

Aus dem Zentrum für Molekularbiologie und Tumorforschung  
des Fachbereichs Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

---

**Pankreatische Sternzellen induzieren  
Tumorzellwachstum in verhärtetem Gewebe über AMPK**

---

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Anna Hupfer**

geboren in Neumarkt i.d.Opf.

Marburg (Lahn), 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
10.02.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekanin:	Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner
Referent:	Prof. Dr. Matthias Lauth
1. Korreferent:	Prof. Dr. J.-W Bartsch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>VI</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>VIII</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>3.1 Das Pankreas, seine Funktionen und das <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i> (PDAC)</b> .....	<b>1</b>
3.1.1 Die Epidemiologie von PDAC.....	2
3.1.2 Die Pathogenese von PDAC .....	3
3.1.3 Der modifizierte Metabolismus von PDAC.....	7
3.1.4 Das PDAC-Stroma.....	8
<b>3.2 Von <i>Mechanosensing</i> zum Zell-Metabolismus</b> .....	<b>14</b>
3.2.1 Der metabolische Masterregulator AMPK .....	16
3.2.2 AMPK und ihr Gegenspieler mTOR .....	19
3.2.3 AMPK und der Hh-Signalweg.....	20
3.2.4 Der Prozess der Autophagie .....	21
3.2.5 Funktion und Aufbau von fokalen Adhäsionen (FA) .....	24
3.2.6 Regulierung von YAP/TAZ und MKL1/SRF durch Mechanotransduktion ....	27
3.2.7 Mechanotransduktion im Tumorstroma .....	28
<b>3.3 Der Hedgehog-Signalweg</b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Das Primärzilium als Hh-Signalwandler .....	30
3.3.2 Der kanonische und nicht-kanonische Hh-Signalweg.....	32
3.3.3 Der Hh-Signalweg in Tumoren .....	35
<b>3.4 Projektskizze</b> .....	<b>36</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>37</b>
4.1.1 Geräte.....	37
4.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	40
4.1.3 Chemikalien .....	42
4.1.4 Puffer und Lösungen.....	44
4.1.5 Standards .....	48
4.1.6 Kits.....	48
4.1.7 Plasmide .....	49
4.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme .....	49
4.1.9 Oligonukleotide für Klonierung und Sequenzierung.....	50
4.1.10 Oligonukleotide für qPCR-Analyse .....	51
4.1.11 siRNA .....	52

4.1.12 Antikörper .....	55
4.1.13 Analysesoftware und Datenbanken.....	56
<b>4.2 Methoden .....</b>	<b>57</b>
4.2.1 Zellbiologische Methoden .....	57
4.2.2 Mikrobiologische Methoden .....	63
4.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	66
4.2.4 Immunbiologische Methoden .....	69
4.2.5 Biochemische Methoden.....	71
4.2.6 Xenograft-Experiment .....	72
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 Der Stabilisierungsmechanismus des AMPK-Proteins in Zellen auf festem Untergrund.....</b>	<b>73</b>
5.1.1 Der Härtegrad des Untergrunds hat nur bedingt Einfluss auf den Hh-Signalweg von Fibroblasten.....	75
5.1.2 Die Gewebehärte beeinflusst die AMPK-Proteinexpression .....	80
5.1.3 Das Aktinzytoskelett und mechanosensitive Proteine haben keinen Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression .....	86
5.1.4 Das AMPK-Protein ist in Zellen auf hartem Untergrund stabiler .....	89
5.1.5 Integrin $\alpha V$ und FAK beeinflussen die AMPK-Proteinexpression.....	91
<b>5.2 Lokalisation von AMPK in Fibroblasten .....</b>	<b>98</b>
<b>5.3 Verifizierung des AMPK-Stabilisierungsmechanismus in PDAC-Stromazellen.....</b>	<b>100</b>
5.3.1 Die primären Mausfibroblasten mCAF1 .....	100
5.3.2 Itg $\alpha V$ und FAK beeinflussen die AMPK-Proteinexpression in PSCs.....	102
<b>5.4 Der Härtegrad beeinflusst die Autophagierate der Zelle .....</b>	<b>107</b>
5.4.1 Die Autophagierate ist unter festen Bedingungen erhöht .....	107
5.4.2 Die Autophagie von Stromazellen beeinflusst das Wachstum der Tumorzellen.....	111
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>119</b>
6.1 Der Hh-Signalweg wird nur zu einem geringen Maß von der Gewebehärte beeinflusst .....	119
6.2 Die Stabilisierung von AMPK erfolgt über Itg $\alpha V$ und FAK in Fibroblasten ....	121
6.3 Das Aktinzytoskelett und mechanosensitive Signalwege haben nur bedingt Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression .....	127
6.4 Ein fester Untergrund rekrutiert AMPK an die fokalen Adhäsionen .....	129
6.5 Der AMPK-Stabilisierungsmechanismus findet auch in PDAC-Stromazellen statt.....	130

6.6 Die erhöhte Autophagierate im kanzerogenen Stroma beeinflusst Tumorzellproliferation und Überleben .....	133
6.7 Ausblick und mögliche Therapieansätze .....	136
<b>7. Referenzen .....</b>	<b>139</b>
<b>8. Verzeichnisse .....</b>	<b>178</b>
8.1 Abbildungsverzeichnis.....	178
8.2 Tabellenverzeichnis.....	180
8.3 Abkürzungsverzeichnis.....	181
<b>9. Anhang .....</b>	<b>191</b>
9.1 Ergänzende Abbildungen .....	191
9.2 Lebenslauf.....	195
9.3 Verzeichnis der akademischen Lehre .....	196
9.4 Danksagung .....	197
9.5 Ehrenwörtliche Erklärung .....	198

## 1. Zusammenfassung

In soliden Tumoren, wie etwa dem *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC), ist die Verhärtung des Stromas eine essentielle Barriere gegen die Immunantwort oder den effizienten Einsatz von Chemotherapeutika. Die Aktivierung der im Stroma liegenden Sternzellen durch die pankreatischen Tumorzellen fördert die Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie etwa Kollagen oder Fibronectin. Diese tragen schließlich zu einem Großteil der Verhärtung des Stromas bei. Die Modulation von einer weichen zu einer harten Umgebung hat wiederum Einfluss auf die Sternzellen und Fibroblasten. Eine Proteinanalyse zeigte eine Hochregulierung der AMP-aktivierten Proteinkinase AMPK, einem essentiellen metabolischen Regulator der Energiehomöostase, in Zellen auf hartem Untergrund. Diese Kinase wird unter anderem durch Nährstoffmangel aktiviert und reguliert die anabolischen und katabolischen Prozesse der Zelle zur Regenerierung des Energiehaushaltes. Somit ist sie vor allem in dem hypoxischen, nährstoffarmen Milieu des PDAC von Bedeutung. Sie besitzt dort jedoch nicht nur pro- sondern auch antitumorgene Eigenschaften. Die Proteinanalyse des direkten AMPK-Gegenspielers mTOR, der unter anderem ATP-verbrauchende Prozesse fördert, zeigte keinen Effekt der Untergrundhärte auf die Proteinexpression. Der zugrunde liegende Regulationsmechanismus durch die Untergrundhärte ist demnach spezifisch für AMPK. Die Analyse der Halbwertszeit der AMPK in Zellen auf fester und weicher Matrix zeigte einen schnelleren proteasomalen Abbau des Proteins auf weichem Untergrund. Die Zellen auf einem harten Untergrund dagegen konnten das Protein durch einen Stabilisierungsmechanismus erhalten.

Hierfür musste jedoch die Beschaffenheit der ECM durch die Zellen erkannt und die Information zur AMPK-Regulation in das Zellinnere weitergeleitet werden. Die notwendigen Komplexe waren dabei die an der Zellmembran lokalisierten fokalen Adhäsionen (FA), bestehend aus den transmembranen Integrinen, sowie einer Reihe von Proteinen zur Signalweiterleitung. Die Integrine bestehen in der Regel aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit und sind außerdem in der Lage durch bestimmte ECM-Komponenten aktiviert zu werden. Im Rahmen eines Screenings konnte gezeigt werden, dass speziell die Herunterregulierung der  $\alpha$ V-Untereinheit zu einer Destabilisierung des AMPK-Proteins führte. Dieses Ergebnis konnte auch im Zusammenhang mit der fokalen Adhäsionskinase (FAK) erzielt werden, auch war nach dem Knockdown eine verringerte AMPK-Proteinmenge zu detektieren. Folglich ist der Mechanismus zur Stabilisierung von AMPK in den Sternzellen des PDAC sowohl abhängig von der  $\alpha$ V-Untereinheit der Integrine, als auch von der Kinase FAK.

Das Protein AMPK besitzt als metabolischer Regulator eine Reihe von Funktionen, unter anderem die Aktivierung der Makroautophagie zur Gewinnung von Nährstoffen und Energie. Makroautophagie ist dabei das Verdauen von Proteinen, Proteinkomplexen und Organellen der Zelle bei Nährstoffmangel. Aufgrund der erhöhten Proteinmenge an AMPK in Zellen auf festem Untergrund ist auch die Autophagierate in diesen Zellen erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Autophagierate der Sternzellen einen proliferationsfördernden Effekt auf die PDAC-Tumorzellen besaßen. Der Knockout des *ItgaV*-Gens in Sternzellen dagegen führte zu einer Destabilisierung von AMPK und der wachstumsfördernde Effekt durch die Sternzellen wurde inhibiert. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Der Stabilisierungsmechanismus der AMPK im Tumorstroma ist demnach sowohl für das Wachstum als auch das Überleben der Tumor- und auch Stromazellen von entscheidender Bedeutung. Diese Ergebnisse liefern einen neuen Einblick in die Tumor-Stroma-Interaktion des PDAC und könnten nach weiterführenden Untersuchungen als möglicher Therapieansatz Verwendung finden.

## 2. Summary

In solid tumors the increased rigidity of the stroma is an essential barrier against the immune response and the efficient use of therapeutic drugs. The tumor cells of the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) can activate the stromal stellate cells (PSC) and thus the extracellular matrix (ECM) components like collagen and fibronectin are highly secreted. This excessive secretion leads to an increase in tissue rigidity which in turn influences the stromal PSCs and fibroblasts. Protein analysis showed a significant upregulation of the AMP-kinase (AMPK), a metabolic regulator of energy homeostasis, in cells on a hard surface. AMPK gets activated under starvation and regulates anabolic and catabolic processes for ATP regeneration. It is especially important in the hypoxic, nutrition-deficient environment of PDAC, even though its functions are not only pro- but also antitumorigenic. The antagonist of AMPK, mTOR, regulates the cell metabolism towards processes using ATP. However, a protein expression analysis showed no influence of soft and hard surfaces on the amount of protein. Therefore, the mechanism behind the regulation of protein expression due to different surface rigidities is AMPK-specific. Testing the half-life of AMPK on soft and hard surfaces showed a higher rate of proteasomal degradation in cells on a soft surface. This leads to the conclusion that in cells on a hard surface AMPK gets stabilized.

Therefore, the cells have to sense the ECM composition and transduce this information to regulate the AMPK protein level inside the cell. The essential complexes for mechanosensing are the focal adhesions (FA), comprised of the transmembrane integrins and a variety of proteins for signal transduction. Integrins possess an  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit and can get activated through binding of different ECM components. A screening process revealed the  $\alpha$ V-subunit as a potential regulator of the AMPK on the protein expression. Downregulation of  $\alpha$ V as well as the focal adhesion kinase (FAK) lead to a decrease in AMPK stability. The mechanism behind the increased stability of AMPK on a hard surface is consequently dependent on the focal adhesion proteins *ItgaV* and FAK.

AMPK has a variety of functions inside the cell, one of which is the upregulation of macroautophagy to regain nutrition and therefore energy. Macroautophagy is the digestion of proteins, protein complexes and organelles in so-called autophagosomes under starvation. The increased AMPK protein expression on a hard surface led to a higher rate of autophagy in the cells. The data showed an increase in tumor cell proliferation on a hard surface due to a high level of autophagy in PSCs. In contrast, the knockout of the *ItgaV* gene in PSCs led to a destabilization of AMPK and hence the

proliferative effect on tumor cells was lost. These findings show that the stabilization of AMPK in PSCs was essential for tumor cell proliferation and survival in PDAC. The results also give a new insight in the tumor-stroma interaction of PDAC and after further examination could be used as a potential strategy for cancer therapies.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Das Pankreas, seine Funktionen und das *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC)

Das Pankreas wurde erstmals in Griechenland ca. 300 v. Chr beschrieben; das Wort setzt sich aus den griechischen Wörtern pan = alles und kreas = Fleisch zusammen [50]. Es handelt sich dabei um ein elongiertes, zugespitztes Organ, welches hinter dem Magen lokalisiert ist. Es kann in fünf Strukturen unterteilt werden: Processus Uncinatus, Kopf, Nacken, Körper und Schwanz. Durchzogen wird das Pankreas vom *Ductus pancreaticus*, einer Röhre, die das Pankreassekret enthält. Die übergeordnete Funktion des Pankreas ist die Erhaltung der metabolischen Homöostase. Es besteht dafür aus zwei unterschiedlichen Drüsen, der endokrinen und exokrinen Drüse. Das exokrine Gewebe macht den Großteil des Pankreas aus und wird in Gruppen von Azinuszellen und Duktuszellen unterteilt. Dieser Teil des Gewebes produziert das Pankreassekret, welches vor allem für die Verdauung essentiell ist. Es enthält Enzyme, wie Trypsinogene, Chymotrypsinogene, Lipasen und Amylasen, die bei der Spaltung von Kohlehydraten, Fetten und Proteinen beteiligt sind. Diese Enzyme sind zunächst inaktiv, werden jedoch im Duodenum aktiviert. Der endokrine Teil dagegen ist hauptsächlich im Schwanzbereich lokalisiert und besteht aus den Langerhans-Inseln. Deren Hauptfunktion ist die Regulation des Blutzuckerspiegels durch Produktion und Sekretion von Insulin oder Glukagon [140].

Es sind eine Reihe von Krankheiten bekannt, die im Zusammenhang mit dem Pankreas auftreten können. Dazu gehören beispielsweise morphologische Veränderungen wie Pankreas anulare und Pankreas divisum. Es können Zysten, zystische Fibrosen oder Pseudozysten entstehen sowie eine Entzündung des Pankreas (Pankreatitis) auftreten. Die Pankreatitis kann dabei entweder chronisch oder akut verlaufen, jedoch besitzt vor allem die chronische Pankreatitis ein erhöhtes Risiko der Tumorentwicklung. Zu den gefährlichsten Erkrankungen des Pankreas gehören hingegen die Neoplasien, welche auf unterschiedliche Arten klassifiziert werden können. Hierbei kann man nach Ursprungszellen, enzymatischer Aktivität oder benignem/malignem Potential unterscheiden. Das *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC) ist einer dieser Neoplasien und gehört zu der Untergruppe der primär epithelialen, malignen Neoplasien [28].

### 3.1.1 Die Epidemiologie von PDAC

Pankreaskarzinome können sich sowohl aus den endokrinen als auch den exokrinen Drüsen entwickeln, dabei treten die endokrinen Karzinome relativ selten auf (ca. 5 %). PDAC zählt zu den exokrinen Tumoren, es ist das weitverbreitetste maligne Pankreaskarzinom mit einer Häufigkeit von etwa 85-90 % [348]. PDAC gehörte 2020 zur vierttödlichsten Karzinomart weltweit. Es wird jedoch prognostiziert, dass es bis 2030 hinter dem Lungenkarzinom zur zweittödlichsten Tumorart aufsteigt [348, 383]. PDAC ist vor allem im Kopfbereich des Pankreas lokalisiert und entwickelt sich hauptsächlich aus den Azinuszellen. Der Tumor selbst ist sehr heterogen und reicht von ausdifferenzierten bis zu schwach differenzierten sarkomatoiden Karzinomen [473]. In der Regel dauert es eine Dekade von einer initiierten Mutation bis zur ersten parental/nicht-metastasierenden Gründerzelle und etwa weitere fünf Jahre bis zur Fähigkeit Metastasen zu bilden. Der Tod des Patienten tritt in der Regel zwei Jahre später ein [321, 463]. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt etwa 9 % [348], abhängig vom Tumorstadium, und ist somit die niedrigste aller soliden Tumore. Das Verhältnis zwischen Inzidenz und Mortalität beträgt etwa 94 % [348]. Die hohe Mortalitätsrate ist begründet durch eine späte Diagnose, wenig effektive Screening-Prozesse, ein Mangel an validen Biomarkern und eine wenig effektive Behandlungsverfahren im fortgeschrittenen Tumorstadium [74, 144]. Die Risikofaktoren von PDAC können in modifizierbar und nicht-modifizierbar eingeteilt werden. Nicht-modifizierbare Risikofaktoren sind unter anderem das Geschlecht (Männer erkranken häufiger als Frauen) [42], das Alter (Ältere erkranken häufiger als Jüngere) [348], die Ethnie (schwarze Bevölkerung erkrankt häufiger als die weiße) [464], genetische Faktoren (hereditäre Pankreatitis, Peutz-Jeghers-Syndrom, Lynch-Syndrom) [132], die Familiengeschichte [203], Infektionen (*Helicobacter pylori*) oder die Blutgruppe [356]. Modifizierbare Faktoren dagegen sind Zigaretten/Tabakkonsum [114], Alkoholkonsum im Zusammenhang mit Zigarettenkonsum [345], Fettleibigkeit [93], bestimmte Nahrungsmittel (rotes oder prozessiertes Fleisch) [488] oder berufsbedingte Exposition mit z. B. Nickel [313]. Die Patienten selbst sind häufig asymptomatisch, bis der Tumor in weitere Organe metastasiert ist. Es gibt eine Reihe von unspezifischen Symptomen, die während des Verlaufs auftreten können, wie etwa Ikterus, Gewichtsverlust, blasser Stuhl, Abdominalschmerzen oder Müdigkeit [232]. Für eine Diagnose können unterschiedliche Methoden angewendet werden: abdominelle Ultrasonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie (MRT), endoskopische ultraschallgeführte Feinnadelaspiration und das Messen des Tumorantigens CA 19-9 im Blut [348]. Bei Detektion eines Pankreaskarzinoms wird dieses anhand der TNM-

Klassifikation in verschiedene Stufen eingeteilt. Es gibt dabei fünf Stufen (0-IV) abhängig von der Größe des Haupttumors (T), der Anzahl betroffener Lymphknoten (N) und der Metastasenbildung (M) [429]. Die Stufen teilen sich dabei auf folgende Art und Weise ein:

Stufe 0: Der Tumor befindet sich im oberen Bereich, nicht aber in tieferem Gewebe

Stufe IA: Der Tumor ist < 2 cm (T1), die Lymphknoten sind nicht betroffen (N0) und es gibt keine Metastasen (M0)

Stufe IB: Der Tumor ist ausschließlich im Pankreas aber > 2 cm (T2), die Lymphknoten sind nicht betroffen (N0) und es gibt keine Metastasen (M0)

Stufe IIA: Der Tumor wächst bereits außerhalb des Pankreas, es sind jedoch noch keine Gefäße oder wichtige Nerven betroffen (T3), die Lymphknoten sind nicht betroffen (N0) und es gibt keine Metastasen (M0)

Stufe IIB: Die nahen Lymphknoten sind betroffen (N1), es gibt keine Metastasen (M0)

Stufe III: Der Tumor wächst auch außerhalb des Pankreas und ist in wichtige Gefäße und Nerven eingedrungen (T4), Lymphknoten können betroffen sein (N0-N1), es gibt keine Metastasen (M0)

Stufe IV: Der Tumor hat Metastasen gebildet (M1) [144]

Befindet sich ein Tumor in der letzten Stufe, ist er in der Regel nicht mehr resezierbar, die Standard-Therapiemöglichkeit ist hierbei FOLFIRINOX (Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin) in Kombination mit Gemcitabin [138]. Es gibt eine Reihe von Inhibitoren als mögliche Therapie von nicht-resizierbaren Tumoren, die sich zum Teil noch in der Entwicklung befinden, wie etwa ERBB-Inhibitoren (Afatinib, MCLA-128), TRK-Inhibitoren (Larotrectinib, Entrectinib), ALK/ROS-Inhibitoren (Crizotinib) oder BRAF/MEK-Inhibitoren [385]. Die Standardtherapie für niedrigere Stufen ist ebenfalls eine neoadjuvante Chemotherapie im Zusammenhang mit der Resektion des Tumors [375].

### **3.1.2 Die Pathogenese von PDAC**

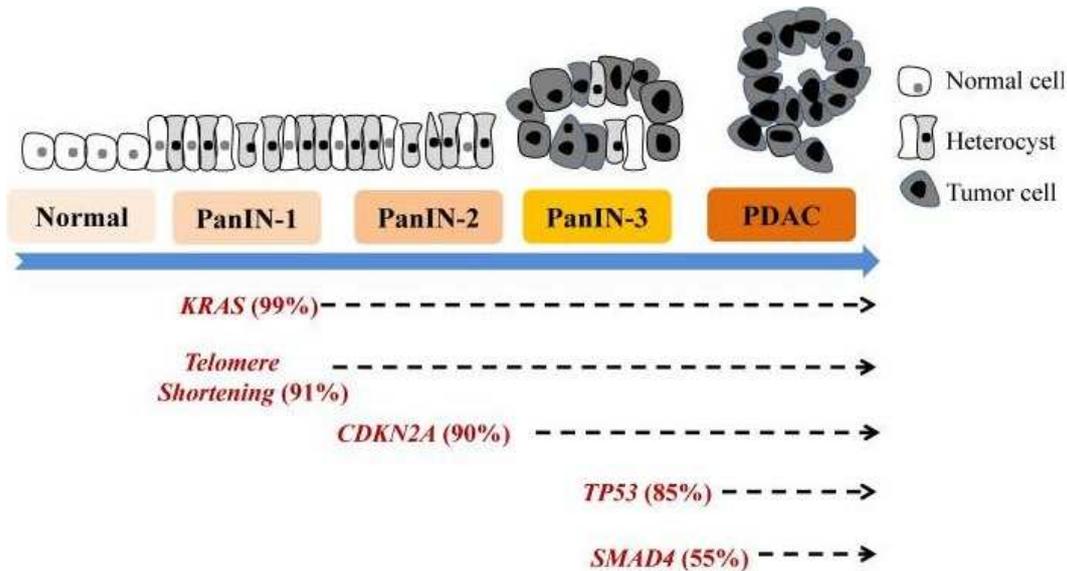
PDAC ist in der Lage sich aus prä-neoplastischen Vorläufer-Läsionen zu entwickeln. Die vier bis heute bekannten sind *pancreatic intraepithelial neoplasia* (PanIN), *intraductal papillary mucinous neoplasm* (IPMN), *mucinous cystic neoplasm* (MCN) und *intraductal tubular papillary neoplasm* (ITPN) [74]. Unter den vier Vorläufern sind die PanINs am besten beschrieben. Sie entwickeln sich in der Regel aus Azinuszellen und kommen

wesentlich häufiger vor als IPMN und MCN. Diese Läsion kann, je nach Grad der zytologischen und architektonischen Veränderung, in drei Stufen eingeteilt werden [386]. Es gibt zwei niedriggradige und eine hochgradige Läsion, wobei die niedriggradigen auch in normalem Pankreas gefunden werden können [9]. Die Abstufungen sind wie folgt:

- PanIN1A/B: flaches/papilläres muzinöses Epithelium, niedriggradige Dysplasie, genetisch stabil
- PanIN2: vermehrte Anzeichen von zellulären Veränderungen (Verlust der Polarität, Zellvergrößerung, Hyperchromasie, genetische Veränderungen)
- PanIN3: hochgradige Läsion, starke nukleäre Veränderungen, luminale Nekrose, hochgradige Dysplasie [222, 386]

PanIN1 und PanIN2 treten normalerweise relativ früh im Leben auf und können Jahre existieren, bevor sie sich in eine hochgradige Läsion verwandeln. Diese Veränderung hängt unter anderem mit bestimmten Schlüsselmutationen zusammen, die während der Karzinogenese entstehen. Niedriggradige PanINs besitzen in der Regel bereits die typische *KRAS*-Mutation sowie Verkürzungen der Telomere (Abb. 1). Die Inaktivierung von *CDKN2A* erfolgt meist erst in einem intermediären Stadium und in PanIN3-Läsionen durch genetische Mutationen oder epigenetische Veränderungen. Es kommt außerdem zu einer Inaktivierung von *TP53* durch genetische Mutation oder Verlust des zweiten Allels sowie zu einer Inaktivierung von *SMAD4*, ebenfalls durch genetische Mutation oder den Verlust beider Allele [146].

