (2012) Combined hepatocellular-cholangiocarcinomas exhibit progenitor features and activation of Wnt and TGFβ signaling pathways. Carcinogenesis, 33: 1791–1796
14. Craig T. Jordan, Monica L. Guzman, Mark Noble (2006) Review article. The New England Journal of Medicine, 14: 201–212
15. Demarez C, Hubert C, Sempoux C, Lemaigre FP (2016) Expression of Molecular Differentiation Markers Does Not Correlate with Histological Differentiation Grade in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. PLoS One, 11: e0157140
16. Deng X, Zhang X, Li W, Feng R-X, Li L, Yi G-R, Zhang X-N, Yin C, Yu H-Y, Zhang J-P, Lu B, Hui L, Xie W-F (2018) Chronic Liver Injury Induces Conversion of Biliary Epithelial Cells into Hepatocytes. Cell Stem Cell, 23: 114-122.e3
17. Duncan AW, Dorrell C, Grompe M (2009) Stem cells and liver regeneration. Gastroenterology, 137: 466–481
18. Durnez A, Verslype C, Nevens F, Fevery J, Aerts R, Pirenne J, Lesaffre E, Libbrecht L, Desmet V, Roskams T (2006) The clinicopathological and prognostic relevance of cytokeratin 7 and 19 expression in hepatocellular carcinoma. A possible progenitor cell origin. Histopathology, 49: 138–151
19. Eckert RL, Rorke EA (1989) Molecular biology of keratinocyte differentiation. Environ Health Perspect, 80: 109–116

20. Elghetany MT, Patel J (2002) Assessment of CD24 expression on bone marrow neutrophilic granulocytes: CD24 is a marker for the myelocytic stage of development. American journal of hematology, 71: 348–349
21. Farazi PA, DePinho RA (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. Nat Rev Cancer, 6: 674–687
22. Farber E (1995) Cell proliferation as a major risk factor for cancer: a concept of doubtful validity. Cancer Res, 55: 3759–3762
23. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim T-Y, Kudo M, Breder V, Merle P, Kaseb AO, Li D, Verret W, Xu D-Z, Hernandez S, Liu J, Huang C, Mulla S, Wang Y, Lim HY, Zhu AX, Cheng A-L (2020) Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. The New England Journal of Medicine, 382: 1894–1905
24. Fiszer-Kierzkowska A, Vydra N, Wysocka-Wycisk A, Kronekova Z, Jarząb M, Lisowska KM, Krawczyk Z (2011) Liposome-based DNA carriers may induce cellular stress response and change gene expression pattern in transfected cells. BMC Molecular Biol, 12: 27
25. Flores-Téllez TN, Villa-Treviño S, Piña-Vázquez C (2017) Road to stemness in hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol, 23: 6750–6776
26. Florio AA, Ferlay J, Znaor A, Ruggieri D, Alvarez CS, Laversanne M, Bray F, McGlynn KA, Petrick JL (2020) Global trends in intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma incidence from 1993 to 2012. Cancer, 126: 2666–2678
27. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol, 31: 822–826
28. Giuliano CJ, Lin A, Girish V, Sheltzer JM (2019) Generating Single Cell-Derived Knockout Clones in Mammalian Cells with CRISPR/Cas9. Current Protocols in Molecular Biology, 128: e100
29. Govaere O, Komuta M, Berkers J, Spee B, Janssen C, Luca F de, Katoonizadeh A, Wouters J, van Kempen LC, Durnez A, Verslype C, Kock J de, Rogiers V, van Grunsven LA, Topal B, Pirenne J, Vankelecom H, Nevens F, van den Oord J, Pinzani M, Roskams T (2014) Keratin 19. Gut, 63: 674–685