Speziell PanIN-Läsionen können durch einen Vorläuferprozess entstehen, dieser trägt den Namen ADM oder *acinar-to-ductal metaplasia*. ADM ist ein Prozess, in dem Azinuszellen eine morphologische Veränderung durchlaufen und sich in Duktus-artige Zellen differenzieren [300]. Dieser Prozess wird durch den *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGF $\alpha$ ) oder einer Reihe von Stresssignalen initiiert. Azinuszellen, welche ADM durchlaufen zeigen einen Anstieg der Expression von Duktusmarkern und eine reduzierte Azinusmarker-Expression. Durch die onkogene Aktivierung von *KRAS* kann sich die Metaplasie nicht zurückbilden und schließlich zu PanINs weiterentwickeln [24, 79]. In gesundem Gewebe hilft der Prozess des ADM dabei Organschäden zu beheben, er ist hierbei jedoch reversibel [300].



**Abbildung 1: Die genetischen Veränderungen während der Entwicklung von PanINs zu PDAC.** Die genetischen Veränderungen während der Karzinogenese können in frühe (*KRAS*, Telomere-Verkürzung), intermediäre (*CDKN2A*) und späte (*TP53*, *SMAD4*) Änderungen eingeteilt werden. Entnommen aus Guo *et al.* [146]

Die zweithäufigste Vorläufer-Läsion des PDAC ist IPMN, die ihren Ursprung im Duktus hat [179]. IPMNs sind die häufigsten zystischen Neoplasien. Nicht-invasive IPMN können anhand des Dysplasie-Grades in gastrisch foveolar, intestinal oder pancreatobiliär eingeteilt werden. Dabei besitzen gastrische ein niedriges, intestinale ein intermediäres und pancreatobiliäres ein hohes Level an Dysplasien. Die intermediären und hochgradigen IPMNs sind dabei meist assoziiert mit PDAC [274]. Die dritte Gruppe der Vorläufer-Läsionen sind die MCNs, die weniger häufig vorkommen als die PanINs oder IPMNs. Sie bestehen aus zwei Komponenten, dem Muzinproduzierenden Epithelium und dem dichten Ovarial-ähnlichen Stroma [466]. Sie variieren im Grad der Dysplasie und können, ähnlich wie IPMN, anhand dessen in drei Gruppen eingeteilt werden: den niedriggradigen, intermediären und hochgradigen MCNs. Im Gegensatz zu den IPMNs ist der *Ductus pancreaticus* nicht erweitert und es gibt keine Kommunikation mit dem duktalem System. Etwa 1/3 der MCNs ist mit invasivem PDAC assoziiert [274].

Die letzte Gruppe der Vorläufer-Läsionen sind die ITPM; sie sind der seltenste Subtyp der epithelialen Neoplasien. Von dieser Gruppe ist nur wenig bekannt. Sie sind intraduktale, Tubulus-formende, epitheliale Neoplasien mit einem hohen Grad an Dysplasie. Im Gegensatz zu IPMN besitzen sie keine Überproduktion an Muzin [121].

PDAC selbst in eine heterogene Tumorart, die in unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden kann. Collison *et al.* definierten anhand von Transkriptionsprofilen zunächst drei Subtypen: klassisch, quasi-mesenchymal und exokrin-artig. [83] Moffitt *et al.* dagegen unterteilten mittels Mikrodissektion den Tumor in zwei Subgruppen: klassisch und basal-artig. [292] Während Bailey *et al.* vier transkriptomische Untergruppen definierten: squamös (*squamous*), pankreatischer Vorläufer (*pancreatic progenitor*), immunogen (*immunogenic*) und *abberantly differentiated endocrine exocrine* (ADEX) [19]. Es gibt jedoch noch weitere Gruppen, wie etwa von Puleo *et al.* [339] oder Law *et al.* [238] beschrieben, die eine Typisierung des Pankreaskarzinoms entweder durch Expressions- oder durch Proteomanalysen durchführten. Es konnte eine Vielzahl von Überschneidungen der unterschiedlichen Subtypen-Klassifizierungen gezeigt werden, wie etwa zwischen dem quasi-mesenchymalen, squamösen und basal-artigen [82]. Eine Studie belegte außerdem, dass die Subtypen immunogen, ADEX oder exokrin-artig vermutlich aufgrund einer Kontamination mit Stroma und nicht-neoplastischen Zellen entstanden [198]. Zum heutigen Zeitpunkt besteht Einigkeit über zwei große Subtypen: dem klassischen/pankreatischen Vorläufer und dem basal-artigen/squamösen [198, 301]. Die Subtypen unterscheiden sich dabei beispielsweise in ihrem Expressionsmuster; der klassische Subtyp exprimiert in einem höheren Maß *EVADR*, *DEANR1* oder *GATA6* [198, 314]. Der basal-artige Subtyp besitzt außerdem eine höhere Anreicherung an *TP53*-Mutationen, während der klassische eine erhöhte Menge an *GNAS*-Mutationen aufweist [198, 421]. Des Weiteren ist die durchschnittliche Überlebensrate bei Patienten, die den klassischen Subtypen aufweisen, deutlich höher als die von Patienten mit einem basal-artigen Subtyp [301, 314].

PDAC besitzt verschiedene Stadien der Progression, von der Vorläufer-Läsion bis zum eigentlichen Karzinom und schließlich zur Bildung von Metastasen. Für die Metastasenbildung ist vor allem der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) entscheidend. EMT ist ein reversibles, zelluläres Programm, welches Epithelzellen in quasi-Mesenchymzellen umwandelt. Innerhalb dieses Prozesses werden Adhärenzverbindungen und *tight-junctions* der Epithelzellen abgebaut, sie verlieren somit ihre Polarität und verwandeln sich in motile, invasive Mesenchymzellen um [101]. Sie verlieren zudem ihre Epithelmarker-Expression und exprimieren mesenchymale Marker wie etwa Vimentin. Der Prozess der EMT wird durch spezifische extrazelluläre Faktoren reguliert wie etwa TGF $\beta$  [8], WNT und NOTCH [236]. EMT ist im PDAC für die Invasion und Metastasierung essentiell sowie für die Evasion von verschiedenen Therapeutika [101]. Typische Metastasen von PDAC treten in der Lunge, der Leber und dem Peritoneum auf [463].

### 3.1.3 Der modifizierte Metabolismus von PDAC

Während der Tumorgenese des PDAC treten eine Reihe von Mutationen in den Tumorzellen auf, die unter anderem den Metabolismus der Zellen modifizieren können. Der Metabolismus einer Zelle ist die Summe aller Prozesse zum Verbrauch oder der Gewinnung von Energie sowie der Synthese von Makromolekülen [94]. Zunächst besitzen die Zellen des Tumors selbst in Anwesenheit von Sauerstoff eine verstärkte Glykolyse und Laktatproduktion, ein Phänomen, das als Warburg-Effekt bezeichnet wird [446]. Die für PDAC typische *KRAS*-Mutation erhöht die Aufnahme von Glukose durch die Regulation der Expression des Glukosetransporters GLUT-1 sowie die Stimulierung des nicht-oxidativen Pentosephosphatwegs [474]. *KRAS* fördert zudem die Verstoffwechslung von Glutamin durch Erhöhung der Expression von Glutamatdehydrogenase (GLUD1) und Aspartattransaminase (GOT1) [389]. Die Mutation von *TP53* kann ebenfalls die Glykolyse fördern sowie Autophagie und Apoptose verhindern. Diese Modifikationen des Metabolismus sichern das Überleben und unterstützen das Wachstum der Tumorzellen [51]. Aufgrund des nährstoffarmen Milieus verwenden PDAC-Tumorzellen zur Aufnahme von Aminosäuren, Proteinen, ECM oder anderen Faktoren im extrazellulären Raum den Prozess der Makropinozytose [210]. Es wird hierbei extrazelluläre Flüssigkeit zusammen mit Partikeln in zytoplasmatischen Vesikeln, den Makropinosomen, aufgenommen. Es folgt eine Fusion mit einem Lysosom der Zelle und der anschließenden Degradation des aufgenommenen Inhaltes [344]. In gesunden Zellen kann dieser Prozess durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden [254], in Tumorzellen jedoch auch durch Mutationen im *KRAS*-Gen [349]. Er ist vor allem für die Aufnahme von Nährstoffen und folglich für das Tumorstadium und Überleben der Tumorzellen essentiell [401]. In den PDAC-Tumorzellen sind zudem Proteine der Lipidsynthese, wie etwa die ATP-Citratlyase (ACLY) überexprimiert, was zusätzlich das Tumorstadium stimuliert [249]. Ebenfalls verändert wird der Prozess der Autophagie, der in Tumorzellen sowohl eine tumorfördernde als auch eine tumorsupprimierende Wirkung besitzt, je nach Tumorstadium. Autophagie ist in der Lage die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentstehung zu minimieren, z. B. durch Einleiten der Zellapoptose. Jedoch ist der Prozess der Autophagie bei fortgeschrittenem Tumorstadium auch wichtig für das Überleben der Tumorzellen unter anderem durch Bereitstellen von Nährstoffen im nährstoffarmen Tumormilieu [307, 382]. Die Progression des Tumors ist daher stark abhängig von der Modifizierung des Metabolismus der Zellen, um das Wachstum auch in dem nährstoffarmen Tumormilieu zu fördern.

### 3.1.4 Das PDAC-Stroma

Das PDAC-Stroma ist eines der Hauptbestandteile des Tumors, da es bis zu 90 % der Masse einnimmt [35]. Die Hauptcharakteristika des Stromas sind extensive Fibrose, wenig Vaskularisierung, Infiltration durch Immunzellen und Hypoxie [434]. Die wesentlichen Komponenten des Stromas sind die ECM, Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs), Immunzellen und eine spezifische Mikrobiom-Signatur [266, 355].

#### 3.1.4.1 Die Tumor-assoziierte Fibroblasten des PDAC

CAFs sind eine heterogene Zellpopulation und können als elongierte Zellen definiert werden, die weder epitheliale, endotheliale oder Leukozytenmarker aufweisen noch Tumorzell-Mutationen besitzen [364]. Der Ursprung dieser Zellen liegt in der Regel bei bereits ansässigen Fibroblasten und Sternzellen, die durch verschiedene Stimuli aktiviert werden können. Die Hauptquelle der CAFs im PDAC-Stroma sind die im gesunden Pankreas liegenden pankreatischen Sternzellen (PSCs). PSCs sind den Fibroblasten ähnlich, unterscheiden sich jedoch in einigen Merkmalen: Sie sind in der Lage, Vitamin A in Lipidtröpfchen zu speichern [441], exprimieren Desmin und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) [13] und können Acetylcholin synthetisieren sowie sekretieren [333]. In einem gesunden Pankreas sind PSCs zumeist inaktiv, ihre Hauptfunktion besteht darin, eine Balance zwischen ECM-Synthese und -Abbau herzustellen, um die normale Architektur des Pankreas zu erhalten. Hierfür sekretieren sie unter anderem Matrix-Metalloproteasen (MMP) zur ECM-Degradation, sowie *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) zur Blockierung der MMP-Aktivität [462]. Während der PDAC-Tumorgenese werden PSCs durch verschiedene Mechanismen aktiviert, wie etwa durch den Einfluss von Risikofaktoren (z. B. Ethanol und seine Metabolite, chronische Inflammation), durch Umweltbelastung (z. B. Hypoperfusion, Hypoxie, oxidativer Stress), zelluläre Sekretionsfaktoren (z. B. Interleukin (IL) 1, IL6, *hypoxia inducible factor* (HIF) 1 $\alpha$ , TGF $\beta$ , CTGF) oder molekulare Signalwege (z. B. Wnt/ $\beta$ -Catenin, PI3K, TGF $\beta$ , Hedgehog (Hh)) [434]. Hierbei werden Zytokine und Wachstumsfaktoren beispielsweise von beschädigten Zellen, Tumorzellen oder Leukozyten sekretiert. Nach Aktivierung verlieren PSCs ihre Lipidtröpfchen und exprimieren in einem hohen Maß ECM-Komponenten, wie etwa Kollagen oder Fibronectin [462]. Werden die PSCs im gesunden Pankreas aktiviert, z. B. durch Beschädigung des Gewebes, gehen sie nach Abschluss der Gewebereparatur in die Apoptose. Während der Entstehung eines Tumors bleiben die PSCs aktiv und bilden

weiter die ECM, was schließlich zu dem typischen fibrotischen Gewebe des PDACs führt. Die aktivierten PSCs besitzen eine hohe Proliferationsrate und sekretieren zudem Zytokine wie etwa IL1, IL6, IL8 und IL10 sowie Wachstumsfaktoren. Sie tragen zudem zur Invasion und Migration der PDAC-Zellen durch Sekretion von *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), *secreted protein acidic and cysteine rich* (SPARC) oder MMPs bei [279]. Sie können außerdem den Prozess der EMT in Tumorzellen fördern und somit die Metastasierung des Tumors beeinflussen [215].

Öhlund *et al.* beschreiben in ihren Arbeiten drei unterschiedliche Subpopulationen von CAFs: iCAFs, myCAFs und apCAFs. iCAFs oder *inflammatory* CAFs besitzen eine geringe  $\alpha$ -smooth muscle actin-(SMA)-Expressionsrate, dafür sekretieren sie Zytokine und Chemokine wie etwa IL6 oder *leukemia inhibitory factor* (LIF). Sie werden als tumorfördernd angesehen, da sowohl LIF als auch IL6 die EMT, die Chemoresistenz und die Immun-Evasion fördern [178, 184, 378]. Dieser Subtyp kann durch die Sekretion parakriner Faktoren durch Tumorzellen induziert werden [312]. Es ist zudem bekannt, dass speziell IL1 und der damit zusammenhängende IL1/JAK/STAT-Signalweg für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich ist [36]. myCAFs oder *myofibroblast-like* CAFs dagegen besitzen ein hohes  $\alpha$ -SMA-Expressionslevel, dafür sekretieren sie kaum Interleukine. Sie gelten als tumorreprimierende CAF-Subgruppe [290, 312]. Aktiviert werden sie durch juxtakrine Interaktionen mit den Tumorzellen, vor allem der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  und sein Signalweg spielen hier eine Rolle [36]. *Antigen-presenting* CAFs (apCAFs) exprimieren MHC-Klasse-II Gene sowie CD74 und besitzen eine immunmodulatorische Funktion, da sie mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen interagieren können [111]. Ein wesentlicher Unterschied, vor allem zwischen iCAF und myCAF, ist deren Lokalisation. iCAFs findet man in der Regel entfernt von den Tumorzellen. Sie interagieren daher durch parakrine Signalwege mit den Tumorzellen, während sich myCAF nahe den Tumorzellen aufhalten und durch juxtakrine Signalwege mit ihnen interagieren. Die Subtypen sind reversibel und können sich je nach Stimulus und Lokalisation ändern [312].

Ein weiterer Unterschied ist die Aktivierung des Hh-Signalwegs. Die Gruppe um Steele *et al.* konnte zeigen, dass die myCAFs eine stärkere Aktivierung dieses Signalwegs besitzen als die iCAFs [396]. Der Hh-Signalweg ist im gesunden Pankreas nicht aktiv, während er bereits in den Vorläuferläsionen sowie im PDAC hochreguliert wird. Er fördert unter anderem die Proliferation und die Tumorgenese [415]. Die Überexpression des *sonic hedgehog*-(SHH)-Liganden in PDAC hat Einfluss auf die Initiation, das Wachstum und das Überleben des Tumors [295]. Die Inhibition des Hh-Signalwegs wird bereits in

vielen Krebstherapien eingesetzt [194], die bekanntesten sind dabei Vismodegib und Erismodegib [231]. Die anti-stromale Therapie ist im Fall von PDAC jedoch umstritten [59, 276]. Dies liegt an der dualen Rolle des Stromas als tumorfördernd und tumorsupprimierend. Der Hh-Signalweg hat dabei auch eine tumorsupprimierende Funktion. Die Inhibition kann zu weniger stark ausgebildetem Stroma führen, was einen aggressiveren Tumor-Phänotypen zur Folge hat [25, 351]. Parallel kann die Inhibition jedoch auch zu einer Reduktion der Proliferationsrate und einem längeren Überleben des Patienten führen [231].

### **3.1.4.2 Die Funktion der extrazelluläre Matrix des PDAC**

Die Funktion der ECM in gesundem Gewebe ist, die Gewebsintegrität aufrecht zu erhalten und die Zellen innerhalb des Stromas strukturell sowie biochemisch zu unterstützen [434]. Die ECM wird konstant remodelliert, was vor allem für die Wundheilung, die Gewebshomöostase und die Entwicklung von entscheidender Bedeutung ist [87]. Da die Stromazellen strukturelle Komponenten und Enzyme zur Modifizierung der ECM sekretieren, ist eine hohe Menge an ECM eines der Schlüsselkennzeichen von PDAC [226]. Eine der Hauptkomponenten ist Kollagen, speziell Kollagen-I und Kollagen-V, die Zelladhäsion, Proliferation und Migration fördern können [14, 30]. Die Wachstumsfaktoren TGF $\beta$  und *epidermal growth factor* (EGF) können die Kollagen-Produktion stimulieren. Der Großteil der desmoplastischen Reaktion ist dem Kollagen geschuldet [434]. Weitere Komponenten der ECM sind die Glykoproteine Laminin und Fibronectin. Laminin trägt dabei zur Zellbindung und Differenzierung bei. Fibronectin kann durch Interaktion mit Integrinen und Kollagenen Adhesion, Migration und Differenzierung induzieren [152]. Beide Komponenten können Apoptose durch Inhibierung der Caspase-Aktivität verhindern, was entscheidend für das Überleben der Tumorzellen ist [430]. Eine weitere Gruppe der ECM-Komponenten sind die Proteoglykane, die Teile der ECM, wie etwa Kollagene, binden und vernetzen. Die Remodellierung der ECM beispielsweise durch das Proteoglykan SPOCK1 trägt auch zu einer höheren Invasionsrate des Tumors bei [433]. Die letzte Hauptkomponente der ECM ist die Hyaluronsäure, ein Glykosaminglykan. Sie ist durch Interaktion mit den Rezeptoren CD44 und *receptor for hyaluronan mediated motility* (RHAMM) in die Zelladhäsion, Migration, Invasion, das Überleben und die Proliferation der Tumorzellen involviert [2]. Aufgrund der hohen Menge an ECM wird das Stroma fester, dies hat unterschiedliche Effekte auf Signalwege, die Tumorzellen und das Stroma selbst. Die verstärkte Menge an ECM kann die Gewebepolarität reduzieren, Adhärenzverbindungen

zerstören und schlussendlich zu einer erhöhten Tumorzell-Proliferation führen. Es wurde außerdem bewiesen, dass eine erhöhte Festigkeit das Invasionspotential und somit die Metastasenbildung des PDAC erhöht [308]. Die erhöhte Festigkeit hat außerdem einen erhöhten intratumoralen und interstitiellen Druck zur Folge, der als entscheidende Barriere für Arzneimittel fungieren kann. Die Zuführung der Arzneimittel zum Tumor ist abhängig vom Blutfluss, der Arzneimittelstruktur oder der Porengröße der Blutgefäße. Ein erhöhter Druck hat einen negativen Einfluss auf den Blutfluss und somit auch auf die Wirksamkeit von Therapien [178, 371].

### **3.1.4.3 Die Vaskularisierung des PDAC-Stromas**

Die Vaskularisierung im PDAC ist aufgrund der Modulationen der Vaskulatur und dem hohen interstitiellen Druck schlecht ausgeprägt. Bei der Bildung der Blutgefäße, der Angiogenese, sind vor allem Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hypoxie die Schlüsselkomponenten [228, 434]. Im PDAC-Stroma werden viele pro- und antiangiogene Faktoren produziert. Zellen wie etwa PSCs oder Tumorzellen reagieren auf Hypoxie, indem sie Faktoren sekretieren, die Einfluss auf die Angiogenese haben. PSCs produzieren in der Regel mehr pro-angiogene Faktoren, während Tumorzellen eher anti-angiogene Faktoren sekretieren [265]. Das juxtatumorale Stroma ist hypovaskularisiert, da die dort liegenden Tumorzellen zum großen Teil antiangiogene Faktoren sekretieren, im pan-Stroma findet sich dagegen eine höhere Dichte an Blutgefäßen [98]. Geringe Vaskularisierung führt zu weniger Sauerstoff und Nährstoffen im Stroma, was metabolischen Stress zur Folge hat. Daher müssen die Tumorzellen ihren Metabolismus anpassen. Wie bereits beschrieben, ändern die Tumorzellen ihren Metabolismus in Richtung Laktatproduktion (Warburg-Effekt). Sie sind allerdings in der Lage, diesen auch in den umgebenden Stromazellen zu induzieren (reverser Warburg-Effekt). Dies hat zur Folge, dass die CAFs Nährstoffe sekretieren, die Tumorzellen für ihre Proliferation benötigen [328]. Der Nährstofftransfer kann dabei über extrazelluläre Vesikel (EVs) erfolgen. Die EVs der CAFs können Aminosäuren, Laktat, Acetat, Lipide oder Intermediate des Zitratzyklus enthalten, welche die Tumorzellen für ihren Metabolismus benötigen [5, 483]. Ein Beispiel hierfür ist die Sekretion der Aminosäure Alanin durch die Stromazellen. Die Tumorzellen sind dabei in der Lage, die Autophagie der CAFs zu stimulieren und somit die Sekretion von nicht-essentiellen Aminosäuren wie etwa Alanin zu fördern. Alanin wird anschließend von den Tumorzellen mittels Makropinozytose aufgenommen und für verschiedene Stoffwechselwege, wie etwa den Zitratzyklus oder die Lipidbiosynthese verwendet [393]. Der Sauerstoffmangel durch

schlechte Vaskularisierung führt zu einer hypoxischen Umgebung, der die Tumorzellen durch Expression der HIFs entgegenwirken [86]. Diese Faktoren können Zellproliferation, Invasion und Migration fördern [479, 485]. Sie induzieren die Expression von Laktatdehydrogenase (LDH) zur Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse [267] und supprimieren die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS), die schädlich für Tumorzellen sein können [434]. Die schlechte Vaskularisierung selbst inhibiert zudem die Effektivität von Therapeutika, da diese nur schwer zu den Tumorzellen gelangen können [205].

#### **3.1.4.4 Die Immunzellen innerhalb des PDAC**

Innerhalb des Tumor-Stromas befinden sich eine Reihe unterschiedlicher Immunzellen. Dazu gehören Makrophagen, Neutrophile und Lymphozyten. Diese Immunzellen werden in ihrer Funktion stark durch die pro- und antitumoralen Faktoren, sekretiert von den Zellen des Stromas sowie den Tumorzellen, beeinflusst [434]. Makrophagen kommen als unterschiedliche Subtypen vor: M1-Makrophagen können die adaptive Immunantwort steuern und somit den Organismus gegen Pathogene, apoptotische oder neoplastische Zellen verteidigen. M2-Makrophagen dagegen sind an Reparaturmechanismen bei Wundheilung oder Fibrosen sowie an der Entzündungshemmung beteiligt [271, 476]. Dieser Makrophagen-Subtyp besitzt eine tumorfördernde Eigenschaft und sein Phänotyp ähnelt den *tumor-associated macrophages* (TAM). TAMs stellen die häufigste Art der Immunzellen in PDAC dar und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [233]. TAMs sind in der Lage, Metastasen durch Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu fördern sowie Angiogenese zu induzieren und das Immunsystem zu supprimieren [434]. Neutrophile dagegen spielen eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort. Die Neutrophilen der Tumoren werden als *tumor-associated neutrophils* (TAN) bezeichnet und können durch komplexe Tumor-Stroma-Wechselwirkungen immunsupprimierende Funktionen des Tumormikromilieus induzieren oder überwinden. Es existieren zwei Arten der TANs: N1-TANs sind antitumoral und meistens im frühen Stadium vorhanden, während N2-TANs protumoral sind und eher im späten Stadium der Tumorgenese auftreten [119, 434]. Die dritte Gruppe der Immunzellen sind die Lymphozyten, welche in der Regel das adaptive Immunsystem regulieren. Lymphozyten, die das Stroma infiltrieren, werden als *tumor-infiltrated lymphocytes* (TIL) bezeichnet. Ähnlich den beiden anderen Immunzell-Gruppen gibt es auch von ihnen verschiedene Untergruppen: T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen agieren antitumoral und werden durch Tumorzellen inhibiert, Th2

und regulatorische T-Zellen (Treg) dagegen besitzen protumorale, immunsupprimierende Wirkungen. Tregs treten primär im Juxtastroma auf und helfen dabei das Immunsystem zu umgehen. Die Differenzierung von TILs in Tregs wird unter anderem durch aktive PSCs initiiert [434]. Aufgrund des exzessiven Stromas und der damit verbundenen Verhärtung ist die Zugänglichkeit der Immunzellen zu den Tumorzellen selbst erschwert [262]. Es gibt bereits einige Studien, die durch Kombination von Immuntherapeutika und anti-stromalen Therapien eine Reduktion des Tumolvolumens gezeigt haben [209, 269].

#### **3.1.4.5 Die Mikrobiom-Signatur des PDAC**

Das PDAC-Stroma besitzt außerdem eine einzigartige Mikrobiom-Signatur. Die Bakterien und Pilze innerhalb des Tumors können sowohl tumorfördernd als auch tumorsupprimierend wirken. Der Vergleich der Mikrobiome von Patienten zeigte deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Überlebenszeit. Bei Langzeit-Überlebenden bestand eine höhere Bakteriendiversität, wobei *Sachharopolyspora*, *Pseudoxanthomonas* und *Streptomyces* am häufigsten gefunden wurden. Die genaue Rolle der Bakterien bei der Verbesserung der Überlebenszeit ist jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Die Vermutung liegt nahe, dass dies mit der Aktivierung des Immunsystems, vor allem der CD8<sup>+</sup>-Zellen zusammenhängt [355]. Es gibt bereits einige Therapien (*Immune-Checkpoint*-Inhibitoren), die das Mikrobiom und die durch das Mikrobiom vermittelte Aktivierung des Immunsystems für eine erfolgreiche Wirksamkeit benötigen [193, 448]. Die Interaktion des Mikrobioms mit dem Immunsystem kann aber auch zur Förderung der Tumorgenese führen. Das Mikrobiom ist in der Lage, die Inflammation innerhalb der Tumorumgebung zu modulieren, was zur Suppression der angeborenen und adaptiven Immunantwort führen kann [340]. Es gibt zudem auch Bakterien, wie etwa das Gammaproteobakterium, welche in der Lage sind, das PDAC-Standardmedikament Gemcitabin metabolisch zu inaktivieren [127]. Die Progression des PDAC wird daher nicht nur von den Zellen des Stromas, sondern auch von der Zusammensetzung der Bakterien und Pilze innerhalb des Pankreas bestimmt.

### 3.2 Von *Mechanosensing* zum Zell-Metabolismus

Die Zellen eines Organismus können auf verschiedenste Stimuli reagieren und sich anpassen. Diese Stimuli können sowohl innerhalb der Zelle als auch durch Nachbarzellen oder der ECM abgegeben werden. Der Prozess der Mechanotransduktion beschreibt dabei die Aufnahme der Stimuli von außerhalb über mechanosensitive Strukturen, die anschließende Signalweiterleitung in das Zellinnere und die damit verbundene Reprogrammierung von Signalwegen [200]. Einer dieser Stimuli ist die Veränderung der Gewebehärte durch exzessive ECM, wie es bei Tumoren oder Fibrosen häufig der Fall ist. Die mechanische Veränderung kann auf unterschiedliche Art und Weise wahrgenommen werden, z. B. durch Modifikation der Ionen-Kanäle [103], durch sekretierte Faktoren [169] oder durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie FAs und *adherens junctions* [360]. Die FAs wurden erstmals in den 1970ern beschrieben und sind ein Zusammenschluss von Proteinen an der Zellmembran, die die ECM mit dem Inneren der Zelle verbinden und daher Signale effektiv weiterleiten können [91, 202, 225]. Es gibt eine Reihe von Zellmembranrezeptoren der FAs, die häufigsten sind dabei die Gruppe der Integrine [164]. Viele Signalwege werden durch Veränderung der ECM reguliert, der mechanische Stimulus wird dabei in biochemische Signale umgewandelt. Einige Beispiele sind etwa die Inhibition der Bindung des Aktin-depolymerisierenden Faktors Cofilin und somit dessen Aktivität [160], Neuorganisation von Myosin-II und somit Bildung von Stressfasern [343] oder verstärkte Phosphorylierung durch die Src-Kinasefamilie [367]. Auch in der Stammzellendifferenzierung spielt die Härte der Umgebung eine essentielle Rolle. Mesenchymale Stammzellen können durch lösliche Faktoren aber auch durch die Beschaffenheit der Umgebung in unterschiedliche Zelltypen differenzieren. Beispielsweise dient eine weichere Umgebung eher der Spezifizierung zu Neuronen, während eine härteres Mikromilieu die Stammzellen in Richtung von Myoblasten oder Osteoblasten differenzieren lässt [113]. Eine höhere Menge an Kollagen im Gewebe spricht für eine höhere Mikroelastizität. Eine geringere Mikroelastizität besitzt beispielsweise das Hirngewebe, da es nur wenig Kollagen aufweist. Eine hohe Mikroelastizität dagegen besitzt das Knochengewebe, mit einer großen Menge an Kollagen. Die meisten Arten des Körpergewebes liegen dazwischen, wie etwa Fett-, Muskel- oder Lungengewebe [388]. Damit stehen vor allem das Aktinzytoskelett und Myosin-II im Zusammenhang, deren Knockout zu einem Verlust der Mechanosensitivität der Zelle führt [49, 388]. Ein Effekt von mechanischen Stimuli auf Zellen ist unter anderem die Deformation des Kerns [268]. Es gibt verschiedene Komplexe, die an der Signaltransduktion von den Integrinen zum Kern beteiligt sind. Der bekannteste ist der

*linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton*-(LINK)-Komplex, der physikalische Stimuli zwischen dem Zytoskelett und dem Nucleoskelett transferiert, was schließlich zu einer Veränderung der Form des Nucleus führen kann [6, 145]. Ein weiterer Modulator des Nucleus ist durch die Aktin-Myosin-Strukturen der Stressfasern repräsentiert. Elongierte Zellen üben durch das Aktin-Myosin-Skelett eine größere Spannung aus und ändern somit auch die Form des Zellkerns [435]. Die Deformation des Kerns ist jedoch immer abhängig vom Zytoskelett der Zellen und findet unter anderem bei der Elongation oder Abflachung der Zelle, durch Engstellung in der ECM, die z. B. bei Metastasenbildung passiert werden müssen, durch Myofibrill-Kontraktion der Muskelfasern oder während des Zellzyklus statt [204].

Die Mechanotransduktion ist auch für Endothelzellen von essentieller Bedeutung. Es gibt unterschiedliche mechanische Stimuli die Endothelzellen wahrnehmen und transduzieren können, wie etwa das Dehnen der Gefäße oder der Blutfluss. Ein laminarer Fluss führt beispielsweise zu Stressfaserbildung, geringere Proliferation und Ausrichtung der Endothelzellen in Flussrichtung, während ein gestörter Fluss den NF- $\kappa$ B Signalweg aktiviert, die *intercellular adhesion molecule*-(ICAM)-1-Expression erhöht und die Endothelzellen in verstärktem Maße proliferieren lässt [134, 315]. Für die Umwandlung der mechanischen Stimuli in biochemische Signale exprimieren die Zellen eine Reihe von Mechanosensoren. Zu ihnen zählt das Primärzilium, welches den Blutfluss erkennt und zur Stimulierung des  $Ca^{2+}$ -Signalwegs sowie zur Produktion von Stickoxiden führen kann [305, 428]. Ebenso vollziehen auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) durch mechanische Stimuli eine Konformationsänderung [61]. Ionenkanäle selbst können zudem mechanische Änderung der Gefäße oder des Blutflusses aufnehmen und darüber aktiviert werden, zu ihnen zählen die  $Ca^{2+}$ - und  $K^{+}$ -Kanäle oder auch die Kationenkanäle Piezo1 und Piezo2 [10, 134, 248]. Mechanische Stimuli induzieren eine Reihe von Zellantworten in den Endothelzellen, unter anderem die Aktivierung eines Proteinkomplexes bestehend aus *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM1), VE-Cadherin und VEGFR2 [84, 134]. Deren Aktivierung induziert Signalwege zu denen ERK [316], NF- $\kappa$ B und AKT zählen [118, 426].

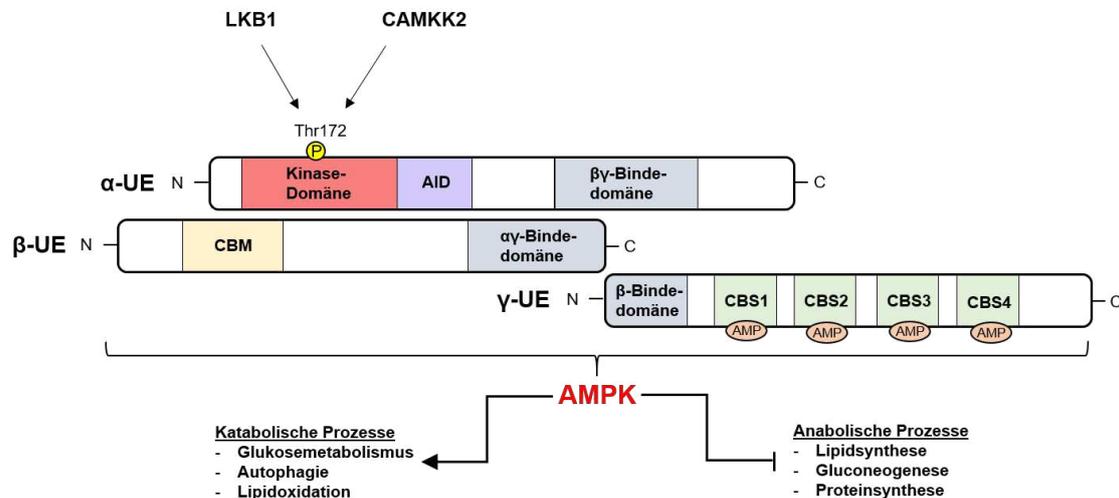
Die Veränderung der ECM-Zusammensetzung und der damit verbundene mechanische Stimulus auf die Zelle hat zudem Einfluss auf Teile des Zell-Metabolismus. Der Metabolismus kann durch eine Reihe von Signalen reguliert werden; dazu gehören Hormone und andere extrazelluläre Faktoren, metabolische Enzyme und Transporter, Wachstumsfaktoren sowie auch die weniger untersuchten extrazellulären, mechanischen Stimuli [281, 360]. Eine Veränderung der ECM führt beispielsweise zu

einer Veränderung des Glukose-Metabolismus. Eine feste Umgebung inhibiert die Degradation der Phosphofruktokinase (PFK), einer Schlüsselkinase der Glykolyse und erhöht folglich den Abbau von Glukose. Eine weiche Umgebung dagegen führt zu einer Degradation der PFK und damit zu einer geringeren Glykolyse-Aktivität [323]. Außerdem kann auch die Lipid-Biosynthese durch die Beschaffenheit der ECM beeinflusst werden. Eine Veränderung des Aktinmyosin-Zytoskeletts aufgrund mechanischer Stimuli führt zu einer Inhibition von Lipin-1 und folglich zu einer Aktivierung von *sterol regulatory element-binding protein*-(SREBP)-Transkriptionsfaktoren, welche die Lipidsynthese regulieren [359]. Es wurde zudem bereits publiziert, dass eine erhöhte ECM-Festigkeit zu einer verstärkten Translokation von Kindlin-2 führt und demzufolge zu einer verstärkten Prolin-Synthese und Zellproliferation [147]. Signalwege, die bekanntermaßen durch Zelldichte und Umgebungsfestigkeit reguliert werden, wie etwa *Yes-associated protein* (YAP)/*transcriptional coactivator with PDZ-binding motif* (TAZ) oder *myocardin related transcription factor A* (MKL1)/*serum response factor* (SRF), haben ebenfalls Einfluss auf den Metabolismus der Zellen [360]. Dies spielt vor allem in der Tumorgenese eine essentielle Rolle, da die Veränderung der mechanischen Beschaffenheit der ECM den Metabolismus sowohl in den Tumor- als auch den Stromazellen verändert. So fördert die Sekretion von Aspartat durch CAFs die Tumorzellproliferation, während die Sekretion von Glutamat durch Tumorzellen das Remodellieren der ECM durch CAFs reguliert. Diese Sekretion von Aminosäuren wird durch die Beschaffenheit des Stromas induziert [34]. Es werden demzufolge eine Reihe metabolischer Signalwege von äußeren Stimuli beeinflusst. Der Metabolismus der Zelle selbst besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, Organellen und Signalwegen, einer der Masterregulatoren ist dabei die AMP-aktivierte Proteinkinase AMPK.

### 3.2.1 Der metabolische Masterregulator AMPK

Der Energiebedarf der Zellen steht unter einer strengen Regulation, da es essentiell für das Überleben der Zellen ist, eine Balance zwischen Energiegewinnung und -verbrauch herzustellen. Einer der wichtigsten Regulatoren dieser Energiehomöostase ist AMPK. Diese Serin/Threonin-Kinase wurde zunächst als Protein zur Regulation der Aktivität der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) entdeckt [58]. Das Protein ist ein Heterotrimer und besteht aus einer katalytischen ( $\alpha$ -Untereinheit) und zwei regulatorischen Untereinheiten ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit) (Abb. 2). In Vertebraten können diese Untereinheiten (UE) in unterschiedlichen Isoformen auftreten ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3) und sind beliebig kombinierbar [362, 394, 418]. Die  $\alpha$ -UE besitzt eine Kinase-Domäne sowie das zur

Aktivierung notwendige Threonin-(Thr)-172. Die  $\beta$ -UE dagegen besitzt das Kohlenhydrat-Bindemodul, welches die Bindung von AMPK mit Glykogen erlaubt [167, 187]. Die  $\gamma$ -UE ist entscheidend für die AMPK-Aktivität, da es vier Cystathionin- $\beta$ -Synthase-Domänen zur Bindung von AMP enthält [456].



**Abbildung 2: Die Struktur der AMP-Kinase.** Das AMPK-Protein besteht aus drei Untereinheiten. Die  $\alpha$ -UE besitzt eine Kinasedomäne mit der Thr172-Phosphorylierungsstelle, die autoinhibitorische Domäne (AID) und die  $\beta\gamma$ -Bindedomäne. Die  $\beta$ -UE besteht aus einem Kohlenhydrat-Bindemodul (CBM) und einer  $\alpha\gamma$ -Bindedomäne. Die  $\gamma$ -UE besteht aus einer  $\beta$ -Bindedomäne und vier Cystathionin- $\beta$ -Synthase-Domänen zur Bindung von AMP. Die Aktivierung der AMPK kann über LKB1 oder CAMKK2 durch Phosphorylierung des Thr172 erfolgen. Die Funktionen der Kinase sind die Inhibition anabolischer Prozesse und die Stimulierung katabolischer Prozesse. Erstellt nach Herzig *et al.* [167].

AMPK gilt als Sensor des Verhältnisses von AMP zu ATP in den Zellen und die Bindung von AMP kann die Aktivität der AMPK verstärken. Diese Verstärkung erfolgt unter anderem durch Stimulierung der Thr172-Phosphorylierung [159], durch den Schutz der Thr172-Phosphorylierung nach AMP-Bindung [1] und durch allosterische Aktivierung [139]. Die Phosphorylierung von Thr172 an der  $\alpha$ -UE ist essentiell für die Aktivierung und kann auf unterschiedliche Art erfolgen. Die für einen Großteil der Aktivierung unter Energiestress verantwortliche Kinase ist der Tumorsuppressor *Liver Kinase B1* (LKB1) [451]. LKB1 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die ubiquitär exprimiert wird und erstmals im Zusammenhang mit dem Peutz-Jeghers-Syndrom publiziert wurde [206]. Sie ist nicht nur in der Regulation von AMPK, sondern auch an weiteren metabolischen Signalwegen sowie an der Kontrolle des Zellwachstums und der Zellpolarität involviert. Eine Mutation oder Fehlregulation des LKB1-Signalwegs ist typisch in einigen Tumorarten, wie etwa dem Zervixkarzinom [449] und dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom [131]. Eine weitere Möglichkeit der AMPK-Aktivierung ist durch die *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase* (CAMKK) gegeben. Diese Kinase wird durch eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert und kann AMPK am Thr172 phosphorylieren

und somit aktivieren [167]. Es gibt zwei Isoformen dieser Kinase,  $\alpha$  und  $\beta$ , es wurde jedoch bereits publiziert, dass CAMKK $\beta$ /CAMKK2 die entscheidende Rolle bei AMPK-Aktivierung spielt [158]. Diese Art der Aktivierung erfolgt beispielsweise nach Ablösen der Zellen von ihrer Matrix [406], bei Hypoxie [298] oder bei Aminosäuremangel [133].

Die Funktionen von AMPK sind vielseitig und dienen dem Ziel der Inhibition anabolischer, Energie-verbrauchender Prozesse und der Stimulierung katabolischer, Energie-herstellender Prozesse [167]. AMPK inhibiert die Lipid- und Sterolsynthese durch Phosphorylierung und somit Inaktivierung der ACC und der HMG-CoA Reduktase (HMGCR). Während der Fettsäurebiosynthese katalysiert ACC die Carboxylierung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA unter Verwendung von ATP [442] und gehört somit zu den anabolischen Prozessen. Zudem verhindert AMPK die Synthese von Glykogen durch die inhibitorische Phosphorylierung der Glykogen-Synthasen GYS1 und GYS2 [48]. Diese Inaktivierung führt zu einem Wechsel von der ATP-verbrauchenden Glykogensynthese zur Glykolyse. AMPK kann zudem Stoffwechselwege durch transkriptionelle Inhibition beteiligter Proteine regulieren, wie etwa die Glukoneogenese [283, 377]. Neben den inhibitorischen Funktionen besitzt AMPK auch aktivierende Funktionen speziell auf katabolische Prozesse, wie etwa den Abbau von Makromolekülen zur Energiegewinnung über den Prozess der Autophagie [167]. Die Kinase stimuliert zudem die Aufnahme und Nutzung von Glukose durch Phosphorylierung und anschließender Degradation von Proteinen die einen negativen Einfluss auf den Glukosetransport besitzen [66, 455]. Zusätzlich fördert AMPK die Glykolyse durch Phosphorylierung des Glykolyse-limitierenden Proteins *6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase 3* (PFKFB3) [20, 167]. Neben dem Einfluss auf den Glukosehaushalt reguliert AMPK zudem die Lipidspeicherung unter anderem durch aktivierende Phosphorylierung von *adipose triglyceride lipase* (ATGL/Desnutrin), welche die Lipolyse erhöht und Fettsäuren freisetzt [4]. Neben den katabolischen und anabolischen Signalwegen reguliert AMPK Signalwege, die am Zellwachstum beteiligt sind; zu ihnen gehören der Hippo-Signalweg [291], der Hh-Signalweg [252], der p53-Tumor-Suppressor-Signalweg [208] sowie der JAK/STAT-Signalweg [363].

AMPK hat weiterhin einen wichtigen Einfluss auf die Mitochondrien, etwa auf deren Biogenese. Mitochondrien werden für die aerobe ATP-Gewinnung benötigt. Bei einem niedrigen ATP-Level wachsen und teilen sich bereits existierende Mitochondrien für einen ATP-Ausgleich. Die Aktivierung von AMPK führt zu einer erhöhten Mitochondrien-Biogenese, zum einen über die Aktivierung von *nuclear respiratory factor-1* (NRF-1),

einem Faktor, der unter anderem die Transkription von mitochondrialen Proteinen reguliert [31], zum anderen über die Regulierung von *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α* (PGC1α), der als Masterregulator der Mitochondrien-Biogenese gilt [257]. Eine *gain-of-function*-Mutation in der AMPKγ-UE ist in der Lage, die Expressionsrate von PGC1α drastisch zu erhöhen [126]. Zusätzlich gibt es einige indirekte Mechanismen, über die AMPK PGC1α regulieren kann, wie etwa p38-MAPK, Histon Deacetylase-(HDAC)-5 oder *silent mating type information regulation 2 homolog* (SIRT1) [167]. Die Mitochondrien sind dynamisch und können sich sowohl teilen also auch miteinander fusionieren. Die Morphologie der Mitochondrien hat Einfluss auf deren Funktion, wie etwa die Produktion von ATP unter Energiemangel [420]. Diese Dynamik wird unter anderem durch AMPK reguliert, das *mitochondrial fission factor* (MFF) phosphorylieren kann, dem Rezeptor von *dynamamin-related protein 1* (DRP1), welches die Teilung der Mitochondrien steuert [422]. Aufgrund der Beteiligung von AMPK an einer hohen Zahl metabolischer Signalwege kann das Protein in vielen Krankheiten, wie etwa Diabetes, Fettleibigkeit, kardiometabolische Krankheiten oder Krebs, fehlerhaft reguliert sein [468].

### 3.2.2 AMPK und ihr Gegenspieler mTOR

Eines der wichtigsten Gegenspieler der AMPK ist das Protein *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Während AMPK anabolische Prozesse inhibiert, fördert mTOR diese [167]. mTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase aus der Familie der *phosphatidylinositol kinase-related kinases* (PIKK) [214] und bildet eine Untereinheit von zwei unterschiedlichen Proteinkomplexen mTORC1 und mTORC2 [263]. Die Hauptkomponenten von mTORC1 sind hierbei mTOR, *regulatory protein associated with mTOR* (RAPTOR) und *mammalian lethal with Sec13 protein 8* (mLST8), während mTORC2 ebenfalls aus mTOR und mLST8 besteht, aber statt RAPTOR die Untereinheit *rapamycin insensitive companion of mTOR* (RICTOR) besitzt [137]. Der Komplex mTORC1 wird in der Regel durch Aminosäuren in Kombination mit Wachstumsfaktoren aktiviert. Die Verfügbarkeit von Aminosäuren wird durch RAG-GTPasen erfasst, was zu einer Bindung an mTORC1 führt und dessen Translokation zum Lysosom fördert [23]. Bei Aminosäuremangel bleibt der RAG-Heterodimer in seiner inaktiven Form und ist somit nicht in der Lage, die Relokalisation von mTORC1 zu stimulieren. Es rekrutiert außerdem *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), ein negativer Regulator des mTORC1, zu den Lysosomen [95]. Neben der Lokalisation des mTORC1-Komplexes an die Lysosomen wird durch Wachstumsfaktoren das lysosomale G-Protein *RAS homolog*

*enriched in brain* (RHEB) aktiviert, welches schließlich für eine vollständige Aktivierung des mTORC1 sorgt [264].