30. Guest RV, Boulter L, Kendall TJ, Minnis-Lyons SE, Walker R, Wigmore SJ, Sansom OJ, Forbes SJ (2014) Cell lineage tracing reveals a biliary origin of intrahepatic cholangiocarcinoma. Cancer Res, 74: 1005–1010
31. Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D (2006) SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. Experimental cell research, 312: 3701–3710
32. Hill MA, Alexander WB, Guo B, Kato Y, Patra K, O'Dell MR, McCall MN, Whitney-Miller CL, Bardeesy N, Hezel AF (2018) Kras and Tp53 Mutations Cause Cholangiocyte- and Hepatocyte-Derived Cholangiocarcinoma. Cancer Res, 78: 4445–4451
33. Hirano Y, Aziz M, Yang W-L, Wang Z, Zhou M, Ochani M, Khader A, Wang P (2015) Neutralization of osteopontin attenuates neutrophil migration in sepsis-induced acute lung injury. Crit Care, 19: 53
34. Huang L-R, Hsu H-C (1995) Cloning and Expression of CD24 Gene in Human Hepatocellular Carcinoma: A Potential Early Tumor Marker Gene Correlates with p53 Mutation and Tumor Differentiation. Cancer Res, 55: 4717-4721
35. Jain R, Fischer S, Serra S, Chetty R (2010) The use of Cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 18: 9–15
36. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science, 337: 816–821
37. Jonkman JEN, Cathcart JA, Xu F, Bartolini ME, Amon JE, Stevens KM, Colarusso P (2014) An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. Cell Adh Migr, 8: 440–451
38. Joseph NM, Tsokos CG, Umetsu SE, Shain AH, Kelley RK, Onodera C, Bowman S, Talevich E, Ferrell LD, Kakar S, Krings G (2019) Genomic profiling of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma reveals similar genetics to hepatocellular carcinoma. J Pathol, 248: 164–178
39. Katz S-F, Lechel A, Obenauf AC, Begus-Nahrmann Y, Kraus JM, Hoffmann EM, Duda J, Eshraghi P, Hartmann D, Liss B, Schirmacher P, Kestler HA, Speicher MR, Rudolph KL (2012) Disruption of Trp53 in livers of mice induces formation of carcinomas with bilineal differentiation. Gastroenterology, 142: 1229-1239.e3
40. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Mizumoto M, Hatano E, Uemoto S (2015) Keratin 19, a Cancer

Stem Cell Marker in Human Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res, 21: 3081–3091

41. Kawai T, Yasuchika K, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Komori J, Hatano E, Kawaguchi Y, Uemoto S (2016) SOX9 is a novel cancer stem cell marker surrogated by osteopontin in human hepatocellular carcinoma. Sci Rep, 6: 30489
42. Kawai T, Yasuchika K, Seo S, Higashi T, Ishii T, Miyauchi Y, Kojima H, Yamaoka R, Katayama H, Yoshitoshi EY, Ogiso S, Kita S, Yasuda K, Fukumitsu K, Nakamoto Y, Hatano E, Uemoto S (2017) Identification of Keratin 19-Positive Cancer Stem Cells Associating Human Hepatocellular Carcinoma Using 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. Clin Cancer Res, 23: 1450–1460
43. Keeratichamroen S, Leelawat K, Thongtawee T, Narong S, Aegem U, Tujinda S, Praditphol N, Tohtong R (2011) Expression of CD24 in cholangiocarcinoma cells is associated with disease progression and reduced patient survival. Int J Oncol, 39: 873–881
44. Kendall T, Verheij J, Gaudio E, Evert M, Guido M, Goeppert B, Carpino G (2019) Anatomical, histomorphological and molecular classification of cholangiocarcinoma. Liver International, 39: 7–18
45. Khan SA, Thomas HC, Toledano MB, Cox IJ, Taylor-Robinson SD (2005) p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review. Liver Int, 25: 704–716
46. Kim H, Choi GH, Na DC, Ahn EY, Kim GI, Lee JE, Cho JY, Yoo JE, Choi JS, Park YN (2011) Human hepatocellular carcinomas with "Stemness"-related marker expression. Hepatology, 54: 1707–1717
47. Kleinman HK, Martin GR (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. Seminars in Cancer Biology, 15: 378–386
48. Kowalik MA, Sulas P, Ledda-Columbano GM, Giordano S, Columbano A, Perra A (2015) Cytokeratin-19 positivity is acquired along cancer progression and does not predict cell origin in rat hepatocarcinogenesis. Oncotarget, 6: 38749–38763
49. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P (2003) Tumour Biological Aspects of CD24, A Mucin-Like Adhesion Molecule. Histochem J, 35: 255–262
50. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han K-H, Ikeda K, Piscaglia F, Baron A, Park J-W, Han G, Jassem J, Blanc JF, Vogel A, Komov D, Evans TRJ, Lopez C, Dutcus C, Guo M, Saito K, Kraljevic S, Tamai T, Ren M, Cheng A-L (2018) Lenvatinib versus sorafenib

in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. The Lancet, 391: 1163–1173