Die Funktion des mTORC1 im Kontrast zu AMPK besteht in der Stimulierung von anabolischen Prozessen, wie etwa die ribosomale Biogenese oder die Protein-/Lipid-/Nukleotid-Synthese für das Zellwachstum, und in der Inhibition von katabolischen Prozessen, wie der Autophagie [29]. Der mTORC1-Komplex stimuliert speziell die Synthese von Proteinen des schnellen Zellwachstums durch Phosphorylierung von zwei entscheidenden Komponenten der mRNA-Translation: Die p70S6-Kinase 1 (S6K1) und das eIF4E-Bindeprotein (4EBP) [137]. Dieser Prozess verbraucht etwa 20 % der Gesamtenergie der Zelle und gehört somit zu den energiereichsten Prozessen [52]. Zudem stimuliert mTORC1 die Lipidsynthese durch Aktivierung des *sterol regulatory element binding protein*-(SREBP)-Transkriptionsfaktors [107]. mTORC2 dagegen reguliert die Neuordnung des Zytoskeletts, die Proliferation sowie das Überleben der Zellen durch die aktivierende Phosphorylierung von Mitgliedern der AGC-Kinase-Familie, wie etwa Proteinkinasen B und C (PKB, PKC) oder der *Serum/glucocorticoid-regulated kinase* (SGK) [92, 137]. Für die Zelle ist es entscheidend bei Energiemangel die anabolischen Prozesse zu blockieren, was unter anderem über die Inhibition des mTORC1-Komplexes durch AMPK erfolgt. Es sind zwei unterschiedliche Mechanismen dieser Inhibition bekannt: Die Phosphorylierung des RAPTOR-Komplexes am Serin-(Ser)-722 und Ser792 [149] sowie die aktivierende Phosphorylierung des TSC2 am Thr1271 und Ser1387 [197]. Der Einfluss von mTORC1 auf AMPK ist noch weitestgehend ungelöst. Ling *et al.* postulieren eine Herunterregulierung des AMPK-Signalwegs durch Phosphorylierung von mTORC1 an Ser347/Ser345, wodurch die aktivierende Phosphorylierung der AMPK am Thr172 reduziert wird [258]. Weitere direkte Regulationen sind nicht bekannt, AMPK kann jedoch indirekt durch die Wachstumsfaktoren der mTORC1-Aktivierung herunterreguliert werden, wie etwa durch Insulin-aktivierende Proteine [175].

### **3.2.3 AMPK und der Hh-Signalweg**

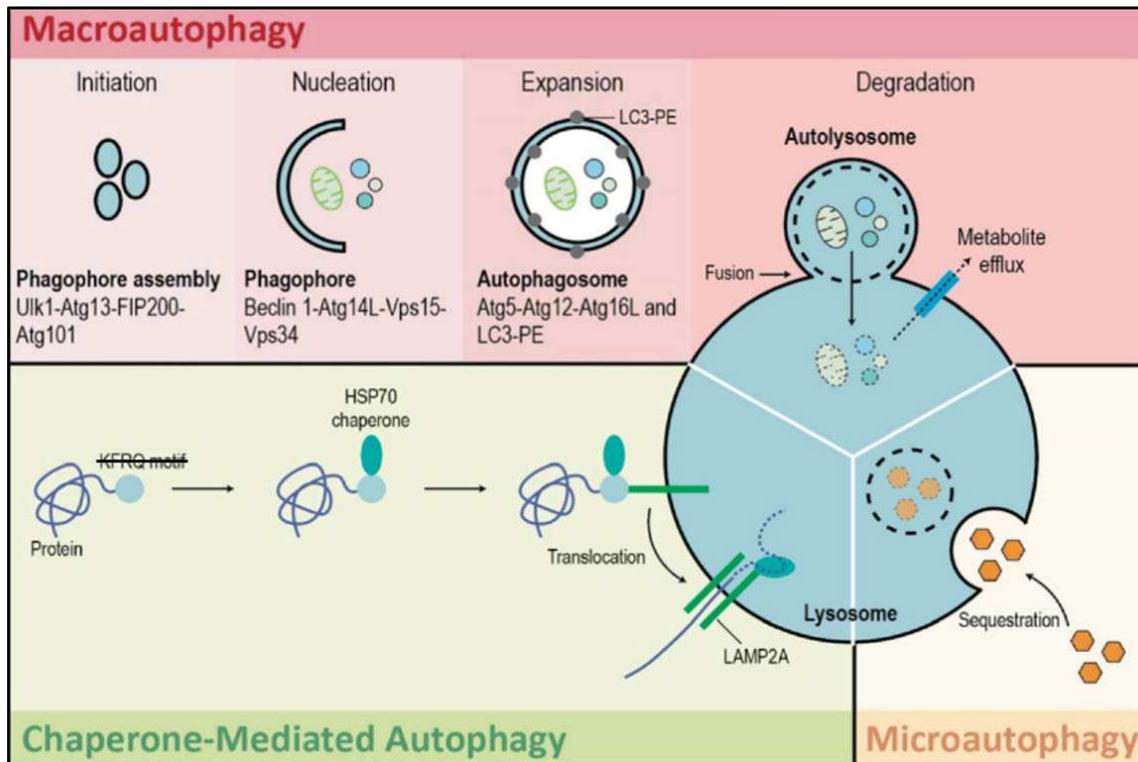
Der Hh-Signalweg ist entscheidend für die embryonale Entwicklung sowie die Regulation der Energiereserven. Es gibt mehrere Komponenten, die den Hh-Signalweg mit dem Metabolismus der Zelle verbinden. Zum einen kann der Zellmetabolismus den Hh-Signalweg regulieren, der Hh-Signalweg selbst ist jedoch auch ein Regulator des Metabolismus. In der Leber reguliert er Prozesse wie etwa die Entgiftung oder den

Energiemetabolismus und hat somit auch Einfluss auf die Verdauung [414]. Der kanonische Hh-Signalweg kann die Glykolyse in Lebersternzellen (HSCs) fördern [72], reguliert die *insulin-like growth factor 1*-(IGF-1)-Homöostase [275] und reprogrammiert die Stromazellen über die Tumorzellen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) zur Induktion des Warburg-Effekts [63, 328]. Im Pankreas kann der Hh-Signalweg die Insulintranskription und -sekretion regulieren [417]. In Muskeln und adipösem Gewebe ist der Hh-Signalweg in der Lage, die Adipogenese in weißen Adipozyten-Vorläuferzellen zu inhibieren [403] sowie die Myogenese zur Regeneration von Muskelzellen zu aktivieren [402]. Der Signalweg ist zudem in der Lage, den Energiemetabolismus über eine nicht-kanonische Aktivierung von AMPK über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und somit der Aktivierung von CAMKK2 zu regulieren [414]. Im Gegensatz dazu kann AMPK *glioma-associated oncogene homolog-(GLI)-1* an Ser408 phosphorylieren und damit sowohl die Stabilität des Proteins als auch dessen transkriptionelle Aktivität reduzieren [252]. Zusätzlich kann AMPK die Translokation von GLI1 in den Nukleus inhibieren und seine Interaktion mit der E3-Ubiquitin-Ligase *beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase* ( $\beta$ -TrCP) und somit den Abbau des Proteins fördern [480]. Diese inhibitorischen Funktionen der AMPK auf den Hh-Signalweg wurden jedoch ausschließlich in Tumoren, wie etwa dem Medulloblastoma oder dem HCC nachgewiesen [99, 460].

### 3.2.4 Der Prozess der Autophagie

Zur Energiegewinnung während Nährstoffarmut wird neben anderen katabolischen Prozessen auch die Autophagierate durch AMPK erhöht. Autophagie ist ein Prozess, in dem Makromoleküle, Proteine und auch Organellen von der Zelle selbst verdaut werden und der somit als Lieferant für Nährstoffe und Energie fungiert. Die Zellen besitzen ein Basallevel an Autophagie, um eine Balance zwischen Recycling und Metabolismus aufrecht zu erhalten. Dieses Basallevel kann aber z. B. durch Nährstoffarmut, oxidativen Stress, Hypoxie oder mikrobielle Infektionen erhöht werden [347]. Man unterscheidet zwischen Mikroautophagie, Chaperone-induzierter Autophagie (CMA) und Makroautophagie (Abb. 3). Mikroautophagie ist die direkte Aufnahme von Proteinen und Organellen in das Lysosom [250]. Chaperone-induzierte Autophagie wird durch *heat shock protein*-(HSP)-70 initiiert. Es erkennt eine bestimmte Aminosäuresequenz (KFERQ) in Proteinen und transportiert diese zum Lysosom [75, 136]. Diese Art der Autophagie ist hochspezifisch und ausschließlich Proteine mit der Zielsequenz können damit abgebaut werden.

Der Prozess der Makroautophagie, im Folgenden als Autophagie bezeichnet, ist im Gegensatz zu den anderen Autophagieformen komplexer. Er besteht aus der Bildung von Autophagosomen, Fusion zu Autolysosomen und schließlich Degradation. Viele Details der Formierung der Autophagosomen ist noch unklar, es wurde jedoch bereits gezeigt, dass die konservierte Gruppe der *autophagy-related*-(ATG)-Proteine eine essentielle Rolle spielen [278]. Die Initiierung der Formierung vom Vorläufer des Autophagosoms, der *pre-autophagosomal structure* (PAS), findet in vielen Fällen am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Dort akkumulieren *Unc-51 like autophagy activating kinase*-(ULK)-Komplexe, die wiederum den *class III phosphatidylinositol 3-phosphate*-(PI(3)P)-kinase-Komplex und weitere ATG-Proteine rekrutieren [201]. Der PI(3)P-Komplex besteht unter anderem aus Phosphatidylinositol-3 Kinase (VPS34) und Beclin-1, deren Aktivierung vor allem für die Vesikel-Nukleation essentiell ist [15]. Es gibt Hinweise, dass für die Entstehung der Doppelmembran der Autophagosomen unter anderem die ATG9-Vesikel [212] sowie die COPII-Komplexe [381] beteiligt sind. Das Protein *light chain*-(LC)-3 ist wichtig für die Membrandynamik und Elongation des Autophagosoms und wird zunächst als Vorläuferprotein, pro-LC3, synthetisiert, um anschließend durch die Cystein-Protease ATG4 am C-Terminus in die LC3-I Form gespalten zu werden [409]. Es folgt eine Lipidierung des LC3-I in seine LC3-II Form unter anderem durch ATG16L, welches schließlich an die Membran des reifenden Autophagosoms binden kann [123]. Die Autophagosomen schließen ihre Membran mithilfe des *endosomal sorting complex required for transport*-(ESCRT)-Komplexes [408], was mit einer morphologischen Veränderung von einer elliptischen zu einer sphärischen Form einhergeht. Nach Elongation und Reifung des Autophagosoms wird dieses zum Lysosom transportiert, wo es zum Autophagolysosom fusioniert. Dieser Prozess ist ähnlich komplex wie die Bildung des Autophagosoms und eine Reihe von Proteinen ist beteiligt. Einige der essentiellen Proteine sind dabei die GTPase RAB7, der *homotypic fusion and protein sorting*-(HOPS)-Komplex und *pleckstrin homology domain containing protein family member 1* (PLEKHM1). Die Fusion findet dabei durch Interaktion von PLEKHM1 mit RAB7, dem HOPS-Komplex sowie dem LC3 der Autophagosomen statt. Lediglich LC3-positive Autophagosomen sind in der Lage, mit Lysosomen zu fusionieren [277]. Abschließend folgt die Degradation des Inhalts und somit der Gewinnung von Nährstoffen und Energie für die Zellen.



**Abbildung 3: Die unterschiedlichen Varianten der Autophagie.** Innerhalb der Zelle kann zwischen drei Formen der Autophagie unterschieden werden. Bei der Mikroautophagie werden Proteine direkt in das Lysosom internalisiert und abgebaut. Bei der Chaperon-induzierten Autophagie werden nur Proteine mit einer spezifischen Sequenz (KFERQ) durch HSP70 zum Lysosom transportiert und abgebaut. Bei der Makroautophagie werden Proteine und Organelle durch die Bildung eines Autophagosoms zum Lysosom transportiert. Die darauffolgende Verschmelzung zu einem Autolysosom führt schließlich zum Abbau. Entnommen aus Ho *et al.* [174]

AMPK ist für die Autophagie in unterschiedlicher Art und Weise von Bedeutung. Zunächst inhibiert AMPK seinen Gegenspieler mTORC1; dies führt schließlich zu einer Blockierung der inhibitorischen Phosphorylierung des Proteins ULK1 durch mTORC1, welche essentiell für die Induktion der Autophagie ist [62]. mTORC1 besitzt zudem eine inhibitorische Wirkung auf weitere Proteine der Autophagie, wie etwa ATG14L [324] und ATG13 [338], welche ebenfalls durch mTOR-Inhibierung über AMPK aktiviert werden. AMPK kann ULK1 auch direkt aktivieren, indem es dieses an Ser467, Ser555, Thr574 und Ser637 phosphoryliert [217]. AMPK hat außerdem Einfluss auf weitere wichtige Proteine der Autophagie, wie etwa ATG9 [447], VPS34 [216], Beclin-1 [478] und *receptor for activated C kinase 1* (RACK1) [487]. Neben der Regulierung der Autophagie auf Proteinebene, besitzt AMPK auch indirekten Einfluss auf der Transkriptionsebene. Es ist in der Lage, Mitglieder der Forkhead-Box-O-(FOXO)-Familie von Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren, welche unter anderem für die Expression von Autophagie-relevanten Genen verantwortlich sind [142].

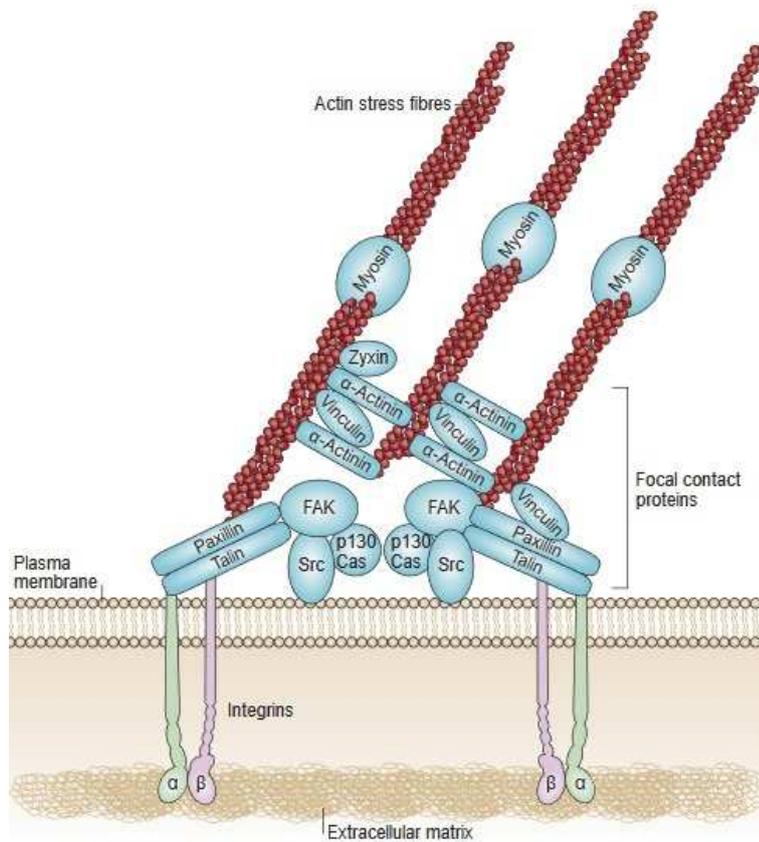
Der Prozess der Autophagie ist nicht nur in normalem Gewebe von Bedeutung, er spielt auch in verschiedenen Tumorarten, neurodegenerativen Erkrankungen und in Entzündungserkrankungen eine essentielle Rolle [77]. In Tumoren kann Autophagie zum einen als Überlebensmechanismus unter nährstoffarmen Bedingungen fungieren, aber auch den Zelltod einleiten und hat somit gegensätzliche Auswirkungen. Das Autophagie-fördernde Protein Beclin-1 beispielsweise gilt als Inhibitor der Tumorgenese in Brustkrebs [253]. In Tumoren sind bereits eine Reihe von Mutationen in Autophagie-relevanten Proteinen bekannt [289]. Es konnte jeweils eine Mutation, die eine Leserasterverschiebung verursacht, in *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9B* und *ATG12* im Kolorektal- und Magenkrebs entdeckt werden [211].

### 3.2.5 Funktion und Aufbau von fokalen Adhäsionen (FA)

Es gibt eine Reihe von Signalwegen, die durch eine Veränderung der ECM reguliert werden. Um solche extrazellulären Signale aufnehmen zu können, besitzen Zellen verschiedene mechanosensitive Rezeptoren innerhalb ihrer Membran, wie etwa Proteoglykane (CD44, Syndecane) oder Glykoproteine (CD36, Integrine) [164]. Die Hauptrezeptoren der Mechanotransduktion sind dabei die Integrine, heterodimere Transmembranproteine, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -UE. In Säugetieren gibt es insgesamt 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -UE, die zu 24 verschiedenen Integrinen kombiniert werden können und somit unterschiedliche Teile der ECM erkennen [191]. Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -UE besitzt eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne sowie einen kurzen zytoplasmatisch lokalisierten Teil. Es gibt dabei zwei Arten der  $\alpha$ -UE, diejenigen mit einer *inserted* oder auch  $\alpha$ I-Domäne und die ohne  $\alpha$ I-Domäne [243]. Dieser Bereich der UE ist entscheidend für die Ligandenbindung [112]. Untereinheiten, die eine  $\alpha$ I-Domäne besitzen, binden den Liganden dort, während UE ohne  $\alpha$ I-Domäne den Liganden am Kopfteil, der Verbindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -UE binden [55]. Zur Regulierung der Ligandenaffinität kommen Integrine in verschiedenen Formen vor: *bent closed* (BC), *extended closed* (EC) und *extended opened* (EO). In ihrer BC-Form befinden sich die extrazellulären Domänen der UE in starkem Kontakt und bilden ein nach unten gebeugtes V; in dieser Form besitzt das Integrin eine geringe Affinität [459]. Kommt es zu einer Konformationsänderung, verändert sich der Winkel der „Beinregion“ der Integrine von gebeugt zu ausgestreckt. Die *ligand-binding metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS) in der  $\beta$ I-UE reorganisiert sich und die Integrine besitzen eine intermediäre Ligandenaffinität. Die Bewegung der  $\beta$ I-UE mit dem Kopfteil der  $\alpha$ -UE

verstärkt die Ligendenaffinität um ein Vielfaches und wechselt die Konformation in die EO-Form [457].

Nach der Bindung der Liganden werden eine Reihe von Proteinen an den zytoplasmatischen Teil der Integrine rekrutiert, unter anderem Kindlin, Talin und Vinkulin, die sowohl für die Integrin-Aktivierung als auch für die Vernetzung zum Aktinzytoskelett verantwortlich sind (Abb. 4). Dies erfolgt während der Bildung der zunächst relativ kurzlebigen *nascent adhesions* (NA) im Lamellipodium [16]. Auch die fokale Adhäsionskinase FAK spielt in den NAs eine entscheidende Rolle, sie ist verantwortlich für die Aktindynamik durch Verstärkung der durch den *actin related protein*-(ARP)-2/3-Komplex gesteuerten Aktinpolymerisierung [374]. Während viele der NAs schnell abgebaut werden, können einige zu größeren FA reifen. Dieser Prozess ist Myosin-II abhängig und involviert unter anderem  $\alpha$ -Actinin für Aktin-Bündelung und Vernetzung [78]. Der zytoplasmatische Teil der Integrine selbst besitzt keine Aktin-Bindestellen und ist daher auf Proteine wie Talin oder Vinkulin angewiesen, um eine Verbindung zwischen der ECM und dem Aktinzytoskelett herzustellen. Diese Proteine bilden den *molecular clutch*, in dem Talin sowohl Integrin als auch das Aktinzytoskelett bindet und durch Vinkulin verstärkt wird. Weiter Proteine wie etwa Kindlin oder  $\alpha$ -Actinin sind ebenfalls Teile des *clutch*. Auf festem Untergrund wird die Talin-Bindung durch Vinkulin verstärkt. Dies geschieht nicht auf weichem Untergrund, so dass die übermittelte Kraft gering ist [110, 405]. Dieser *molecular clutch* ist ein Teil des sogenannten Integrin-Adhäsoms, welches aus hunderten von Proteinen zusammengesetzt ist. Es wird davon ausgegangen, dass die Interaktion der Proteine innerhalb des Adhäsoms zum einen für die mechanischen Eigenschaften und die Struktur der Zelle verantwortlich ist und zum anderen für die Signalaktivität. Diese besteht in dem Erfassen von mechanischen und chemischen Signalen außerhalb der Zelle und einer entsprechenden Reaktion innerhalb der Zelle durch Aktivierung von Signalwegen zur Regulation der Zelldynamik, des Zellverhaltens oder der Zellstruktur [450].



**Abbildung 4: Der Aufbau von fokalen Adhäsionen.** FAs bestehen in der Regel aus der  $\alpha$  und  $\beta$ -UE der transmembranen Integrine. Diese interagieren nach ihrer Aktivierung durch Bindung von ECM-Komponenten mit einer Reihe von Proteinen. Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise Talin, Vinculin und  $\alpha$ -Actinin zur Polymerisierung und Vernetzung von F-Aktin, sowie FAK, Src und auch Paxillin als Adaptormoleküle und Singalwandler. Entnommen aus von Mitra *et al.* [288].

Eine der ersten untersuchten Komponenten des Integrin-Signalwegs ist FAK. FAK ist eine nichtrezeptor-Tyrosinkinase, die in den meisten Zelltypen exprimiert wird und hauptsächlich an den FA lokalisiert ist (Abb. 4). Ihre Funktion kann in Kinase-abhängig und Kinase-unabhängig eingeteilt werden. Die Kinase-unabhängigen Funktionen werden als Stressantwort aktiviert. FAK akkumuliert im Nukleus und kann die Degradation von p53 durch Interaktion mit der Ubiquitinligase *murine double minute-2* (Mdm2) initiieren. Dies führt zu einer verbesserten Proliferation und dem Überleben der Zellen unter Stressbedingungen [255]. Die Kinase-abhängigen Funktionen finden zu einem großen Teil an den FAs statt. Der N-Terminus von FAK ist in der Lage, an der  $\beta$ -UE des Integrins zu binden [368]. Die Integrin-Verbindung führt zu einer Dimerisierung der FAK-Proteine und einer anschließenden Autophosphorylierung am Tyrosin-(Tyr)-397 [41]. Durch die Autophosphorylierung folgt einer Rekrutierung der Src-Kinase, die wiederum weitere Phosphorylierung an Tyrosinen wie etwa 407, 576 und 577 des FAK

durchführt. [53] FAK selbst spielt beispielsweise bei der Motilität und Migration von Zellen eine Rolle, es agiert hier im Zusammenhang mit Talin und den Integrin-Komplexen [239]. Es ist außerdem in die Wundheilung und die pathologische Fibrose einiger Gewebe involviert [229]. Die Kinase besitzt auch essentielle Funktionen bei der Invasion von Tumorzellen und ist in vielen Tumorarten wie etwa im Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom oder Kolonkarzinom überexprimiert [157, 390]. Zudem gibt es neben FAK auch eine Änderung der exprimierten Integrin-UE in onkogenetisch transformierten Zellen, was schließlich nachgeschaltete Signalwege moduliert und somit die Progression der Neoplasie fördert [336]. Diese Änderung wird unter anderem durch onkogene Signalwege induziert, wie etwa der durch KRAS stimulierte MEK-ERK Signalweg [452]. Ähnlich der FAK besitzen einige Integrine eine tumorfördernde Wirkung, wie etwa die  $\beta$ 1- [117, 282] oder  $\beta$ 4-UE [475].

### **3.2.6 Regulierung von YAP/TAZ und MKL1/SRF durch Mechanotransduktion**

Es gibt eine Reihe von Proteinen und Signalwegen, die über die Zelldichte und ECM-Zusammensetzung reguliert werden können. Zwei hiervon sind die transkriptionellen Koregulatoren YAP und TAZ, welche vor allem für Zellproliferation, Überleben und Migration wichtig sind [280]. Sie können die Transkription von Zielgenen im Zusammenhang mit den DNA-bindenden TEAD/TEF-Transkriptionsfaktoren aktivieren [432]. Einer der wesentlichen negativen Regulatoren der YAP/TAZ-Aktivität ist der Hippo-Signalweg. Hierbei sind vor allem zwei Kinasen entscheidend, *macrophage stimulating 1/2* (MST1/2) und *large tumor suppressor kinase 1/2* (LATS1/2). MST1/2 stimuliert hierbei die Kinaseaktivität von LATS1/2, welche letzten Endes YAP und TAZ phosphoryliert und somit inhibiert [280]. Eine der wichtigsten Eigenschaften dieser Regulatoren ist die Lokalisation aus dem Zytoplasma in den Nukleus nach Aktivierung [320]. Diese Relokalisation kann durch eine Reihe von mechanischen Stimuli ausgelöst werden, unter anderem durch die Verhärtung der Umgebung/ECM, eine breite Fläche zum Anhaften der Zellen [106] oder geringe Zelldichte [481]. Das Erfassen dieser Stimuli und somit der Aktivierung von YAP/TAZ kann unter anderem durch Integrin-Adhäsionen initiiert werden, was unter anderem über den FAK–Src–PI3K erfolgt [219]. Es ist jedoch noch unklar, ob YAP hierfür an den FA lokalisiert oder nicht [109].

Ein weiterer Signalweg, der vor allem durch Veränderungen des Aktinzytoskelett beeinflusst wird, ist der MKL1/SRF-Signalweg. Ähnlich den Transkriptionsfaktoren YAP

und TAZ ist auch die Lokalisation des MKL1 innerhalb der Zelle wichtig für dessen Funktion. Unter normalen Bedingungen ist MKL1 im Zytoplasma an G-Aktin gebunden. Durch mechanische Stimuli, wie etwa die Verhärtung des Gewebes, polymerisiert das Aktin und MKL1 kann dabei seine Bindung zu G-Aktin lösen [173]. Nach der Befreiung des MKL1 wird das *nuclear localization signal* (NLS), welches in der Aktinbindedomäne lokalisiert ist zugänglich [171]. MKL1 akkumuliert daraufhin verstärkt im Nukleus und kann dort als Koaktivator des SRF die Expression von Zielgenen regulieren [286]. Diese sind unter anderem Aktin, Vinculin und SRF selbst [431]. Beide Signalwege, YAP/TAZ und MKL1/SRF, können daher über den Prozess der Mechanotransduktion mit einer Aktivierung nach Verhärtung der ECM in Verbindung gebracht werden.

### **3.2.7 Mechanotransduktion im Tumorstroma**

Die Veränderung des Stromas während der Tumorgenese ist ein entscheidender Prozess vor allem bei soliden Tumoren wie etwa dem Pankreas- oder dem Lungenkarzinom. Das Vernetzen und die damit einhergehende Verhärtung der ECM unter anderem durch CAFs hat eine große Auswirkung auf die Zellen des Tumors und des Stromas. Eine feste Umgebung reguliert die Phosphorylierung von FAK, die Aktivität von MAPKs und Rho-GTPasen, sowie die Aktivierung der Integrine [373]. Die Kollagenvernetzung fördert zudem FAs und Mechanorezeption in Stromazellen, was mit einer erhöhten Integrin-Signalübertragung einhergeht [245]. Es wurde bereits gezeigt, dass die ECM im Zusammenhang mit vielen Schlüsselkennzeichen von Tumoren steht. Durch eine verstärkte Aktivierung des Integrin-Signalwegs werden beispielsweise der ERK- und PI3K/AKT-Signalweg stimuliert, was eine erhöhte Proliferation, eine Regulation der Zellapoptose sowie die Förderung der EMT zur Folge hat [244, 334, 341]. Eine verstärkte Mechanorezeption supprimiert zudem die Proteine p21 und p53 und erleichtert somit die Zellzyklusprogression [220]. Die Festigkeit der ECM fördert außerdem die Bildung von Invadopodien in Tumorzellen. Diese Zellprotrusionen werden mithilfe von FAs und Integrinen gebildet und stimulieren die Invasion und Metastasenbildung des Tumors [322]. Die Zusammensetzung des Stromas besitzt zudem Einfluss auf das Immunsystem, speziell die Makrophagen. Eine feste ECM fördert die Differenzierung zu M2-Makrophagen, die bekanntermaßen tumorfördernd sind [327]. Der Prozess der Mechanotransduktion ist somit in Tumoren essentiell und für viele Bereiche der Tumorprogression notwendig.

### 3.3 Der Hedgehog-Signalweg

Der Hh-Signalweg ist evolutionär konserviert und reguliert unter anderem die Gewebsmusterung in der Embryogenese sowie die Regenerierung und Homöostase von Geweben in adulten Organismen [387]. Er wurde erstmals von den beiden Forschern Nüsslein-Volhardt und Wieschaus in *Drosophila melanogaster* entdeckt. Sie konnten eine Veränderung der Segmentierung von *Drosophila*-Larven nach Mutation im *hedgehog*-(*hh*)-Genlokus nachweisen [310]. Diese Mutation führt zu dem typischen, stacheligen Phänotyp der Larve und somit auch zu dem Namen, *hedgehog*. In Säugetieren sind drei Homologe des *hh*-Liganden von *Drosophila* zu finden: Indian Hedgehog (*IHH*), Desert Hedgehog (*DHH*) und Sonic Hedgehog (*SHH*) [108, 270].

DHH ist dabei am wenigsten untersucht und nur in bestimmten Geweben anzutreffen. Es besitzt eine essentielle Funktion in der Spermatogenese von Säugetieren, unter anderem in der Keimzell-Proliferation [39]. Es ist außerdem an der Regulation der Aktivierung von Endothelzellen sowie der Integrität von deren Verbindungen (*junctions*) in adulten Säugetieren beteiligt. [56, 64]. In der Embryonalentwicklung spielt es im Zusammenhang mit den Primärzilien in der Remodellierung der Herzklappen eine Rolle [124]. IHH ist ebenfalls nur in bestimmten Geweben anzutreffen, wobei frühe Expressionsstudien zwei wesentliche IHH-Lokationen zeigten: Das Endoderm des Darms und das Knorpelgewebe [38]. IHH ist dabei vor allem essentiell in der Skelett-Morphogenese, speziell in der Reifung von Chondrozyten [398]. Im Gegensatz zu IHH und DHH ist die Expression von SHH weiterverbreitet und dessen Funktionen in der Embryogenese sind vielfältiger. Es ist unter anderem an der Links-Rechts Asymmetrie [247], der Zahnentwicklung [154], der Morphogenese von Haarfollikeln [397] und der Ausbildung des zentralen Nervensystems [108, 358] beteiligt.

Der Hh-Signalweg besitzt auch in adulten Organismen wichtige Funktionen. Er wird beispielsweise bei der Wundheilung induziert, da ein aktiver Signalweg die Proliferation der Zellen fördert [240]. Die Aktivierung des Signalwegs ist außerdem in einigen Organen, wie etwa dem Gastrointestinaltrakt [427], dem Pankreas [116] oder der Lunge [330] zur Regeneration notwendig.

### 3.3.1 Das Primärzilium als Hh-Signalwandler

Das Primärzilium ist eine 1-10 µm lange, zelluläre Antenne, die auf den meisten eukaryotischen Zellen zu finden ist und als Sensor und Signalwandler fungiert [44]. Es handelt sich dabei um eine Zellprotrusion, die aus einem Mikrotubuligerüst, dem Axonem, verknüpft mit einem Basalkörper besteht. Im Gegensatz zu anderen Zilienarten besitzt jede Zelle nur ein Primärzilium, welches unbeweglich und über Mikrotubuli mit dem Inneren der Zelle verbunden ist. Das Axonem der motilen Zilien besteht aus neun symmetrisch angeordneten Mikrotubulipaaren, die jeweils aus einem vollständigen und einem unvollständigen Mikrotubulus zusammengesetzt sind [199]. Diese Mikrotubulipaare umgeben zwei zentrale Mikrotubuli, die 9 + 2 Konfiguration, und enthalten für ihre Motilität innere und äußere Dyneinarme. Das Primärzilium dagegen besitzt eine 9 + 0 Konfiguration, es besitzt ebenfalls die neun äußeren Mikrotubulipaare, jedoch keine zentralen Mikrotubuli und ebenso wenig Dyneinarme für die Mobilität [366]. Die Zilienmembran selbst ist eine Erweiterung der Plasmamembran mit einer hohen Konzentration an Transmembranrezeptoren und -proteinen für die Signalweiterleitung [183].

Die Entstehung des Ziliums, die Ziliogenese, ist die Synthese zilienrelevanter Proteine und Strukturen sowie das Zusammensetzen des Basalkörpers und des Axonems. Sie findet in der Regel während der G1-Phase des Zellzyklus statt [354], da viele zentrosomale Proteine für den Aufbau des Ziliums nötig sind [141]. Der Prozess der Ziliogenese ist komplex und erfordert eine Reihe von Organellen, Proteinen und Signalwegen. Im Allgemeinen besteht die Ziliogenese zunächst in der apikalen Migration der Mutterzentriole und ihrer Reifung zum Basalkörper sowie der Verlängerung des Axonems und dem Zilienwachstum durch verschiedene Transportwege [391]. Es gibt zwei unterschiedliche Wege der Ziliogenese abhängig davon, ob die Elongation des Ziliums im Zytoplasma oder an der Zelloberfläche beginnt. Ersteres ist bekannt als der intrazelluläre und letzteres als der extrazelluläre Weg. In den meisten Zelllinien werden die Zilien durch den intrazellulären Weg gebildet, der extrazelluläre Weg kommt vor allem in polarisierten Epithelzellen der Nieren oder der Lunge vor [444].

Der intrazelluläre oder klassische Weg der Zilienbildung wird durch die Migration und Reifung der Mutterzentriole initiiert. Anschließend bilden sich intrazelluläre Vesikel, deren Ursprünge unter anderem im Golgi-Apparat liegen. Diese akkumulieren an dem Mutterzentriol; die dafür essentiellen zentrosomalen Proteine sind unter anderem *centrosomal protein 164* (CEP164) und TALPID3 [224, 369]. Die kleineren Vesikel

fusionieren schließlich zu einer Kapfenstruktur und ummanteln das entstehende Axonem am Mutterzentriol oder Basalkörper. Das elongierte Axonem deformiert das Zentriolvesikel, das schließlich mit der Plasmamembran verschmilzt [32]. Während der Fusion entsteht zusätzlich die Zilientasche (*ciliary pocket*), die in der Übergangszone zwischen dem Basalkörper und dem Axonem lokalisiert ist [293]. Innerhalb der Zilientasche befindet sich eine Diffusionsbarriere, welche die Zilienmembran von der Plasmamembran abtrennt. Sie stellt somit eine physikalische Barriere dar, die Proteine an der Diffusion aus dem Zilium in die Plasmamembran hindert [182].

Der extrazelluläre Weg kommt unter anderem bei Epithelzellen vor, deren Zentrosom am Zentrum ihrer Apikalmembran lokalisiert ist und daher die Zilienbildung nur an der Plasmamembran stattfindet. Hierbei relokalisiert der Teil eines *midbodies* zur Apikalmembran und somit dem Zentrosom. Dieser *midbody*-Teil ist mit der Plasmamembran der Zelle verbunden. Es ist noch unklar, ob das *midbody* über Mikrotubuliformation eine direkte Verbindung zum Zentrosom aufbaut oder durch Signale an den Basalkörper die Formierung eines Primärziliums initiiert [32]. Im Gegensatz zum intrazellulären Weg besitzen Primärzilien, die über den extrazellulären Weg entstehen, keine Zilientasche [237].

Das Primärzilium agiert als Mechanosensor und ist somit in der Lage, mechanische Reize wie etwa Vibration, Druck und Berührung wahrzunehmen [32]. Diese mechanischen Reize können beispielsweise zum Öffnen von im Zilium lokalisierten Ionenkanälen, wie den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, führen. Erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx ist zur Aktivierung und Regulierung vieler Signalwege von essentieller Bedeutung [337]. Das Primärzilium kann zudem biochemische Reize wahrnehmen, wie etwa Hormone und andere Signalmoleküle. Es transduziert diese Signale und ist beteiligt an der Aktivierung und Regulierung von Signalwegen, die wichtig für die Zellproliferation, das Überleben, Differenzierung und Migration sind [32]. Einer dieser Signalwege ist der *platelet-derived growth factor receptor*-(PDGFR $\alpha$ )-Signalweg. Im Primärzilium von Fibroblasten ist der PDGFR $\alpha$ -Rezeptor lokalisiert, nach Aktivierung werden unter anderem der AKT und der MEK1/2-ERK1/2-Signalweg sowie Signalwege zur Proliferation, zum Überleben und zur Zellmigration aktiviert [370]. Weitere zilienregulierte Signalwege sind der kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signalweg [130], der Hippo-Signalweg [150] oder der TGF $\beta$ -Signalweg [81]. Zudem sind GPCRs vieler Hormone, Lipide, Peptide und Neurotransmitter im Zilium lokalisiert [168]. Einer der bekanntesten über das Primärzilium regulierten Signalwege ist jedoch der Hh-Signalweg. Der inhibitorische Rezeptor Patched (PTCH), sowie Smoothed (SMO) in seiner aktiven Form sind im

Primärzilium lokalisiert. Weitere Proteine des Signalwegs wie etwa SUFU-GLI2/3 wandern über den intraflagellaren Transport (IFT) durch das Zilium. Wird der IFT unterbrochen, hat dies einen inhibitorischen Einfluss auf den Hh-Signalweg [161, 186].

Der IFT ist ein kontinuierlicher, bidirektionaler Strom an zellulären Partikeln, die zwischen dem Axonem und der Zilienmembran entweder zur Zilienspitze (anterograd) oder Richtung Basalkörper (retrograd) wandern. Dieser Transport wird über IFT-Proteine reguliert, die Multiproteinkomplexe bilden und sich mittels Kinesin- und Dyneinmotorproteine entlang des Ziliums bewegen [172]. Die Kinesinproteine sind dabei für den anterograden und die Dyneinproteine für den retrograden Transport verantwortlich [384]. Die IFT-Maschinerie besteht aus den Motorproteinen, den IFT-Komplexen und den akzessorischen Proteinen [199]. Die IFT-Komplexe setzen sich aus zwei Untereinheiten, IFT-A und IFT-B, zusammen. Die Komplexe besitzen dabei unterschiedliche biochemische Bestandteile und Funktionen [68]. Komplex A ist essentiell für den retrograden Transport, aber nicht für den Zilienabbau [423], während Komplex B für den anterograden Transport sowie den Zilienabbau und die Zilienerhaltung verantwortlich ist [68]. Die akzessorischen Proteine umfassen eine Vielzahl von Proteinen, die über den IFT in das Zilium oder aus dem Zilium transportiert werden können. Sie benötigen hierfür eine *ciliary localization sequences* (CLSs), um mit der IFT-Maschinerie zu interagieren. Sowohl GLI2 als auch GLI3 des Hh-Signalwegs besitzen nachweislich eine solche CLS für den Transport [153].

### 3.3.2 Der kanonische und nicht-kanonische Hh-Signalweg

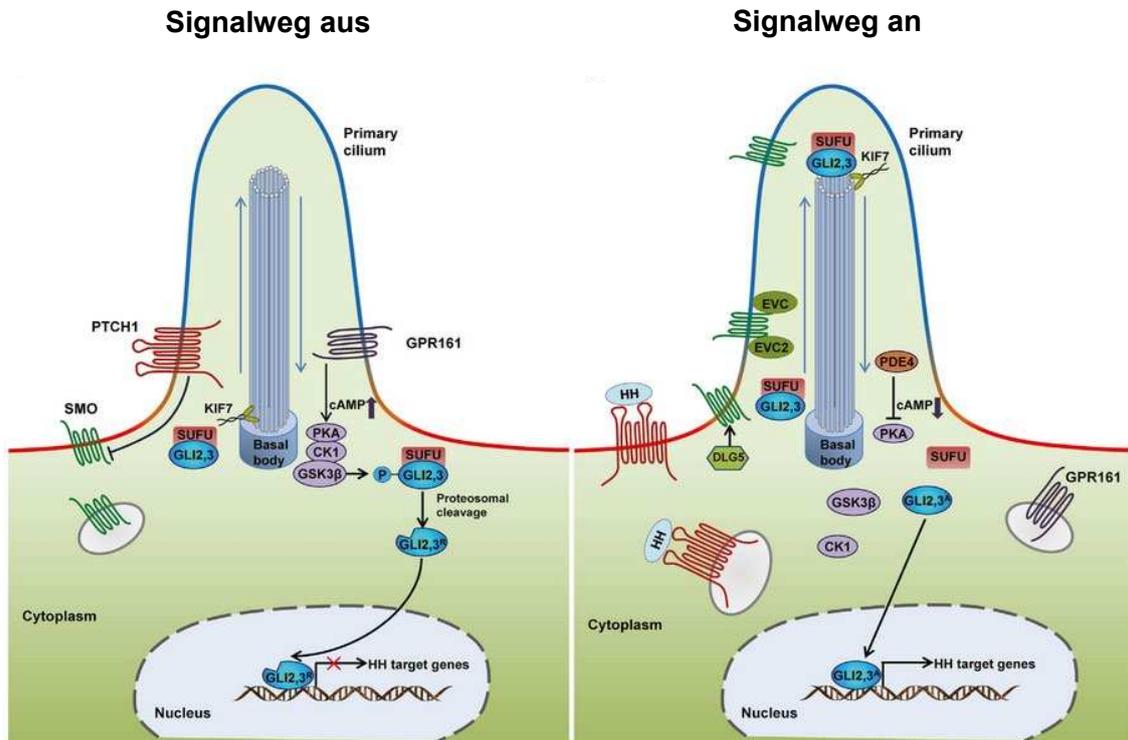
Für die Aktivierung des Hh-Signalwegs muss der Ligand (SHH, IHH oder DHH) zunächst autokatalytisch gespalten werden [242]. Dieser Prozess findet im ER statt, wobei ein C-terminales Fragment, welches proteasomal abgebaut wird und ein N-terminales Fragment entstehen. Das N-terminale Fragment bindet eine Cholesterolgegruppe und eine Palmitinsäuregruppe zur Verstärkung der Aktivität [71, 331]. Das Verlassen der Zelle und die genaue Verbreitung des Liganden innerhalb von Geweben sind teilweise noch ungeklärt. Es gibt einige mögliche Transportmechanismen wie etwa das Bilden eines löslichen Multimers [70], mithilfe von Liganden-assoziierten Lipoproteinpartikeln als Transportmittel [319] oder an der Oberfläche von extrazellulären Vesikeln [416]. Der Ligand des Signalwegs (SHH) bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor PTCH1 (Abb. 5) [400]. PTCH1 ist ein Transmembranprotein der Familie der *sterol-sensing*-Rezeptoren, mit zwölf Transmembran-Helices und zwei extrazellulären Domänen, die als Bindestelle

für den Hh-Liganden fungieren [230]. Neben PTCH1 gibt es eine Reihe von Korezeptoren, *CAM-related/downregu-lated by oncogenes* (CDO), *brother of CDO* (BOC) und *growth arrest-specific 1* (GAS1), die mit dem Liganden interagieren können [7, 412]. Die Korezeptoren sind in der Lage, sowohl den Liganden als auch PTCH1 zu binden und so einen Multimerkomplex zu bilden [7]. Nach Bindung des Liganden an PTCH1 werden diese zusammen in die Zelle geschleust und lysosomal abgebaut [272]. Im aktiven Zustand dient PTCH1 als negativer Regulator von SMO, einem Teil der GPCR-Superfamilie. SMO ist ebenfalls ein Transmembranprotein mit einer Cysteinreichen N-terminalen Domäne, sieben Transmembran-Helices und einem C-terminalen, zytosolischen Schwanz [180]. Es gibt bereits eine Reihe von Modellen, die den inhibitorischen Mechanismus von PTCH1 auf SMO erklären:

1. PTCH1 beschränkt die Zugänglichkeit des SMO-Liganden Cholesterol, welches normalerweise durch eine Esterbindung am Asp-(Aspartat)-95 des SMO bindet. Diese Modifikation ist für die Aktivierung des Hh-Signalwegs notwendig [97, 458];
2. PTCH1 ist in der Lage, noch unbekannte SMO-inhibierende Moleküle intrazellulär oder extrazellulär freizusetzen [357];
3. PTCH1 hat einen direkten oder indirekten Einfluss auf Proteine, die an der Modifikation von SMO durch Cholesterol beteiligt sind [180].

Ist der Hh-Signalweg inaktiv befindet sich der PTCH1-Rezeptor in der Zilienmembran und verhindert die Akkumulation von SMO in eben dieser. Die Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3 befinden sich im Signalweg *downstream* von SMO. Es gibt drei verschiedene Arten: GLI1, GLI2 und GLI3. GLI2 und GLI3 können in unterschiedlichen Formen auftreten, als Transkriptionsrepressoren und als Transkriptionsaktivatoren, wobei GLI3 größtenteils als Repressor und GLI2 als Aktivator fungiert [259, 273, 317]. GLI1 dagegen agiert nur als Transkriptionsaktivator und ist wie PTCH1 eines der Zielgene des Signalwegs. Während der Signalweg inaktiv ist, werden GLI2 und GLI3 post-translational, proteolytisch modifiziert; initiiert wird dies durch mehrere Phosphorylierungen an den Serinen des C-Terminus durch Proteinkinase A (PKA), *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ) und der *casein kinase I*-(CKI)-Familie [411, 443]. GLI2 besitzt nur eine schwache Repressorfunktion und eine weniger effektive Prozessierung als GLI3. Nach der Phosphorylierung wird ein Großteil des Proteins proteasomal abgebaut, während GLI3 mithilfe des Proteasoms in seine Repressorform gespalten wird [317, 318]. Ein weiterer entscheidender Faktor bei der Prozessierung und Stabilisierung von GLI2 und GLI3 ist der *suppressor of fused* (SUFU). SUFU ist ein negativer Regulator des Hh-Signalwegs und kann GLI2/3 binden und stabilisieren sowie GSK3 $\beta$  rekrutieren. Es hat zudem Einfluss auf die Transkriptionsaktivität und

Unterdrückung der GLI-Faktoren durch die Prozessierung von GLI2/3 nach deren Translokation in den Nukleus [73, 221].