51. Kumagai A, Kondo F, Sano K, Inoue M, Fujii T, Hashimoto M, Watanabe M, Soejima Y, Ishida T, Tokairin T, Saito K, Sasajima Y, Takahashi Y, Uozaki H, Fukusato T (2016) Immunohistochemical study of hepatocyte, cholangiocyte and stem cell markers of hepatocellular carcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 23: 414–421
52. Lan X, Wu Y-Z, Wang Y, Wu F-R, Zang C-B, Tang C, Cao S, Li S-L (2013) CD133 silencing inhibits stemness properties and enhances chemoradiosensitivity in CD133-positive liver cancer stem cells. Int J Mol Med, 31: 315–324
53. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R (2002) Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. Hum Pathol, 33: 1175–1181
54. Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO (2011) CD24+ Liver Tumor-Initiating Cells Drive Self-Renewal and Tumor Initiation through STAT3-Mediated NANOG Regulation, 9: 50–63
55. Lee C-W, Lin S-E, Tsai H-I, Su P-J, Hsieh C-H, Kuo Y-C, Sung C-M, Lin C-Y, Tsai C-N, Yu M-C (2018) Cadherin 17 is related to recurrence and poor prognosis of cytokeratin 19-positive hepatocellular carcinoma. Oncol Lett, 15: 559–567
56. Lee JI, Lee J-W, Kim JM, Kim JK, Chung HJ, Kim YS (2012) Prognosis of hepatocellular carcinoma expressing cytokeratin 19. World J Gastroenterol, 18: 4751–4757
57. Lee J-S, Heo J, Libbrecht L, Chu I-S, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS (2006) A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. Nat Med, 12: 410–416
58. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): (2021) Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karziome, Langversion 2.0. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hcc-und-billiäre-karzinome. Zugriff am 9.9.2021
59. Libbrecht L, Roskams T (2002) Hepatic progenitor cells in human liver diseases. Cell & Developmental Biology, 6: 389–396
60. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA (2018) Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. Drug Deliv, 25: 1234–1257

61. Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. Nat Cell Biol, 7: 165–171
62. Liu L-Z, Yang L-X, Zheng B-H, Dong P-P, Liu X-Y, Wang Z-C, Zhou J, Fan J, Wang X-Y, Gao Q (2018) CK7/CK19 index. J Surg Oncol, 117: 1531–1539
63. Liu Y, Beyer A, Aebersold R (2016) On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. Cell, 165: 535–550
64. Liu Y-C, Yeh C-T, Lin K-H (2020) Cancer Stem Cell Functions in Hepatocellular Carcinoma and Comprehensive Therapeutic Strategies. Cells, 9: 1331
65. Lu S, Yao Y, Xu G, Zhou C, Zhang Y, Sun J, Jiang R, Shao Q, Chen Y (2018) CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma. Cell Death Dis, 9: 646
66. Ma S, Tang KH, Chan YP er al. (2007) Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. Gastroenterology, 132: 2542–2556
67. Malfettone A, Soukupova J, Bertran E, Crosas-Molist E, Lastra R, Fernando J, Koudelkova P, Rani B, Fabra Á, Serrano T, Ramos E, Mikulits W, Giannelli G, Fabregat I (2017) Transforming growth factor-β-induced plasticity causes a migratory stemness phenotype in hepatocellular carcinoma. Cancer Lett, 392: 39–50
68. Ma S, Tang KH, Chan YP, Lee TK, Kwan PS, Castilho A, Ng I, Man K, Wong N, To K-F, Zheng B-J, Lai PBS, Lo CM, Chan KW, Guan X-Y (2010) miR-130b Promotes CD133+ Liver Tumor-Initiating Cell Growth and Self-Renewal via Tumor Protein 53-Induced Nuclear Protein 1. Cell Stem Cell, 7: 694–707
69. Mayr C, Ocker M, Ritter M, Pichler M, Neureiter D, Kiesslich T (2017) Biliary tract cancer stem cells - translational options and challenges. World J Gastroenterol, 23: 2470–2482
70. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997) A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning. Blood, 90: 5013–5021
71. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982) The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell, 31: 11–24
72. Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. Histochem Cell Biol, 129: 705–733