**Abbildung 5: Die Aktivierung des kanonischen Hh-Signalwegs.** Ist der Hh-Signalweg inaktiv inhibiert PTCH1 den Rezeptor SMO und verhindert dessen Translokation in den Nukleus. Die Transkriptionsfaktoren GLI2 und GLI3 sind an SUFU gebunden und werden über PKA, CK1 und GSK3 $\beta$  phosphoryliert sowie am Proteasom prozessiert. Sie wandern in ihrer Repressorform in den Nukleus und verhindern die Expression der Zielgene. Nach Bindung des Hh-Liganden an PTCH wird der Signalweg aktiviert. Die Inhibition von SMO wird gelöst und es relokalisiert in das Primärzilium. GLI2 und GLI3 lösen sich von SUFU und wandern in ihrer aktiven Form in den Nukleus, dort kommt es zur Expression von Zielgenen, zu denen unter anderem auch GLI1 und PTCH1 gehören. Entnommen aus Wu *et al.* [453]

Wird die inhibitorische Wirkung von PTCH1 aufgehoben, transloziert SMO durch einen lateralen Transport in das primäre Zilium, wo es einen Komplex mit *Ellis-van Creveld syndrome protein* (EVC) bildet und die Hh-Signalkaskade aktiviert [102, 284]. Der Aktivierungsmechanismus des Signalwegs via SMO ist noch ungeklärt. Es ist jedoch bereits bekannt, dass es unter anderem den Transport von GLI2/3-SUFU via IFT in das Primärzilium fördert, was entscheidend für die Dissoziation von SUFU und somit dessen Aktivierung ist [261]. GLI2/3 in ihrer Aktivatorform wandern in den Nukleus und regulieren die Zielgenexpression zu denen auch *GLI1* und *PTCH1* gehören [17].

Die Aktivierung der GLI-Transkriptionsfaktoren über PTCH und SMO wird als kanonischer Hh-Signalweg definiert. Die nicht-kanonischen Signalwege sind dagegen vielseitiger und beziehen sich unter anderem auf eine Aktivierung unabhängig der GLI-

Transkriptionsfaktoren. Man kann hierbei zwischen zwei Subtypen unterscheiden, dem SMO-abhängigen und dem SMO-unabhängigen Signalweg. Der SMO-abhängige Signalweg führt zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und zur Remodellierung des Aktinzytoskeletts. Die Freisetzung von SMO über die Bindung von PTCH-SHH führt neben dem kanonischen Weg auch zu einer Freisetzung von *T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1* (TIAM1), welches anschließend über *Rac Family Small GTPase 1* (RAC1) eine Remodellierung des Aktinzytoskeletts bewirken kann [365]. Die Aktivierung von SMO kann zudem den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über  $\text{G}_i$ -Proteine regulieren und demnach auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege stimulieren [3, 27]. Der SMO-unabhängige Signalweg dient der Verbesserung der Proliferation und dem Überleben der Zelle. In Abwesenheit des Liganden kann PTCH1 die Lokalisation von Cyclin B in den Nukleus verhindern. Nach Bindung des Hh-Liganden an PTCH1 wird Cyclin B freigesetzt und relokalisiert in den Nukleus, um dort einen Teil des Zellzyklus zu regulieren [22]. Als nicht-kanonischer Signalweg kann auch die Aktivierung der GLI-Transkriptionsfaktoren unabhängig von PTCH und SMO definiert werden. Diese Form tritt häufig in Tumoren auf und die Aktivierung beinhaltet unter anderem den KRAS-Signalweg, TGF $\beta$ , PI3K, PKC und epigenetische Regulatoren [143].

### 3.3.3 Der Hh-Signalweg in Tumoren

Der Hh-Signalweg besitzt nicht nur in der Embryonalentwicklung und einigen Geweben eine essentielle Rolle, sondern auch in der Progression, der Metastasenbildung und der Arzneimittelresistenz von Tumoren. Eine abweichende Aktivierung des Signalwegs findet man beispielsweise im Pankreastumor, Medulloblastom oder Rhabdomyosarkom [387, 410]. Es gibt dabei unterschiedliche Arten der Aktivierung des Hh-Signalwegs in Tumoren: die autonome Liganden-unabhängige Aktivierung, die autokrine/juxtakrine Liganden-abhängige Aktivierung, die parakrine oder reverse parakrine Liganden-abhängige Aktivierung. Die Liganden-unabhängige Aktivierung kann durch eine aktivierende Mutation des SMO oder eine inaktivierende Mutation des PTCH oder SUFU erreicht werden [350]. Diese Mutationen führen zu einem konstitutiv aktiven Signalweg und wurden beispielsweise im Basalzellkarzinom entdeckt [151]. Die autokrine/juxtakrine Liganden-abhängige Aktivierung findet man vor allem im Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom oder Ovarialkarzinom. Hierbei werden die Liganden von derselben Zelle überexprimiert und sekretiert, die sie für eine Aktivierung verwendet [387, 410]. Die parakrine, Liganden-abhängige Aktivierung ist nicht nur typisch für die Wundheilung, sondern kann auch in einigen Tumorstroma detektiert werden, wie etwa dem des

Pankreas-, Prostata- oder Kolonkarzinoms. Der Ligand wird dabei von den Tumorzellen sekretiert und anschließend von den Stromazellen zur Aktivierung des Signalwegs verwendet [387, 410, 471]. Die Aktivierung des Hh-Signalwegs sowohl in Tumor- als auch in Stromazellen kann demnach auf unterschiedliche Art und Weisen erfolgen und fördert unter anderem die Tumorprogression und die Bildung von Metastasen.

### **3.4 Projektskizze**

Während der Tumorgenese findet nicht nur eine Veränderung der Tumorzellen, sondern auch eine Veränderung des umgebenden Gewebes statt. Die Fibroblasten und PSCs des Stromas werden durch eine Reihe von Stimuli der Tumorzellen aktiviert und produzieren als Folge unter anderem verstärkt ECM-Komponenten. Dies führt schließlich zu der typischen Verhärtung des Gewebes in soliden Tumoren wie etwa PDAC. Diese Verhärtung hat umgekehrt Einfluss auf die im Stroma liegenden Zellen. In dieser Arbeit sollte die Veränderungen des Verhaltens und Expressionsmusters von Fibroblasten und PSCs in festem und weichem Gewebe genauer untersucht werden. Im Fokus stand dabei vor allem die Veränderung des Metabolismus der Zellen. Es wurden zwei unterschiedliche Proteine und Signalwege genauer beleuchtet. Zum einen sollte ein möglicher Einfluss der Gewebehärte auf den Hh-Signalweg untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass eine Aktivierung dieses Signalwegs im Stroma vieler Tumoren essentiell für die Proliferation sowohl der Tumor- als auch der Stromazellen ist. Nun sollte eine mögliche Verbindung zwischen dem Signalweg in den Stromazellen und einer Veränderung der Gewebehärte festgestellt werden. Zum anderen wurde bereits ein Effekt der Gewebehärte auf die Glykolyseaktivität der Fibroblasten festgestellt, daher sollte dies auch im Zusammenhang mit dem metabolischen Masterregulator AMPK untersucht werden. AMPK ist hierbei an unterschiedlichen metabolischen Prozessen der Zelle beteiligt. Da der Metabolismus in Tumoren aufgrund von Nährstoffmangel angepasst werden muss, widmete sich diese Arbeit der Frage, ob es eine Verbindung zwischen der Veränderung der ECM und der AMPK-Proteinexpression gibt. Dies wurde zum einen mechanistisch in Mausfibroblasten untersucht, aber auch in Zellen des PDAC-Stromas, da diese Tumorart vor allem für ihr exzessives Stroma bekannt ist. Die möglichen Unterschiede der AMPK-Aktivität in Zellen des kanzerogenen und gesunden Gewebes könnten schließlich einen Einfluss auf das Tumorzellwachstum haben. In dieser Arbeit sollte daher ein Zusammenhang zwischen exzessivem Stroma auf den AMPK-Signalweg der darin liegenden PSCs hergestellt werden, welcher möglicherweise die Proliferation der Tumorzellen fördert.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

##### Pipetten und Pipettierhilfen

Pipetboy ACU 2 Pipettier-Helfer	Th. Geyer GmbH, Renningen (DE)
Pipetboy Finnpipette C1	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pipetman classic P10	Gilson, Middleton (USA)
Pipetman classic P1000	Gilson, Middleton (USA)
Pipetman classic P20	Gilson, Middleton (USA)
Pipetman classic P200	Gilson, Middleton (USA)
Pipetman M P100M	Gilson, Middleton (USA)
Pipetman Multichannel P20-200	Gilson, Middleton (USA)

##### Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop, Leica DM 5500	Leica Microsystems, Wetzlar (DE)
Inverses Labormikroskop DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar (DE)
Inverses Mikroskop DMI3000 B	Leica Microsystems, Wetzlar (DE)
Konfokalmikroskop, Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar (DE)

##### Zentrifugen

Avanti® J-26XP (High Performance)	Beckman Coulter, Brea (USA)
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Multifuge 3L-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Heraeus Pico 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
J-6M/E Centrifuge	Beckman Coulter, Brea (USA)
Kühlzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen (DE)
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Tischzentrifuge Tube-Strip Picofuge	Stratagene, Amsterdam (NL)
Tischzentrifuge Typ Biofuge Pico	Heraeus, Hanau (DE)
Tischzentrifuge Typ Pico 17	Heraeus, Hanau (DE)

##### Netz- und Heizgeräte

Accublock Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Edison (USA)
E815 Power Supply	Consort, Turnhout (BE)
Heizblock Grant QBD2	Grant Instruments, Cambridgeshire (UK)

Power Supply 100/200	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
PowerPac™ 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
PowerPac™ HC High Current PS	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)

### **Waagen, Rührgeräte und Schüttler**

Drehrad RS-RD 20	Phoenix Instrument, Garbsen (DE)
Feinanalysenwaage ABT220-4M	KERN, Balingen (DE)
Lab Rocker 35 EZ	Labnet International Inc., Edison (USA)
Magnetrührer CIMAREC	Barnsted International, Dubuque (USA)
Magnetrührer IKAMAG RET	IKA Labortechnik, Staufen i. Br. (DE)
Magnetrührer MR2000	Heidolph, Schwabach (DE)
Orbitalschüttler KS501digital	IKA Labortechnik, Staufen i. Br. (DE)
ThermoMixer® C	eppendorf, Hamburg (DE)
Universalwaage S-4002	Denver Instrument GmbH, Göttingen (DE)

### **Kühl- und Gefrierschränke**

Eismaschine	Manitowoc Company Inc., Milwaukee (USA)
Gefrierschränke	Liebherr-Internat., Biberach an der Riß (DE)
HERAfreeze und HFU 86 450	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kühlschränke	Liebherr-Internat., Biberach an der Riß (DE)

### **Inkubatoren**

HERAtherm™ Mikrobiol. Inkubator IGS100	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Inkubationsschüttler AJ112	INFORS HT, Bottmingen (Schweiz)
Inkubator HERACELL 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

### **Bakterien-spezifische Geräte**

Geldokumentationsanlage und Software	Intas, Göttingen (DE)
Mini-Sub Cell GT für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Mini-Wasserbad TW2	Julabo GmbH, Seelbach (DE)
UV-Transilluminator 2040EV	Stratagene, Amsterdam (NL)
Videoprinter Modell P93DW	Mitsubishi, Otemachi (JP)
Wide Mini-Sub Cell GT für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)

**Zellkultur-spezifische Geräte**

BVC control Absaugsystem	Vacuubrand, Wertheim (DE)
Einfrierbox 5100 Cryo Freezing Container	Nalgene, Neerijse (BE)
Herasafe Sterilbank	Heraeus, Hanau (DE)
Inkubationsbad GFL 1002	GFL, Burgwedel (DE)
MSC-Advantage™ Sterilbank	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen (DE)
Stickstofftank Chronos 350 Biosafe	Messer Griesheim, Sulzbach (DE)
Vakuumpumpe PM20405-86	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Wasserbad WNB29	memmert, Schwabach (DE)
Zellzähler Cellometer® AutoT4 Plus	Nexcelom Bioscience, Lawrence MA (USA)

**Western-Blot-spezifische Geräte**

Filmkassette	unbekannter Hersteller
Folienschweißgerät polystar 401M	Rische & Herfurth GmbH, Hamburg (DE)
Mini Trans Blot Cell Tank Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Mini-PROTEAN® TetraCell electrophoresis system	Bio-Rad Laboratories (Hercules,USA)
Röntgenfilm-Prozessor SRX-101A	Konica Minolta, Lijnden (NL)

**PCR-Maschinen und Photometer**

MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf (DE)
Mx3005P qPCR System	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Techne™ Prime Elite Thermocycler	Techne Keison Products, Essex (UK)

**Sonstige/allgemeine Geräte**

Mikrowelle NN-E245WB EPG	Panasonic, Osaka (JP)
NanoDrop™ 1000, 2000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (DE)
Orion L microplate luminometer	Berthold, Pforzheim (DE)
pH-Meter InoLab pH720 WTW	WTW, Weilheim (DE)
SPECTRA MAX340 (für Multiwell-Platten)	MWG Biotech, Ebersberg (DE)

## 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

### Bakterienzubehör

Petrischale, 92x16 mm mit Nocken	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Röhrchen, PP, 14 ml, 18x95 mm	Greiner bio-one, Kremsmünster (AU)

### Gelmatrix

Petrisoft 35 collagen coat, 50 kPa	Cell guidance system, Cambridge (UK)
Petrisoft 35 collagen coat, 0.2 kPa	Cell guidance system, Cambridge (UK)
Softslip 18 mm Coverslips, Collagen coated, 50 kPa	Cell guidance system, Cambridge (UK)
Softslip 18 mm Coverslips, Collagen coated, 0.2 kPa	Cell guidance system, Cambridge (UK)

### Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße

Biosphere Filter Tip 0,1-10 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Biosphere Filter Tip 100 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Biosphere Filter Tip 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Biosphere Filter Tip 20 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Biosphere Filter Tip 20 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Biosphere Filter Tip 200 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Biosphere Filtertip 1000 µl (Refill Tower)	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Filterspitze PP, 10 µl	nerbe plus, Winsen (DE)
Filterspitze PP, 1000 µl	nerbe plus, Winsen (DE)
Filterspitze PP, 20 µl	nerbe plus, Winsen (DE)
Filterspitze PP, 200 µl	nerbe plus, Winsen (DE)
Mikro-Schraubröhren 1,5 ml, PP	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Multiply®-Pro Gefäß 0,2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Multiply®-Pro Gefäß 0,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
SafeSeal Gefäß 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Schraubröhre 15 ml, PP	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Schraubröhre 50 ml, PP	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Tip Stack Pack, 10 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Tip Stack Pack, 1000 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Tip Stack Pack, 20 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Tip Stack Pack, 200 µl	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
GenPure Pro UF Wasseraufbereitung	Thermo Scientific, Waltham (USA)

**Zellkulturzubehör**

Cellometer Zählkammer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (DE)
CryoPure Gefäß 1,6 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Einmalspritze Omnifix, 20 ml, steril	neoLab, Heidelberg (DE)
Pasteurpipette, glas	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (DE)
Serologische Pipette, 10 mL	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Serologische Pipette, 25 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Serologische Pipette, 5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Spritzenvorsatzfilter zur Sterilfiltration	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
TC-Schalen 35, Suspension	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturplatte, 12-Well	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturplatte, 24-Well	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturplatte, 48-Well	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturplatte, 6-Well	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturplatte, 96-Well	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturschale, 100 x 20 mm	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellkulturschale, 150 x 20 mm	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Zellschaber	Th. Geyer GmbH, Renningen (DE)
Omnifix® Insulinspritze, 1 ml	B. Braun, Melsungen (DE)
BD Microlance, 0,8 x 40 mm	BD, Heidelberg (DE)

**Western-Blot-Zubehör**

Blottingpapier 0,4 mm dick	Kobe, Marburg (DE)
Fuji Super RX 18 x 24 Film	C&L GmbH, Gräfelfing (DE)
Immobilon®-P PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Schlauchfolie, 150 mm	Kobe, Marburg (DE)
Mini-Protean Short Plates	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)

**Sonstige Verbrauchsmaterialien**

96 Well qPCR Platte randlos weiß	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Deckgläser 18 mm, rund	Th. Geyer GmbH, Renningen (DE)
Disposable Scalpels Sterile	B. Braun, Melsungen (DE)
Microplatte, 96 Well, PP, U-Boden, Weiss	Greiner bio-one, Kremsmünster (AU)
Objektträger 76x26 mm, Mattrand	Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Parafilm ® M	Kobe, Marburg (DE)
qPCR-Folie, Multiwellplatten-Format	SARSTEDT, Nümbrecht (DE)
Whatman Filter	Schleicher & Schuell, Einbeck (DE)

### 4.1.3 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt (DE)
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm (DE)
Aprotinin, lyophilisiert	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Aqua Care Konzentrat, blau	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Blasticidin, powder	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund (DE)
Quick Start Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Bromphenolblau	Merck Millipore, Darmstadt (DE)
Calciumchloride	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol, vergällt	Chemiekalienlager Universität Marburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
FetalBovineSerum	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
FetalBovineSerum	AnproTec, Bruckberg (DE)
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Gibco, DMEM, hoher Glukosegehalt, ohne Glutamin, ohne Phenolrot	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gibco, DMEM, mit L-Glutamin, Natriumpyruvat	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gibco, DPBS	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gibco, Opti-MEM™	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gigasept AF	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt (DE)
Glycerol	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Hygromycin B	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
Invitrogen™ DTT (Dithiothreitol)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Invitrogen™ UltraPure Agarose	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
LB Broth	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Leupeptin, hemisulfat	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
L-Glutamine (200 mM)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Methanol im Fass	Chemiekalienlager Universität Marburg

---

Methanol	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Natriumhydroxid in Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Polyethylenimin (PEI)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Puromycin	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund (DE)
ROTIPHORESE®Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Salzsäure, 37 %	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Saponin	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Serum (Huhn)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Serum (Ziege)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Sodium Orthovanadate	Merck Millipore, Darmstadt (DE)
Sodium Pyrophosphate	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Sodium Pyruvate (100 mM)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Sterilium	Bode Chemie GmbH, Hamburg (DE)
Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt (DE)
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Tris-(hydroxymethyl)-amino methane	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin-EDTA	Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt (DE)
Wasser, HiPerSolv CHROMANORM® für die HPLC	VWR International GmbH, Darmstadt (DE)
VectaShield with DAPI	Biozol, Eching (DE)
β-glycerol-phosphate	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)

Tabelle 1: Inhibitoren und weitere Substanzen.

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller	Konzentration	Lösungsmittel
<b>Bafilomycin A1</b>	11038	Cayman	100 nM	DMSO
<b>Blebbistatin</b>	B0560	Sigma	10 µM	DMSO
<b>Cilengitide</b>	22289	Cayman	500 nM	DMSO
<b>CWHM-12</b>	HY-18644	Hycultec	500 nM	DMSO
<b>Cyclopamine</b>	239803	Sigma	10 µM	DMSO
<b>Cytochalasin D</b>	C8273	Sigma	1 µM	DMSO
<b>Dorsomorphin</b>	11967	Cayman	5 µM	DMSO
<b>Everolimus</b>	E8419	LKT Laboratories	1 µM	DMSO
<b>L-Alanine</b>	A7627	Sigma	1 mM	H <sub>2</sub> O
<b>PF-573228</b>	869288-64-2	Selleckchem	10 µM	DMSO
<b>Rapamycin</b>	553211	Calbiochem	1 µM	DMSO
<b>SAG</b>	364590-63-6	Merck	100 nM	H <sub>2</sub> O
<b>SANT-1</b>	S4572	Sigma	200 nM	DMSO
<b>Y-27632</b>	10005583	Cayman	10 µM	DMSO

Restriktionsenzym***BbsI-HF***

New England BioLabs, Ipswich (USA)

**4.1.4 Puffer und Lösungen**Puffer und Lösungen wurden in der Regel auf 1x mit H<sub>2</sub>O verdünnt.**SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western-Blot****Trenngel**

Menge an AA/BA 37.5:1 (30 %) je nach gewünschter Konzentration anpassen

1.5M Tris-HCl, pH 8,8	40 % (v/v)
AA/BA 37.5:1 (30 %)	7-15 % (v/v)
20 % SDS	0,5 % (v/v)
10 % APS	0,7 % (v/v)
TEMED	0,075 % (v/v)
in H <sub>2</sub> O	

**Sammelgel (4 %)**

1.5 M Tris-HCl, pH 6,8	12,5 % (v/v)
AA/BA 37.5:1 (30 %)	4 % (v/v)
20 % SDS	0,5 % (v/v)
10 % APS	0,75 % (v/v)
TEMED	0,15 % (v/v)
in H <sub>2</sub> O	

**5x SDS Ladepuffer**

Tris-HCl, pH 6,8	250 mmol/l
SDS	10 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)
2-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
in H <sub>2</sub> O	

**10x Laufpuffer**

Tris	250 mM
Glycin	1,9 M
SDS	1 % (w/v)
in H <sub>2</sub> O	

**10x Transferpuffer**

Tris	250 mM
Glycin	1,9 M
SDS	0.037 % (w/v)
in H <sub>2</sub> O	

**10x Waschpuffer (TBST)**

1 M Tris-Cl pH 8,0	250 mM
5 M NaCl	1,5 M
Tween-20	1 % (v/v)
in H <sub>2</sub> O	

**APS**

APS 10 % (w/v)  
in H<sub>2</sub>O

**NaCl**

Tris 5 M  
in H<sub>2</sub>O

**20 % SDS-Lösung**

SDS-Pellets 20 % (w/v)  
in H<sub>2</sub>O

**BSA-Lösung**

BSA 5 % (w/v)  
in 1x TBST

**Tris pH 8,8**

Tris 1.5 M (w/v)  
in H<sub>2</sub>O, eingestellt mit HCl

**Tris pH 6,8**

Tris 1.5 M (w/v)  
in H<sub>2</sub>O, eingestellt mit HCl

**Tris pH 8,0**

Tris 1 M (w/v)  
in H<sub>2</sub>O, eingestellt mit HCl

**Agarosegelelektrophorese****50 x TAE Puffer**

EDTA, pH 8,0 0,5 M  
Tris 2 M  
Essigsäure (100 %) 57,1 % (v/v)  
in H<sub>2</sub>O

**Agarosegel**

Agarose	1 % (w/v) oder 2 % (w/v)
in 1x TAE Puffer (50x TAE Stock verdünnt mit H <sub>2</sub> O)	
Midori Green	Verdünnung von 1:10.000
oder	
GelRed	Verdünnung von 1:10.000

**Co-Immunpräzipitation****Lysepuffer**

Triton-X-100	1 %
Protease Inhibitor Cocktail (50x)	1x
in DPBS	

**Bakterien- und Zellkultivierung****LB-Agar (autoklaviert)**

Agarose	2 % (w/v)
in LB-Medium	

**LB-Medium (autoklaviert)**

LB Broth Base	20 g/l
in H <sub>2</sub> O	

**Immunfluoreszenz****Triton-X-100**

Triton-X-100	0,5 %
in DPBS	

**Formaldehydlösung**

Formaldehyd (37 %)	4 %
in DPBS	

**BSA-Lösung**

BSA	1 %
in DPBS	



#### 4.1.7 Plasmide

Tabelle 2: Verwendete Plasmide.

Hersteller-bezeichnung	Plasmid-bezeichnung	exprimiertes Protein	Artikel-Nr.	Herkunft
pEGFP-C1-PRKAA1	pEGFP-Prkaa1	Prkaa1-GFP	#30305	addgene
PGK-Luc	PGK-Luc	Luciferase		AG Lauth
pmCherry Paxillin	pCMV-mCherry-PXN	Paxillin-mCherry	#50526	addgene
pMRX-IP-GFP-LC3-RFP	pGFP-LC3-RFP	GFP-LC3-RFP	#84573	addgene
pTia-2A-Hygro	pTia-2A-Hygro	-		AG Adhikary
pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-T2A-mCherry	pU6-Cas9	Cas9	#64324	addgene
pU6-ItgaV_Crispr1	pU6-ItgaV_Crispr1	ItgaV_Crispr1		Eigen-generierung

Plasmidkarten in Abb. E1

#### 4.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme

##### Bakterienstamm

***E. coli* TOP 10:** *F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG λ<sup>-</sup>*

von Fisher Scientific (One Shot TOP10 Chemically Competent Cells), Art.Nr.: C404003

**Zelllinien**

Tabelle 3: Standard Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Organ	Herkunft
C3H10T1/2	Fibroblasten, murin	-	ATCC*
hPSC1	Sternzellen, human	Pankreas	Prof. Matthias Löhr
hPSC2	Sternzellen, human	Pankreas	[189]
mCAF1	prim.Fibroblasten, murin	Pankreas	aus KPC Maus isoliert
MEF[GFP]	Fibroblasten, murin	-	Prof. Wade Bushman
Miapaca <sup>Luc</sup>	Tumorzellen, human	Pankreas	AG Lauth
mPSC4	Sternzellen, murin	Pankreas	Prof. Albrecht Neese
mPSC5	Sternzellen, murin	Pankreas	Prof. Albrecht Neese
NIH3T3	Fibroblasten, murin	-	CLS**
Panc1	Tumorzellen, human	Pankreas	ATCC
Panc1 <sup>Luc</sup>	Tumorzellen, human	Pankreas	AG Lauth
PaTu8988T	Tumorzellen, human	Pankreas	DSMZ***
SHHL2	Fibroblasten, murin	-	ATCC

\*ATCC = American Type Culture Collection

\*\*CLS = Cell Lines Services

\*\*\*DSMZ = German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

Tabelle 4: Stabile Zelllinien.