73. Mu X, Espanol-Suner R, Mederacke I, Affo S, Manco R, Sempoux C, Lemaigre FP, Adili A, Yuan D, Weber A, Unger K, Heikenwalder M, Leclercq IA, Schwabe RF (2015) Hepatocellular carcinoma originates from hepatocytes and not from the progenitor/biliary compartment. J Clin Invest, 125: 3891–3903
74. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington KM, Carneiro F, Cree IA (2020) The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. Histopathology, 76: 182–188
75. Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Xu J, Ikeda H (2010) Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. World J Hepatol, 2: 419–427
76. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature, 445: 106–110
77. Ohrnberger S, Thavamani A, Braeuning A, Lipka DB, Kirilov M, Geffers R, Autenrieth SE, Authenrieth SE, Römer M, Zell A, Bonin M, Schwarz M, Schütz G, Schirmacher P, Plass C, Longerich T, Nordheim A (2015) Dysregulated serum response factor triggers formation of hepatocellular carcinoma. Hepatology, 61: 979–989
78. Ohtsuka T, Sakaguchi M, Yamamoto H, Tomida S, Takata K, Shien K, Hashida S, Miyata-Takata T, Watanabe M, Suzawa K, Soh J, Youyi C, Sato H, Namba K, Torigoe H, Tsukuda K, Yoshino T, Miyoshi S, Toyooka S (2016) Interaction of cytokeratin 19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway. Sci Rep, 6: 39557
79. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F (2011) Eyes wide open. Cell Stem Cell, 8: 486–498
80. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004) NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. Nature, 431: 461–466
81. Qiu Q, Hernandez JC, Dean AM, Rao PH, Darlington GJ (2011) CD24-positive cells from normal adult mouse liver are hepatocyte progenitor cells. Stem Cells Dev, 20: 2177–2188
82. Roncalli M, Park YN, Di Tommaso L (2010) Histopathological classification of hepatocellular carcinoma. Digestive and Liver Disease, 42: 228-234

83. Roskams T, Vos R de, van Eyken P, Myazaki H, van Damme B, Desmet V (1998) Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. J Hepatol, 29: 455–463
84. Roskams T (2006) Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. Oncogene, 25: 3818–3822
85. Ruud KF, Hiscox WC, Yu I, Chen RK, Li W (2020) Distinct phenotypes of cancer cells on tissue matrix gel. Breast Cancer Res, 22: 82
86. Ryu HS, Lee K, Shin E, Kim SH, Jing J, Jung HY, Lee H, Jang J-J (2012) Comparative analysis of immunohistochemical markers for differential diagnosis of hepatocelluar carcinoma and cholangiocarcinoma. Tumori, 98: 478–484
87. Saha SK, Choi HY, Kim BW, Dayem AA, Yang G-M, Kim KS, Yin YF, Cho S-G (2017) KRT19 directly interacts with β-catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. Oncogene, 36: 332–349
88. Saijyo S, Kudo T, Suzuki M, Katayose Y, Shinoda M, Muto T, Fukuhara K, Suzuki T, Matsuno S (1995) Establishment of a new extrahepatic bile duct carcinoma cell line, TFK-1. Tohoku J Exp Med, 177: 61–71
89. Salas PJ, Rodriguez ML, Viciana AL, Vega-Salas DE, Hauri H-P (1997) The Apical Submembrane Cytoskeleton Participates in the Organization of the Apical Pole in Epithelial Cells. J Cell Biol, 137: 359–375
90. Seino S, Tsuchiya A, Watanabe Y, Kawata Y, Kojima Y, Ikarashi S, Yanai H, Nakamura K, Kumaki D, Hirano M, Funakoshi K, Aono T, Sakai T, Sakata J, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Wakai T, Terai S (2018) Clinical outcome of hepatocellular carcinoma can be predicted by the expression of hepatic progenitor cell markers and serum tumour markers, 9: 21844–21860
91. Sekiya S, Suzuki A (2012) Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. J Clin Invest, 122: 3914–3918
92. Shakiba N, White CA, Lipsitz YY, Yachie-Kinoshita A, Tonge PD, Hussein SMI, Puri MC, Elbaz J, Morrissey-Scoot J, Li M, Munoz J, Benevento M, Rogers IM, Hanna JH, Heck AJR, Wollscheid B, Nagy A, Zandstra PW (2015) CD24 tracks divergent pluripotent states in mouse and human cells. Nat Commun, 6: 7329