Zelllinie	Plasmid	Bezeichnung	Herkunft
NIH3T3	pGFP-LC3-RFP	NIH3T3[GFP-LC3-RFP]	Eigengenerierung
PaTu8988T	PGK-Luc	PaTu8988T <sup>Luc</sup>	Eigengenerierung
mPSC4	pU6-IltgaV_Crispr1	mPSC4[IltgaV KO]	Eigengenerierung

**4.1.9 Oligonukleotide für Klonierung und Sequenzierung**

Tabelle 5: Primerliste für Sequenzierung und Klonierung.

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
<i>mltgaV_Crispr1_s</i>	CACCGTGGAGTTTAAGTCCCACCAG
<i>mltgaV_Crispr1_as</i>	AAACCTGGTGGGACTTAACTCCAC
<i>hU6_For</i>	GAGGGCCTATTTCCCATGATT

#### 4.1.10 Oligonukleotide für qPCR-Analyse

Tabelle 6: Primerliste für RT-qPCR.

Gen	Spezies	Nukleotidsequenz (5' → 3')
<i>Rplp0 (P0)</i>	murin	forward: TGCACTCTCGCTTTCTGGAGGGTGT
		reverse: AATGCAGATGGATCAGCCAGGAAGG
<i>Prkaa1</i>	murin	forward: GGATCCAAGAGCCGAGTTGCTCACA
		reverse: TGGCTGACATGATAGCGTCTCTGTGC
<i>Prkaa2</i>	murin	forward: GCCTCCACAGAGCACGGTCAAGTTT
		reverse: TGCTGCCAGTCAAAGAGCCAGTGAG
<i>Itga1</i>	murin	forward: AAAAGAGCTTCGTGTTCCGTGAAGCAG
		reverse: TCACCCCATTCCCGTGTGTCATTT
<i>Itga3</i>	murin	forward: CCTACCCAGTCCTCAACCAGGCACA
		reverse: CTTGTTGTCTGGCCCGCACTCTTTC
<i>Itga5</i>	murin	forward: GCCACCCTTACCCAGACCCTGCTTA
		reverse: TGAGGGCAATGTGAATTGGGGAGAG
<i>Itga6</i>	murin	forward: GGAGCTGACCCTGAATCGGCAGAAG
		reverse: GGATGGGACGCAGCTTGTCTCTGAT
<i>Itga7</i>	murin	forward: GTGTGGCTGAAGCACCAACATGACC
		reverse: CACCACAATGGCCCGTAGCTTGTCT
<i>Itga8</i>	murin	forward: ATGAGGGAGAAGGGGCCTACGAAGC
		reverse: GGTCACACACCACCATCCTGGTCAC
<i>Itga9</i>	murin	forward: TTTTCTGCTGCTGGCTGTGCTCCT
		reverse: CTGGACCCAGTCCCAACCATCTTCA
<i>Itga10</i>	murin	forward: GCTGCTCCTGCTTGCTCTCCTTGTC
		reverse: AAGGCTGCCAAAGTGGGCTTCTGAG
<i>Itga11</i>	murin	forward: ATCTGGATCATCGTGGGCAGCACTC
		reverse: GTTCCCTCTTGCGCTTGGCACTTTT
<i>ItgaV</i>	murin	forward: CAGGGCTGCTGCTACTGGCTGTGTT
		reverse: GCTCTTCTTGAGGTGGTCGGACACG
<i>Itgb1</i>	murin	forward: AGGAGAAAATGAATGCCAAGTGGGACA
		reverse: TTGGTGTGCAAATCCGCCTGAGT
<i>Itgb2</i>	murin	forward: CAGCCACCGATGTGTGAGGATTGTC
		reverse: TGCAGCGTCATACCAGCACACTGAA
<i>Itgb3</i>	murin	forward: TGAGGAAGAACGAGCCAGAGCCAAG

<b><i>Itgb3</i></b>	murin	reverse: CCCCCGGTAGGTGATATTGGTGAAGG
<b><i>Itgb4</i></b>	murin	forward: TGGACAATGGCAAGTCCCAGGTCTC reverse: CTTCCAGGTCTCCCCAGGATGGAAC
<b><i>Itgb5</i></b>	murin	forward: CCATCTGGAAGCTGCTCGTCACCAT reverse: GGCGAAATCGACAGTGTGTGTGGAG
<b><i>Itgb6</i></b>	murin	forward: GAACGCTCTAAGGCCAAGTGGCAAA reverse: AGGCCTGCTTTGTGCTTCTCCCTGT
<b><i>Itgb7</i></b>	murin	forward: AGGCTGCAAGTCACCATGTGAGCAG reverse: AGGGGCCAAGGTCAAGGTCACATTC
<b><i>Itgb8</i></b>	murin	forward: TGCCAGTGCTTTAGTGGCTGGGAAG reverse: CTGCAAACCTTGGCCCTTGGAGTTGA
<b><i>Ilk</i></b>	murin	forward: TGAAGCCCTGCAGAAGAAGCCTGAA reverse: TTCCAGTGCCACCTTCATCCCAATC
<b><i>Fak</i></b>	murin	forward: CCTCCAAATTGTCCTCCCACCCTCT reverse: TCTTGCTGCACCTTCTCCTCCTCCA
<b><i>Src</i></b>	murin	forward: GGTTGGCCCGGCTCATAGAAGACAA reverse: ACCTGCCGTACAGAGCAGCTTCAGG
<b><i>Cfl1</i></b>	murin	forward: GGCCTCTGGTGTGGCTGTCTCTGAT reverse: AAAGAGCACCGCCTTCTTGCGTTTC
<b><i>Pfn1</i></b>	murin	forward: GATCCGGGACTCACTGCTGCAAGAC reverse: GTGGACACCTTCTTTGCCCATCAGC

#### 4.1.11 siRNA

Die siRNAs wurden von der Firma Sigma Aldrich erworben und gelöst in einer 100 µM Stock Lösung in RNA-Puffer.

Tabelle 7: siRNA-Liste.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
<b><i>siCon (Qiagen's All-Star; siAll)</i></b>	AAUUCUCCGAACGUGUCACGU
<b><i>siltga1_1</i></b>	AGGGCAAGGUGUACGUGUA
<b><i>siltga1_2</i></b>	CCACAAUUGACAUCGACAA
<b><i>siltga1_3</i></b>	GCCUAUGACUGGAACGGAA
<b><i>siltga1_4</i></b>	CUUUAAUGACGUCGUGAUU

<i>siltga3_1</i>	GGACAAUGUUCGCGAUAAA
<i>siltga3_2</i>	GCUACAUGAUUCAGCGGAA
<i>siltga3_3</i>	AGACAUACCACAACGAGAU
<i>siltga3_4</i>	GCACACUGGUUCUAGGUCU
<i>siltga5_1</i>	CAAGAUGAGUUCAGCCGAU
<i>siltga5_2</i>	GCUUCAACCUAGACGCGGA
<i>siltga5_3</i>	UGUGAAGGACCCUCGUUUA
<i>siltga5_4</i>	CAGCAAAGGCUCCCGGAUU
<i>siltga6_1</i>	GUUAUAUUUUGACGGAGAA
<i>siltga6_2</i>	UGGCUCACCUAGCGGGAUA
<i>siltga6_3</i>	CGAGAGUUCAGUUUCGAAA
<i>siltga6_4</i>	GGACCAAAGACUCGAUGUU
<i>siltga7_1</i>	CGAUUAGAGUCUCGACAGA
<i>siltga7_2</i>	GAAGCAAGGCUGCGGUCAA
<i>siltga7_3</i>	GGGCAAGAUUGUUACGUGU
<i>siltga7_4</i>	GGGCGAAAGUGCCAUGCGA
<i>siltga8_1</i>	CCUAAAGGUCAGAUCGAGA
<i>siltga8_2</i>	GGUCAUAAUACUAGCGAUC
<i>siltga8_3</i>	GCGGUUAAGACGUCGGUUA
<i>siltga8_4</i>	UCAAGAAGAUGCCGUUAAA
<i>siltga9_1</i>	UGCUGAACCUACCGACAA
<i>siltga9_2</i>	ACAUGGAGCCCUCGAGGAA
<i>siltga9_3</i>	UUUCCAGUGUUGACGAGAA
<i>siltga9_4</i>	GUUGAACGAUGAAGCGAUU
<i>siltga10_1</i>	GCACCGAGGUUUAGACAUC
<i>siltga10_2</i>	GCUCAUACUUUGGCAGCGA
<i>siltga10_3</i>	GGAUACAGAUAAAGGACGGA
<i>siltga10_4</i>	GAGGAAAAGUUUAUCGCCUU
<i>siltga11_1</i>	CCAGCGACCCUGACGACAA
<i>siltga11_2</i>	GCAUCGAGUGUGUGAACGA
<i>siltga11_3</i>	UCAGAAGACAGGAGACGUA
<i>siltga11_4</i>	AUGGAUGAGAGGCGGUUUA
<i>siltgaV_1</i>	GUGAACAGAUGGCUGCGUA
<i>siltgaV_2</i>	GUGAGGAACUGGUCGCCUA
<i>siltgaV_3</i>	CCAAUUAGCAACACGGACU

<i>siltgaV_4</i>	GCGCAAUCCUGUACGUGAA
<i>siltgb1_1</i>	CAAUGAAGCUAUCGUGCAU
<i>siltgb1_2</i>	GUGAAGACAUGGACGCUUA
<i>siltgb1_3</i>	UUACAAGAGUGCCGUGACA
<i>siltgb1_4</i>	UGCCAAAUCUUGCGGAGAA
<i>siltgb2_1</i>	GGAAUGCACCAAGUACAAA
<i>siltgb2_2</i>	GUAGUUGCAAGCCCGGUUA
<i>siltgb2_3</i>	GGUAUGACGCUGCAGACUA
<i>siltgb2_4</i>	GGUCAUGGCUUCCGAGUGU
<i>siltgb3_1</i>	AAACAGAGCGUGUCCCGUA
<i>siltgb3_2</i>	AAACACGUGCUGACGCUAA
<i>siltgb3_3</i>	GAGCAGUCUUUCACUAUCA
<i>siltgb3_4</i>	GUGAAAGAGCUGACGGAUA
<i>siltgb4_1</i>	GCUACAACGUGGAGGGCGA
<i>siltgb4_2</i>	AAGUCAAGAUGGUAGACGA
<i>siltgb4_3</i>	GAUCAACUACUCUGCGAUA
<i>siltgb4_4</i>	GGAUAAUACAGCACACGGA
<i>siltgb5_1</i>	CCGCUUAGGUUUCGGGUCU
<i>siltgb5_2</i>	GCUAGGCACGCACGGAUAA
<i>siltgb5_3</i>	AGAAGAUCGGAUGGCGAAA
<i>siltgb5_4</i>	ACUGCUAAGGACUGCGUUA
<i>siltgb6_1</i>	GGACAUUCCUAUCCCGUAU
<i>siltgb6_2</i>	CGGCCAACUCAUUGAUAAA
<i>siltgb6_3</i>	GGAGUUGCAUCGAGUGCUA
<i>siltgb6_4</i>	GCUCAUCGGAGUUGUGCUA
<i>siltgb7_1</i>	GGACCUUCAGUGCGGGUAU
<i>siltgb7_2</i>	GGUCUGUGCUGACGUGAAU
<i>siltgb7_3</i>	ACUCAAUGAAGGACGACUU
<i>siltgb7_4</i>	AGAAAUUCCGGGZCCGCUU
<i>siltgb8_1</i>	GCGGAUGGUGUGUUCAAGA
<i>siltgb8_2</i>	GGCCAAAGUGAACACAAUA
<i>siltgb8_3</i>	CGUCAAGUGAGAAUGAAAU
<i>siltgb8_4</i>	GGAAGUGAACGUUGUGAUA
<i>siPtk2_1</i>	GUACAGCACUCGCGUAUCU
<i>siPtk2_2</i>	GCUCCAGAGUCAAUCAAUU

<i>siPtk2_3</i>	GGGCAUCAUUCAGAAGAUUA
<i>siPtk2_4</i>	GAAGUUGGGUUGUUUGGAA
<i>siSrc_1</i>	GCUCGUGGCUUACUACUCC
<i>siSrc_2</i>	UCAGAUCGCUUCAGGCAUG
<i>siSrc_3</i>	GGGAGCGGCUGCAGAUUGU
<i>siSrc_4</i>	GCACGGGACAGACCGGUUA
<i>sillk_1</i>	GAAGGCACCAAUUUCGUUG
<i>sillk_2</i>	GUAAGCUCAUGAAGAUUUG
<i>sillk_3</i>	CUCAAUAGCCGCAGUGUAA
<i>sillk_4</i>	GAACAAACACUCCGGUAAU
<i>siCfl1_1</i>	CCAGAAGAAGUGAAGAAAC
<i>siCfl1_2</i>	CAGACCUGCUCUUGGGUGU
<i>siCfl1_3</i>	CUAACUGCUACGAGGAGGU
<i>siCfl1_4</i>	GUGUCAUCAAGGUGUCAA
<i>siPfn1_1</i>	GCAAAGACCGGUCAAGUUU
<i>siPfn1_2</i>	GGGAAUUUACAAUGGAUCU
<i>siPfn1_3</i>	UGGAACGCCUACAUCGACA
<i>siPfn1_4</i>	CUUCGUUAGCAUUACGCCA

#### 4.1.12 Antikörper

Tabelle 8: Primärantikörper.

Antikörper	Spezies	Klon	Artikel-Nr.	Hersteller	Klonalität
Acetylated Tubulin	Maus	6-11B-1	T6793	Sigma	mono
Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)	Kaninchen	C83B10	#3676	CST*	mono
AMPK $\alpha$	Maus	F6	#2793	CST	mono
AMPK $\beta$ 1/2	Kaninchen	57C12	#4150	CST	mono
FAK	Kaninchen		#3285	CST	poly
GLI1	Maus	L42B10	#2643	CST	mono
GLI2	Maus	C-10	sc-271786	Santa Cruz	mono
GLI3	Ziege		AF3690	R&D	poly
ITGAV	Kaninchen		#4711	CST	poly
Keratin 17/19	Kaninchen	D4G2	#12434	CST	mono

<b>KIF3A</b>	Kaninchen	D7G3	#8507	CST	mono
<b>LC3A/B</b>	Kaninchen	D3U4C	#12741	CST	polyk
<b>mTOR</b>	Kaninchen	7C10	#2983	CST	mono
<b>PDGFR-<math>\alpha</math></b>	Kaninchen	C-20	sc-338	Santa Cruz	poly
<b>phospho-ACC (Ser79)</b>	Kaninchen	D7D11	#11818	CST	mono
<b>phospho-ACC (Ser79) (für IHC)</b>	Kaninchen		#36611	CST	poly
<b>phospho-AMPK<math>\alpha</math> (Thr172)</b>	Kaninchen	40H9	#2535	CST	mono
<b>phospho-mTOR (Ser2448)</b>	Kaninchen	D9C2	#5536	CST	mono
<b>phospho-Paxillin (Tyr118)</b>	Kaninchen		#2541	CST	poly
<b>SUFU</b>	Ziege	M-15	sc-10934	Santa Cruz	poly
<b>TAZ</b>	Kaninchen	E8E9G	#83669	CST	mono
<b>YAP</b>	Kaninchen		#4912	CST	poly
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Kaninchen	D4K9N	#19245	CST	mono
<b><math>\beta</math>-ACTIN</b>	Maus	AC-15	A5441	Sigma	mono

\* Cell Signaling Technology

Tabelle 9: Sekundärantikörper.

<b>Antikörper</b>	<b>Quelle/Isotyp</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
<b><math>\alpha</math>-mouse IgG</b>	Pferd	HRP*	#7076	CST
<b><math>\alpha</math>-rabbit IgG</b>	Ziege	HRP*	#7074	CST
<b><math>\alpha</math>-goat IgG</b>	Maus	HRP*	sc-2354	Santa Cruz
<b><math>\alpha</math>-mouse IgG</b>	Ziege	AF488**	10696113	Fisher Scientific
<b><math>\alpha</math>-mouse IgG</b>	Ziege	AF633	A-21050	Fisher Scientific
<b><math>\alpha</math>-rabbit IgG</b>	Ziege	AF488	10082502	Fisher Scientific
<b><math>\alpha</math>-rabbit IgG</b>	Ziege	AF633	A-21070	Fisher Scientific

\* HorseRadish Peroxidase

\*\*Alexa Fluor®

#### 4.1.13 Analysesoftware und Datenbanken

##### Datenbanken

PubMed

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Gen Datenbank

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

Protein Atlas

<https://www.proteinatlas.org/>

R2: Genomics Analysis and Visualization Platform

<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>

### **Analysesoftware**

ApE (A plasmid Editor)

M. Wayne Davis

GraphPad Prism 6

GraphPad Software, La Jolla (USA)

Microsoft® Office 2013

Microsoft, Redmond (USA)

Analysesoftware NanoDrop 2000/2000c

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen (DE)

Leica Application Suite LAS V4.7

Leica Microsystems, Wetzlar (DE)

Mx3005P Analysesoftware

Agilent Technologies, Santa Clara (USA)

ViewPoint Light

precipoint, Freising (GER)

ImageJ

<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

INTAS GDS Software

Intas Science Imaging Instruments, Göttingen (DE)

Chromas

Technelysium, South Brisbane (AUS)

Simplicity 4.2

Berthold, Pforzheim (DE)

Cellometer Auto T4

Nexcelom Bioscience, Lawrence MA (USA)

### **Software zur Erstellung der Abbildungen**

BioRender

<https://biorender.com/>

Medical Art

<https://smart.servier.com/>

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **Kultivierung von Zellen**

Die verwendeten Zelllinien wurden standardmäßig in DMEM (hoher Glukosegehalt, Pyruvat) mit Zugabe von 1 % Penicillin-Streptomycin (P/S) (v/v) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Zellkulturarbeiten wurden ausnahmslos in einer Sterilbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen fand bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % statt. Stabile Zelllinien wurden zudem stets unter einem Selektionsdruck kultiviert, je nach integrierter Resistenzkassette handelte es sich dabei entweder um Blasticidin (5 µg/ml), Puromycin (2 µg/ml) oder Hygromycin (400 µg/ml). Die Zelllinien wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80-90 % kultiviert und anschließend passagiert, hierfür wurde das Medium vollständig abgenommen und 1x mit ca. 5-7 ml DPBS gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 1 ml (bei 100 mm

Kulturschalen) oder 2 ml (bei 150 mm Kulturschalen) Trypsin-EDTA von 10 min bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden mit einer Pipette vereinzelt und je nach Eigenschaft der Zellen und benötigter Menge für Folgeexperimente in frische Kulturschalen überführt. Der Trypsinisierungsprozess wurde durch anschließende Zugabe des Kultivierungsmedium (10 ml in 100 mm Schalen, 20 ml in 150 mm Schalen) gestoppt. Die Konfluenz der Zellen wurde mithilfe eines Lichtmikroskops überprüft. Die verwendeten Zelllinien wurden nicht länger als 30-mal passagiert.

### **Aussaat von Zellen für Immunfluoreszenz**

Für Immunfluoreszenzexperimente wurden die Zellen in der Regel mit einer Konfluenz von etwa 70 % ausgesät. Es wurden dabei zunächst runde Deckgläschen in eine 12-Well-Platte überführt und anschließend mit der Zellsuspension bedeckt. Es musste stets darauf geachtet werden, dass die Suspension nicht unter das Deckgläschen gerät. Für die Arbeit mit Hydrogel-Deckgläschen wurden die Zellen auf dieselbe Art ausgesät, es musste allerdings darauf geachtet werden, das Gel nicht von dem Glasdeckgläschen zu lösen oder es zu beschädigen. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurde das Medium in der Regel zu DMEM mit einem 0.5 %igem Anteil an FCS gewechselt. Experimente ohne Medienwechsel wurden separat gekennzeichnet.

### **Plasmidtransfektion mittels Polyethylenimin (PEI)**

Die Zellen wurden am Vormittag entweder auf 6-Well-Platten oder 100 mm Zellkulturschalen mit einer Konfluenz von etwa 60 % ausgesät. Dies entsprach auf einer 6-Well-Platte einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/Well und auf einer 100 mm Schale  $3 \times 10^6$  Zellen/Schale. Auf die Zellen wurde anschließend DMEM (10 % FBS, 1 % P/S) gegeben und bei 37 °C für einige Stunden inkubiert. Für die Transfektion sollten sich die Zellen vollständig abgesetzt haben, dies wurde mithilfe eines Lichtmikroskops überwacht. Die Transfektionsansätze wurden wie folgt vorbereitet:

#### **6-Well-Platte**

<u>Plasmidlösung</u>	<u>PEI-Lösung</u>
2 µg Plasmid-DNA	4 µl PEI
82 µl DPBS	80 µl DPBS

#### **100 mm Schale**

<u>Plasmidlösung</u>	<u>PEI-Lösung</u>
8 µg Plasmid-DNA	16 µl PEI
330 µl DPBS	320 µl DPBS

Die beiden Lösungen wurden für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bevor sie zusammengeführt wurden. Es folgte eine weitere Inkubation des vereinten Ansatzes von 30 min bei RT. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise auf das gewünschte Well oder Schale gegeben. Nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Zeitraum von 48 h bei 37 °C inkubiert. Diese Transfektion besaß die geringste Effizienz und wurde daher nur bei Zellen angewandt, die sich vergleichsweise leicht transfizieren lassen.

### **Plasmidtransfektion mittels HelixIN**

Die Zellen wurden am Vormittag auf 6-Well-Platten mit einer Konfluenz von etwa 60 % ausgesät. Am Nachmittag, nach Absetzen der Zellen, erfolgte die Transfektion nach folgendem Schema:

#### **6-Well-Platte**

2 µg Plasmid-DNA  
4 µl HelixIN Transfektionsreagenz  
250 µl OptiMEM

Der Reaktionsansatz musste für 30 min bei RT inkubieren. Es folgte die tropfenweise Zugabe des Ansatzes in das gewünschte Well. Anschließend wurde 20 µl des im Kit enthaltenen HIB (100x) hinzugegeben. Nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Zeitraum von 48 h bei 37 °C inkubiert. Dieses Transfektionsreagenz besaß eine hohe Effizienz und wurde ausschließlich zur Herstellung von CRISPR-Knockout-Zelllinien verwendet.

### **Plasmidtransfektion mittels TransIT**

Die Zellen wurden am Vormittag auf 6-Well-Platten mit einer Konfluenz von etwa 60 % ausgesät. Am Nachmittag, nach Absetzen der Zellen, erfolgte die Transfektion nach folgendem Schema:

#### **6-Well-Platte**

2,5 µg Plasmid-DNA  
7,5 µl TransIT Transfektionsreagenz  
250 µl OptiMEM

Der Reaktionsansatz musste für 30 min bei RT inkubieren. Es folgte die tropfenweise Zugabe des Ansatzes in das gewünschte Well. Nach der Transfektion wurden die Zellen für einen Zeitraum von 48 h bei 37 °C inkubiert. Diese Transfektion besaß eine

vergleichsweise hohe Effizienz und wurde vor allem bei Immunfluoreszenzexperimenten verwendet.