93. Shimonishi T, Miyazaki K, Nakanuma Y (2000) Cytokeratin profile relates to histological subtypes and intrahepatic location of intrahepatic cholangiocarcinoma and primary sites of metastatic adenocarcinoma of liver. Histopathology, 37: 55–63
94. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R (2005) Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-scid IL2R null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells. The Journal of Immunology, 174: 6477–6489
95. Sia D, Villanueva A, Friedman SL, Llovet JM (2017) Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. Gastroenterology, 152: 745–761
96. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. Nature, 432: 396–401
97. Sunami Y, Leithäuser F, Gul S, Fiedler K, Güldiken N, Espenlaub S, Holzmann K-H, Hipp N, Sindrilaru A, Luedde T, Baumann B, Wissel S, Kreppel F, Schneider M, Scharffetter-Kochanek K, Kochanek S, Strnad P, Wirth T (2012) Hepatic activation of IKK/NFκB signaling induces liver fibrosis via macrophage-mediated chronic inflammation. Hepatology, 56: 1117–1128
98. Sun D, Zhang Y, Sun X, Chen Y, Qiu W, Ji M, Lv G (2015) Prognostic value of cytokeratin 19 in hepatocellular carcinoma. Clin Chim Acta, 448: 161–169
99. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin, 71: 209–249
100. Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, Oshima N, Kiyonari H, Nakauchi H, Taniguchi H (2008) Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. Hepatology, 48: 1964–1978
101. Svinarenko M, Katz S-F, Tharehalli U, Mulaw MA, Maier HJ, Sunami Y, Fischer SK, Chen Y, Heurich S, Erkert L, Tannapfel A, Wirth T, Schirmbeck R, Seufferlein T, Lechel A (2019) An IKK/NF-κB Activation/p53 Deletion Sequence Drives Liver Carcinogenesis and Tumor Differentiation. Cancers (Basel), 11: 1410
102. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P (2012) Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. J Pathol, 226: 380–393

103. Takano M, Shimada K, Fujii T, Morita K, Takeda M, Nakajima Y, Nonomura A, Konishi N, Obayashi C (2016) Keratin 19 as a key molecule in progression of human hepatocellular carcinomas through invasion and angiogenesis. BMC Cancer, 16: 903
104. Tschaharganeh DF, Xue W, Calvisi DF, Evert M, Michurina TV, Dow LE, Banito A, Katz SF, Kastenhuber ER, Weissmueller S, Huang C-H, Lechel A, Andersen JB, Capper D, Zender L, Longerich T, Enikolopov G, Lowe SW (2014) p53-dependent Nestin regulation links tumor suppression to cellular plasticity in liver cancer. Cell, 158: 579–592
105. Tsujikawa H, Masugi Y, Yamazaki K, Itano O, Kitagawa Y, Sakamoto M (2016) Immunohistochemical molecular analysis indicates hepatocellular carcinoma subgroups that reflect tumor aggressiveness. Hum Pathol, 50: 24–33
106. Uenishi T, Kubo S, Yamamoto T, Shuto T, Ogawa M, Tanaka H, Tanaka S, Kaneda K, Hirohashi K (2003) Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence. Cancer Science, 94: 851–857
107. Uenishi T, Yamazaki O, Tanaka H, Takemura S, Yamamoto T, Tanaka S, Nishiguchi S, Kubo S (2008) Serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA21-1) as a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. Ann Surg Oncol, 15: 583–589
108. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res, 40: e115
109. Vijgen S, Terris B, Rubbia-Brandt L (2017) Pathology of intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatobiliary Surg Nutr, 6: 22–34
110. Wang A, Wu L, Lin J, Han L, Bian J, Wu Y, Robson SC, Xue L, Ge Y, Sang X, Wang W, Zhao H (2018) Whole-exome sequencing reveals the origin and evolution of hepato-cholangiocarcinoma. Nat Commun, 9: 894
111. Wei M, Lü L, Lin P, Chen Z, Quan Z, Tang Z (2016) Multiple cellular origins and molecular evolution of intrahepatic cholangiocarcinoma. Cancer Lett, 379: 253–261
112. WHO Classification of Tumours Editorial Board (2019) Tumours of the liver and intrahepatic bile ducts. In: World Health Orgnisation (Hrsg.) Digestive system tumours, 5. Aufl., S. 215–263
113. Woo HG, Wang XW, Budhu A, Kim YH, Kwon SM, Tang Z-Y, Sun Z, Harris CC, Thorgeirsson SS (2011) Association of TP53 mutations with stem cell-like gene expression and survival of patients with hepatocellular carcinoma. Gastroenterology, 140: 1063–1070

114. Wright LM, Yong S, Picken MM, Rockey D, Fimmel CJ (2009) Decreased Survival and Hepato-Renal Pathology in Mice with C-Terminally Truncated GP73 (GOLPH2). Int J Clin Exp Pathol, 1: 34–47
115. Wu PC, Fang JW, Lau VK, Lai CL, Lo CK, Lau JY. (1996) Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. Clinical and biological implications. Am J Pathol: 1167–1175
116. Yang X-R, Xu Y, Yu B, Zhou J, Li J-C, Qiu S-J, Shi Y-H, Wang X-Y, Dai Z, Shi G-M, Wu B, Wu L-M, Yang G-H, Zhang B-H, Qin W-X, Fan J (2009) CD24 is a novel predictor for poor prognosis of hepatocellular carcinoma after surgery. Clin Cancer Res, 15: 5518–5527
117. Yang X-R, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu S-J, Shi G-M, Zhang B-H, Wu W-Z, Shi Y-H, Wu B, Yang G-H, Ji Y, Fan J (2010) High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Gut, 59: 953–962
118. Yang YM, Kim SY, Seki E (2019) Inflammation and Liver Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. Semin Liver Dis, 39: 26–42
119. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Marugán JC, Cummins C, Davidson C, Dodiya K, Fatima R, Gall A, Giron CG, Gil L, Grego T, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Martinez JG, Maurel T, McDowall M, McMahon A, Mohanan S, Moore B, Nuhn M, Oheh DN, Parker A, Parton A, Patricio M, Sakthivel MP, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Sycheva M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Vullo A, Walts B, Winterbottom A, Zadissa A, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Hunt SE, IIsley G, Kostadima M, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Morales J, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Trevanion SJ, Cunningham F, Howe KL, Zerbino DR, Flicek P (2020) Ensembl 2020. Nucleic Acids Res, 48: D682-D688
120. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC bioinformatics, 13: 134
121. Yoneda N, Sato Y, Kitao A, Ikeda H, Sawada-Kitamura S, Miyakoshi M, Harada K, Sasaki M, Matsui O, Nakanuma Y (2011) Epidermal growth factor induces

cytokeratin 19 expression accompanied by increased growth abilities in human hepatocellular carcinoma. Lab Invest, 91: 262–272

122. Yoshikawa S, Zen Y, Fujii T, Sato Y, Ohta T, Aoyagi Y, Nakanuma Y (2009) Characterization of CD133+ parenchymal cells in the liver: histology and culture. World J Gastroenterol, 15: 4896–4906
123. Yuan R-H, Jeng Y-M, Hu R-H, Lai P-L, Lee P-H, Cheng C-C, Hsu H-C (2011) Role of p53 and β-catenin mutations in conjunction with CK19 expression on early tumor recurrence and prognosis of hepatocellular carcinoma. J Gastrointest Surg, 15: 321–329
124. Zen C, Zen Y, Mitry RR, Corbeil D, Karbanová J, O'Grady J, Karani J, Kane P, Heaton N, Portmann BC, Quaglia A (2011) Mixed phenotype hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization and liver transplantation. Liver Transpl, 17: 943–954
125. Zender S, Nickeleit I, Wuestefeld T, Sörensen I, Dauch D, Bozko P, El-Khatib M, Geffers R, Bektas H, Manns MP, Gossler A, Wilkens L, Plentz R, Zender L, Malek NP (2013) A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. Cancer Cell, 23: 784–795
126. Zhang H, Yu X, Xu J, Li J, Zhou Y (2019) Combined hepatocellular-cholangiocarcinoma: An analysis of clinicopathological characteristics after surgery. Medicine (Baltimore), 98: e17102
127. Zhan Q, Shen B-Y, Deng X-X, Zhu Z-C, Chen H, Peng C-H, Li H-W (2012) Clinical and pathological analysis of 27 patients with combined hepatocellular-cholangiocarcinoma in an Asian center. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 19: 361–369
128. Zhao Q, Yu W-L, Lu X-Y, Dong H, Gu Y-J, Sheng X, Cong W-M, Wu M-C (2016) Combined hepatocellular and cholangiocarcinoma originating from the same clone. Chin J Cancer, 35: 82
129. Zhou H, Wang H, Zhou D, Wang H, Wang Q, Zou S, Tu Q, Wu M, Hu H (2010) Hepatitis B virus-associated intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma may hold common disease process for carcinogenesis. Eur J Cancer, 46: 1056–1061
130. Zhu AX, Kang Y-K, Yen C-J, Finn RS, Galle PR, Llovet JM, Assenat E, Brandi G, Pracht M, Lim HY, Rau K-M, Motomura K, Ohno I, Merle P, Daniele B, Shin DB, Gerken G, Borg C, Hiriart J-B, Okusaka T, Morimoto M, Hsu Y, Abada PB, Kudo M

(2019) Ramucirumab after sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma and increased α-fetoprotein concentrations (REACH-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet Oncology, 20: 282–296

131. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet JM (2015) Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. Gastroenterology, 149: 1226-1239.e4

Anhang

Sanger-Sequenzierung der CRISPR-Zielsequenzen von TFK-1 und SZ-1 Wildtyp und CK19ko Klonen

TFK-1 Wildtyp

TFK1_Hs_CK19_for_0_cDNA

GCTCGCTCGCMTGMTTCCTACAGCTATCGCCAGTCGTCGGCCCGTCGTCCTTC
GGAGGCCTGGGCGGCGGCTCCGTGCGTTTTGGGCCGGGGGTCGCYTTTCGCGC
GCCCAGCATTCACGGGGGCTCCGGCGGCCGCGGCGTATCCGTGTCCTCCGCCC
GCTTTGTGTCCTCGTCCTCCTA

TFK1_Hs_CK19_rev.seq1_234

GGRGCACGGGWACGCCGCGGCCGCCGGRCCCCCGTGAATGCTGGGCGCGCGA
AARGCGACCCCCGGCCCAAAACGCACGGAGCCGCCGCCCAGGCCTCCGAAGG
ACGACGTGGCCGACGACTGGCGATAGCTGTAGGAAGTCATGGCGAGGCGGAG
CACGGACGGAGCAACCCTGGTCTCAA

TFK-1 CK19ko

TFK1_CK19ko_Hs_CK19_for_0_cDNA

GCTCGCTCGCMTGMTTCCTACAGCTATCGCCAGTCGTCGGCCCGGAGGCCTGG
GCGGCGGCTCCGTGCGTTTTGGGCCGGGGGTCGCTTTTCGCGCGCCCAGCATTC
ACGGGGGCTCCGGCGGCCGCGGCGTATCCGTGTCCTCCGCCCGCTTTGTGTCCT
CGTCCTCCT

TFK1_CK19ko_Hs_CK19_rev.seq1_234

GRGCACGGGWACGCCGCGGCCGCCGGRCCCCCGTGAATGCTGGGCGCGCGAA
AAGCGACCCCCGGCCCAAAACGCACGGAGCCGCCGCCCAGGCCTCCGTGGCC
GACGACTGGCGATAGCTGTAGGAAGTCATGGCGAGGCGGAGCACGGACGGAG
CAACCCTGGTCTCAA

SZ-1 Wildtyp

SZ1_Hs_CK19_for_0_cDNA

GCTCGCTCGCMTGMTTCCTACAGCTATCGCCAGTCGTCGGCCCGTCGTCCTTC
GGAGGCCTGGGCGGCGGCTCCGTGCGTTTTGGGCCGGGGGTCGCYTTTCGCGC
GCCCAGCATTCACGGGGGCTCCGGCGGCCGCGGCGTATCCGTGTCCTCCGCCC
GCTTTGTGTCCTCGTCCTCCTA

SZ1_Hs_CK19_rev.seq1_234

GRGCACGGGWACGCCGCGGCCGCCGGRCCCCCGTGAATGCTGGGCGCGCGAA
ARGCGACCCCCGGCCCAAAACGCACGGAGCCGCCGCCCAGGCCTCCGAAGGA
CGACGTGGCCGACGACTGGCGATAGCTGTAGGAAGTCATGGCGAGGCGGAGC
ACGGACGGAGCAACCCTGGTCTCAA

SZ-1 CK19ko1

SZ1_Hs_CK19ko1_for_0_cDNA

GCTCGCTCGCMTGMTTCCTACAGCTATCGCCAGTCGTCGGCCCGTGTCCTTCG
GAGGCCTGGGCGGCGGCTCCGTGCGTTTTGGGCCGGGGGTCGCTTTTCGCGCG
CCCAGCATTCACGGGGGCTCCGGCGGCCGCGGCGTATCCGTGTCCTCCGCCCG
CTTTGTGTCCTCGTCCTCC

SZ1_Hs_CK19ko1_rev.seq1_234

CCATGGRGCACGGGWACGCCGCGGCCGCCGGRCCCCCGTGAATGCTGGGCGC
GCGAAAAGCGACCCCCGGCCCAAAACGCACGGAGCCGCCGCCCAGGCCTCCG
AAGGACACGTGGCCGACGACTGGCGATAGCTGTAGGAAGTCATGGCGAGGCG
GAGCACGGACGGAGCAACCCTGGTCTCAA

SZ-1 CK19ko2

SZ1_Hs_CK19ko2_for_0_cDNA

GCTCGCTCGCMTGMTTCCTACAGCTATCGCCAGTCGTCGGCCCTTCGGAGGCC
TGGGCGGCGGCTCCGTGCGTTTTGGGCCGGGGGTCGCCTTTCGCGCGCCCAGC
ATTCACGGGGGCTCCGGCGGCCGCGGCGTATCCGTGTCCTCCGCCCGCTTTGTG
TCCTCGTCCTCCTA

SZ1_Hs_CK19ko2_rev.seq1_234

GRGCACGGGWACGCCGCGGCCGCCGGRCCCCCGTGAATGCTGGGCGCGCGAA
AGGCGACCCCCGGCCCAAAACGCACGGAGCCGCCGCCCAGGCCTCCGAAGGG
CCGACGACTGGCGATAGCTGTAGGAAGTCATGGCGAGGCGGAGCACGGACGG
AGCAACCCTGGTCTCAA

Danksagung

Mein größter Dank gilt Dr. André Lechel für die Bereitstellung des Themas, die immerwährende Unterstützung, die sehr gute Betreuung und die stets geöffnete Tür. Allen Mitarbeitern der AG Lechel möchte ich danken für die zahlreichen Ratschläge, die gute methodische Einarbeitung und die vielen vergnüglichen Mittags- und Kaffeepausen. Stellvertretend seien hier Michael Svinarenko, Adem Karahan und Umesh Tharehalli genannt. Ein besonderer Dank gilt Michael Svinarenko für die Bereitstellung von Gewebeproben und Daten.

Für die Begutachtung möchte ich mich bei Prof. Reinhold Schirmbeck und Prof. Uwe Knippschild bedanken.

Ein weiterer Dank geht an die gesamte Abteilung für Innere Medizin I sowie die Arbeitsgruppen molekulare Virologie und CLL (Klinik für Innere Medizin III) der Universität Ulm für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung von Geräten, Materialien und Know-how.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Krebshilfe und dem Doktorandenprogramm ‚Experimentelle Medizin' der Universität Ulm für den Austausch in zahlreichen interessanten Seminaren.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben. Es gab nie einen Moment in meinem Leben, in dem sie mich nicht zu 100 % unterstützt hätten, wofür ich von ganzem Herzen dankbar bin.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem zukünftigen Ehemann Sebastian Rieger bedanken für die Geduld, die aufmunternden Worte und unzählbaren Umarmungen in den schwierigen Phasen der Arbeit.

Curriculum vitae

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.