### **siRNA-Transfektion mittels Lipofectamine RNAiMAX**

Die Zellen wurden vormittags mit einer Konfluenz von 60 % in 6-Well-Platten ausgesät. Am Nachmittag, wenn die Zellen sich abgesetzt haben, wurde die siRNA-Transfektion durchgeführt. Beim Einsatz von siRNA wurde stets mit Filterspitzen und auf Eis gearbeitet. Die Transfektion erfolgte nach folgendem Schema:

#### **6-Well-Platte**

<u>RNAiMAX-Lösung</u>	<u>siRNA-Lösung</u>
4,8 µl RNAiMAX	2,4 µl siRNA (20 µM)
200 µl OptiMEM	198 µl OptiMEM

Die beiden Lösungen sollten für 5 min bei RT inkubieren, bevor sie zusammengeführt wurden. Es folgte eine Inkubation von 25 min bei RT. Vor Zugabe des Ansatzes in das gewünschte Well wurde das Medium entfernt und jeweils 1 ml frisches DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) zugegeben. Es folgte die tropfenweise Zugabe des Ansatzes, die Endkonzentration der siRNA pro Well betrug schließlich 34 nM. Die Zellen wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert, anschließend fand ein Medienwechsel zu 0,5 % FCS DMEM statt und eine weitere Inkubation der Zellen für 48 h. Sollte das Experiment auf Hydrogelen stattfinden wurde die siRNA-Transfektion zunächst auf Plastik durchgeführt. Nach der Inkubation für 24 h wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA von der Platte gelöst und auf die Hydrogel-Wells gesät. Daraufhin folgte ebenfalls ein Medienwechsel zu 0,5 % FCS und eine Inkubation der Zellen für 48 h.

### **Kryokonservierung von Zellen für eine langfristige Lagerung**

Für eine langfristige Lagerung wurde eine 90 % konfluente 100 mm Zellkulturplatte zunächst mit DPBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA behandelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 400 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in jeweils 1 ml Einfriermedium, bestehend aus FCS mit 10 % DMSO, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryovials überführt und in eine Einfrierbox mit 2-Propanol gegeben. Das 2-Propanol sorgte für ein langsames Einfrieren der Zellen und verhinderte somit mögliche Kristallbildung und Beschädigung der Zellen. Die Box wurde für mindestens 24 h bei -80 °C gelagert. Für eine Lagerung von 1-2 Jahren wurden einige Vials bei -80 °C, für eine längerfristige Lagerung in Flüssigstickstoff gegeben.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese zunächst in einem 37 °C warmen Wasserbad getaut. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Falcon mit 5 ml DMEM überführt und bei 400 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Medium wurde vollständig abgenommen, um so das DMSO der Einfrierlösung zu entfernen. Es folgte eine Resuspension der Zellen in DMEM (10 % FCS, 1 % P/S) und ein anschließendes Überführen in einen 100 mm Zellkulturschale. Die Zellen wurden bei 37 °C für mindestens eine Woche kultiviert, bevor sie experimentell genutzt werden konnten.

### **Auszählen von Zellen**

Die Zellen einer 100 mm Zellkulturschale wurden mit DPBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Falcon überführt. Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Auszählung der Zellen verwendet. Zum einen wurde ein Cellometer Auszählgerät verwendet, hierfür musste die Zellsuspension in speziell gefertigten Objektträger pipettiert werden. Anschließend wurden die Zellen automatisch ausgezählt und die Zellzahl pro ml angegeben. Diese Methode wurde bei dem Großteil der Versuche angewandt. Für die restlichen Versuche wurde die Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es folgte das Auszählen der Zellen pro Quadrat und anschließendem Berechnen der Zellzahl pro ml nach folgender Formel:

**(Zellzahl der 4 Quadranten / 4) \* 10<sup>4</sup> Zellen/ml** (eventuelle Verdünnung noch miteinrechnen)

### **Isolation der primären mCAF1-Fibroblasten aus Mauspankreas Tumoren**

Zur Isolierung von primären CAFs wurde zunächst das Pankreaskarzinom einer KPC-Maus entfernt und in einem Falcon mit DPBS auf Eis aufgefangen. Zusätzlich wurde etwas Mausblut in einem Eppi überführt und 20 min bei RT inkubiert. Das Blut wurde anschließend bei 13.000 rpm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand, das Blutserum, abgenommen. Der Pankreastumor wurde unter einer Sterilbank in etwa 2x2x2 mm große Stücke zerteilt und durch einen Tropfen gemischt aus 1 µl Blutserum und 1 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf eine 100 mm Kulturschale befestigt. Die angehefteten Stücke wurden mindestens 30 min bei RT inkubiert und konnten anschließend mit DMEM (20 % FBS, 1 % P/S) vorsichtig umspült werden, bis die Stücke vollständig bedeckt waren. Die Inkubation der Schale bei 37 °C führte nach mehreren Wochen schließlich zum Herauswachsen von Zellen aus den Fragmenten. Die Stücke wurden daraufhin entfernt und die Zellen mittels Trypsin/EDTA in eine frische Schale überführt. Die Zellen mussten nun auf mesenchymale Marker, sowie dem Fehlen der KPC Mutationen untersucht werden.

**Herstellung stabiler PaTu8988T<sup>Luc</sup>-Zellen**

Zur Herstellung stabiler PaTu8988T<sup>Luc</sup>-Zellen wurden die Wildtyp PaTu8988T-Zellen zunächst mit einer Konfluenz von ca. 60 % auf eine 100 mm Schale ausgesät. Nach Absetzen der Zellen folgte die Transfektion des Plasmids PGK-Luc zusammen mit pEF-MCS mittels TransIT nach dem beschriebenen Protokoll. Parallel wurde als Kontrolle eine 100 mm PaTu8988T-Schale nur mit PGK-Luc transfiziert. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 48 h bei 37 °C, anschließend wurden sie in jeweils drei frische 100 mm Schalen gesplittet. Es folgte eine Behandlung der Zellen mit der vorgeschriebenen Konzentration des Antibiotikums Blasticidin. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C inkubiert, bis sie in den Kontrollschalen vollständig abgestorben waren und sich auf den PGK-Luc + MCS-Schalen Zellkolonien bildeten. Dies dauerte in der Regel etwa 2-3 Wochen. Die Kolonien wurden schließlich trypsinisiert, vereinzelt und auf neue 100 mm-Schalen überführt. Als Kontrolle einer erfolgreichen stabilen Transfektion wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Die Menge an gemessener Luciferase sollte dabei linear zu der Menge an Zellen sein, um bei darauffolgenden Experimenten ein sicheres Ergebnis liefern zu können (Abb. E8). Nach der Kontrolle wurden die Zellen schließlich kultiviert und Kryovials für die Lagerung und spätere Nutzung weggefroren.

**Herstellung stabiler NIH3T3[GFP-LC3-RFP]-Zellen**

Zur Herstellung stabiler NIH3T3[GFP-LC3-RFP]-Zellen wurden die Wildtyp Fibroblasten zunächst mit einer Konfluenz von ca. 60 % auf eine 100 mm Schale ausgesät. Nach Absetzen der Zellen folgte die Transfektion des Plasmids pGFP-LC3-RFP mittels TransIT nach dem beschriebenen Protokoll. Parallel wurde als Kontrolle eine nicht-transfizierte 100 mm PaTu8988T Schale kultiviert. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 48 h bei 37 °C, anschließend wurden sie in jeweils drei frische 100 mm Schalen gesplittet. Es folgte eine Behandlung der Zellen mit der vorgeschriebenen Konzentration des Antibiotikums Blasticidin. Die Zellschalen wurden anschließend bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen in den Kontrollschalen vollständig abstarben und sich auf den transfizierten Schalen Zellkolonien bildeten. Dies dauerte in der Regel etwa 2-3 Wochen. Die Kolonien wurden schließlich trypsinisiert, vereinzelt und auf neue 100 mm Schalen überführt. Als Kontrolle einer erfolgreichen stabilen Transfektion wurden die Zellen nach Kultivierung in 0,5 % und 10 % FCS-Medium unter einem Immunfluoreszenzmikroskop überprüft. Nach der Kontrolle wurden die Zellen schließlich in Kryovials für die Lagerung und spätere Nutzung weggefroren.

### **Herstellung stabiler ItgaV-CRISPR-Knockout-mPSC4-Zellen**

Zur Herstellung stabiler ItgaV-CRISPR1-Knockout-mPSC4-Zellen wurde die Strategie von Blumen *et al.* verfolgt [40]. Dabei wurden die Wildtyp-Sternzellen zunächst mit einer Konfluenz von ca. 60 % auf eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach Absetzen der Zellen folgte die Transfektion der Plasmide mittels HelixIN. Es wurde dabei nach dem HelixIN Protokoll vorgegangen, die 2 µg Plasmidmenge setzte sich dabei aus folgendem zusammen:

pU6-ItgaV_Crispr1	0,8 µg (Eigengenerierung)
pTia-2A-Hygro	0,8 µg
pU6-Cas9	0,2 µg

Es folgte eine Inkubation der Zellen für 48 h bei 37 °C. Die transfizierten Zellen wurden anschließend in 100 mm Schalen überführt und mit der vorgeschriebenen Konzentration des Antibiotikums Hygromycin behandelt. Das Heranwachsen von Zellkolonien dauerte in der Regel 2-3 Wochen, daraufhin wurden einzelne Klone gepickt und der erfolgreiche Knockout mittels Western-Blot und RT-qPCR bestätigt. Ein erfolgreicher Klon wurde schließlich kultiviert und in Kryovials für die Lagerung und spätere Nutzung weggefroren.

## **4.2.2 Mikrobiologische Methoden**

### **Klonierung von ItgaV-CRISPR-Konstrukten**

Für das Klonieren eines ItgaV-CRISPR1-Konstruktes wurden zunächst die Primer mltgav\_Crispr1\_s und mltgav\_Crispr1\_as als 100 µM-Stock in H<sub>2</sub>O gelöst. Diese Primer enthielten bereits die vollständige Sequenz des Integrin αV und mussten daher lediglich zu einem doppelsträngigen Primer zusammengeführt werden. Hierfür wurde jeweils 15 µl der Primer in ein Eppi überführt und bei 100 °C für 5 min aufgeköcht. Die Primerlösung musste anschließend langsam auf RT abgekühlt werden, bevor sie bei -20 °C gelagert werden konnte. Der Zielvektor der Klonierung ist pU6-Cas9 (Abb. E1). Dieser musste zunächst verdaut und aus dem Gel extrahiert werden. Für den Verdau wurde folgendes Protokoll verwendet:

NEBuffer 2.1 (10x)	5 µl
<i>BbsI</i>	1 µl
pU6-Cas9	5 µg
H <sub>2</sub> O	bis zu 50 µl

Der Ansatz wurde anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert, als Kontrolle diente der Ansatz ohne Zugabe des Restriktionsenzym (*BbsI*). Es folgte eine Zugabe des 10x Ladepuffers und eine vollständige Auftragung der Proben auf das Agarosegel. Nach der Agarosegelelektrophorese wurde ein Bild des verdauten und unverdauten Vektors aufgenommen. Anschließend wurde der verdaute Vektor auf einer Höhe von 9283 bp an einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Eppi überführt. Der Vektor wurde mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits aufgereinigt und anschließend die Konzentration am NanoDrop-Photometer gemessen.

Es folgte die Ligation des Vektors mit dem ds Primer nach folgendem Protokoll:

#### Kontrollansatz ohne Primer

T4 Ligase Buffer (10x)	1 µl
T4-Ligase	1 µl
pU6-Cas9	mindestens 70 ng
H <sub>2</sub> O	bis zu 10 µl

#### 1:3 Ligation

T4 Ligase Buffer (10x)	1 µl
T4-Ligase	1 µl
pU6-Cas9	mindestens 70 ng
ds Primer	3 µl
H <sub>2</sub> O	bis zu 10 µl

#### 1:7 Ligation

T4 Ligase Buffer (10x)	1 µl
T4-Ligase	1 µl
pU6-Cas9	mindestens 70 ng
ds Primer	7 µl
H <sub>2</sub> O	bis zu 10 µl

Die Ansätze wurden bei 4 °C über Nacht ligiert und die Ligation bei -20 °C gelagert. Nach erfolgreicher Ligation wurden die Ansätze in *E.coli*-TOP10 mittels Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden die Bakterien zunächst auf Eis getaut und kurz mithilfe einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Parallel wurde SOC-Medium und Agarplatten mit Ampicillin bei 37 °C angewärmt. Es wurden jeweils 4 µl jedes Ligationsansatzes in 50 µl Bakteriensuspension gegeben und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte in einem 42 °C Wasserbad für exakt 45 s. Die Ansätze wurden

anschließend für 1-2 min auf Eis inkubiert bevor jeweils 1 ml des aufgewärmten SOC-Mediums hinzugegeben wurde. Die Bakteriensuspensionen wurden anschließend bei 37 °C auf einem Heizschüttler bei 300 rpm für 1 h geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation bei 6000 rpm für 5 min und eine Abnahme des Mediums. Das Bakterienpellet wurde schließlich in 200 µl SOC-Medium resuspendiert und auf Ampicillin-LB Agarplatten ausplattiert. Hierbei wurden 2 Platten pro Ansatz verwendet, es wurden einmal 50 µl der Suspension und einmal 150 µl plattiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die angewachsenen Klone wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und in ein Falcon mit 5 ml LB-Medium + Ampicillin gegeben. Es folgte eine erneute Inkubation der Bakterien bei 37 °C in dem Bakterieneschüttler. Mit der angewachsenen Kolonie wurde schließlich eine Mini-Präparation durchgeführt und eine anschließende Sequenzierung mithilfe des Primers mU6\_For auf den Einbau des Insert in das Plasmid überprüft. Es folgte schließlich eine Midi-Präparation und die Herstellung eines Glycerolsstocks zur langfristigen Lagerung.

#### **Herstellung von Glycerolstocks zur langfristigen Lagerung**

Zur langfristigen Lagerung wurden die Bakterienkulturen bei -80 °C tiefgefroren. Hierfür wurde 1 ml der gewachsenen Bakterienkultur mit 450 µl 50 %igem Glycerol versetzt und in ein Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss überführt. Anschließend konnte das Eppi bei -80°C zur Lagerung weggefroren werden.

#### **Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolation**

Zur Kultivierung von Bakterien wurde zunächst 5 ml LB Medium in ein Falcon gegeben und mit dem passenden Antibiotikum versetzt (i.d.R. Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 25 µg/ml). Die gefrorenen Bakterien im Glycerolstock wurden anschließend mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in das Falcon überführt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C im Bakterieneschüttler. Die angewachsene Bakteriensuspension wurde entweder direkt für eine Mini-Präparation verwendet (falls nur geringe Mengen des Plasmids benötigt wurden) oder für eine Midi-Präparation in einen Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium + Antibiotikum überführt und erneut über Nacht bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert. Nachdem die Kultur dicht angewachsen ist wurde eine Midi-Präparation durchgeführt.

### **4.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **Plasmidisolierung („Midi-Prep“)**

Für den Gebrauch größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde eine Midi-Präparation durchgeführt. Es wurde dabei zunächst, wie oben beschrieben, eine dicht gewachsene Bakterienkultur angezogen. Die Plasmid Präparation erfolgte mithilfe des NucleoBond Xtra Midi Plasmid DNA Purification Kit von Macherey Nagel. Die Bakteriensuspension wurde bei 2500xg für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Das aufgereinigte Plasmid wurde schließlich in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration am NanoDrop-Photometer vermessen.

#### **Plasmidisolierung („Mini-Prep“)**

Eine Mini-Präparation wurde nur dann durchgeführt, wenn das Plasmid in geringen Mengen gebraucht wurde. Die Anzucht der Bakterien erfolgte wie oben beschrieben. Zur Aufreinigung wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid DNA Purification Kit gearbeitet. Die Plasmid-DNA wurde schließlich in 40 µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Konzentration am NanoDrop-Photometer bestimmt.

#### **Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren (hier ausschließlich RNA und Plasmid-DNA) wurde am NanoDrop™ 1000 und 2000 bestimmt. Als Referenzlösung wurde der Puffer oder das H<sub>2</sub>O in welchem die Nukleinsäure gelöst wurde verwendet (hier i.d.R. H<sub>2</sub>O). Es wurde jeweils 2 µl eingesetzt.

#### **Sequenzierung von Nukleinsäuren**

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde von der Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Hierfür wurde 1 µg der DNA mit 2 µl des Sequenzierungsprimers (10 µM) und H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 14 µl aufgenommen und anschließend zur Sequenzierung verschickt.

#### **Agarosegelelektrophorese**

Zur Auftrennung und Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die negativ-geladene Plasmid-DNA wandert hierbei durch das Gel zur Anode. Größere Fragmente sind aufgrund des Gel-Widerstands langsamer als kleinere. Der prozentuale Anteil an Agarose des Gels bestimmt dabei die Größe der Poren. Eine höhere Prozentigkeit war mit einer kleineren

Porengröße gleichzusetzen. Das Gel wurde nach dem obigen Rezept (Abschnitt 4.1.4) gegossen. Für ein kleines Gel konnte 100 ml angesetzt werden, für ein großes 200 ml. Je nach Größe des Plasmids wurde eine Prozentigkeit der Agarose von 1-2 % verwendet, 1 % für große DNA-Fragmente (über 1000 bp), 2 % für kleine Fragmente. Die Gelsuspension wurde anschließend in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Es folgte ein erneutes Abkühlen der Gellösung bis diese handwarm war, erst dann konnte der DNA-Farbstoff (Midori Green Advanced DNA Farbstoff) hinzugegeben werden. Das Gel musste nun in die Gießapparatur mit gewünschtem Kamm gegossen werden. Nach Aushärten des Gels konnte der Kamm entfernt und das Gel in die Laufkammer überführt werden. Das Agarosegel musste nun vollständig mit 1x TAE-Puffer umgossen werden, auch die Taschen sollten gefüllt sein. Es folgte die Auftragung der Proben und des Standards (10 µl je nach Fragmentgröße entweder 100 bp oder 1 kb Standard). Die Proben wurden vollständig geladen, da i.d.R. anschließend eine Gelextraktion stattfand. Das Gel lief bei 60-80 V, die Dauer hing von der Größe der Fragmente ab. Bei größeren Fragmenten ist es ratsam das Gel länger laufen zu lassen. Nach dem Gellauf wurde an einem UV-Tisch ein Bild aufgenommen und das passende Fragment für eine Aufreinigung ausgeschnitten und in ein Eppi überführt.

### **RNA-Isolation und cDNA-Herstellung**

Für eine RNA-Isolation wurden das Medium auf den Zellplatten vollständig abgenommen und die Zellen 1x mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten bei -80 °C gelagert, bis zur RNA-Isolation. Die RNA-Isolation wurde mithilfe des NucleoSpin® RNA (250) Kits von Macherey-Nagel durchgeführt. Die Zellkulturplatten wurden vor Zugabe des Lysepuffers nur leicht angetaut. Die anschließende Aufreinigung fand nach dem Protokoll des Herstellers statt. Hydrogelplatten dagegen durften nicht bei -80 °C gelagert werden, die RNA musste direkt isoliert werden. Eine erfolgreiche Lyse konnte zudem nur durch auf- und abpipettieren erreicht werden, es war stet darauf zu achten keine Gelreste auf die Säulen zu pipettieren, da dies eine erfolgreiche RNA-Isolation verhinderte. Das Aufreinigungsprotokoll selbst blieb jedoch gleich. Die aufgereinigte RNA wurde schließlich in einem Volumen von 40 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und am NanoDrop-Photometer vermessen. Zur Herstellung von cDNA wurde nach dem *iScript™ cDNA Synthesis Kit*-Protokoll gearbeitet. Eingesetzt wurde jeweils 1 µg RNA und nach Durchlauf der cDNA-Synthese wurde die cDNA mit 40 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Das Syntheseprogramm war dabei folgendes:

25 °C 5 min	Priming
42 °C 30 min	Reverse Transkription
85 °C 5 min	Reverse Transkriptase Inaktivierung

### **Real-Time-(RT)-qPCR**

Für eine RT-qPCR wurden die Primer und die cDNA nach folgendem Protokoll eingesetzt, die Berechnung ist dabei pro Well:

1 µl cDNA
5 µl Absolute qPCR SYBR Green Mix (2x)
0,2 µl Primer fwd
0,2 µl Primer rev
3,6 µl H <sub>2</sub> O

Es wurden i.d.R. Duplikate gemessen. Die Platte wurde anschließend kurz abzentrifugiert und die RT-qPCR wurde in der Mx3005P qPCR-Maschine durchgeführt. Alle verwendeten RT-qPCR-Primer wurden in einer Art erstellt, dass sie dieselbe Annealing-Temperatur von 65°C besaßen. Das Programm der RT-qPCR war folgendes:

95 °C 15 min	
95 °C 15 s	} 40 Zyklen
65 °C 20 s	
72 °C 15 s	
95 °C 1 min	
65 °C 30 s	
95 °C 30 s	

Nach dem Durchlauf des Programms wurden die Schmelzkurven analysiert, um eine mögliche Verunreinigung oder einen fehlerhaften Durchlauf auszuschließen. Anschließend wurden die Ct-Werte der einzelnen Wells in ein Excel-Dokument exportiert und ausgewertet.

### **SDS-PAGE**

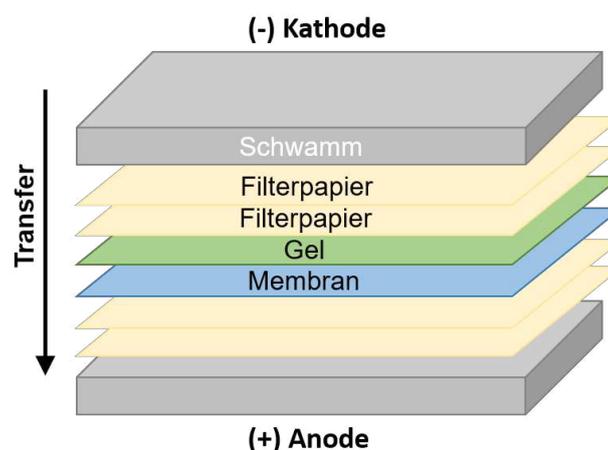
Zur Auftrennung von denaturierten Ganzzellproteinlysaten nach ihrer Größe wurde eine Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Es wurde dabei zunächst ein Polacrylamid-Gel nach Anleitung in einem Biorad Gießstand

gegossen. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurde 10-15 % Polyacrylamid verwendet. Die Kämme besaßen dabei eine breite von 1,5 mm. Die Gele wurden anschließend in das BioRad-System engespannt und vollständig mit Laufpuffer umgossen. Es folgte die Beladung der Gele zunächst mit 8 µl eines Proteinstandards (ProteinLadder) und den jeweiligen Lysaten. Es wurde dabei eine Menge von 15-30 µl Lysat verwendet, je nach Proteinmenge. Die Gele wurden anschließend bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel gestartet. Sobald die Proteinproben die Sammelgelschicht passiert hatten, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Die Dauer der Auftrennung war dabei abhängig von der Menge an Polyacrylamid im Trenngel und der Größe des zu detektierenden Proteins. Nach erfolgreicher Durchführung der SDS-PAGE wurde direkt im Anschluss ein Western Blot-Transfer (siehe Abschnitt 4.2.4) durchgeführt.

#### 4.2.4 Immunbiologische Methoden

##### Western-Blot

Der Western-Blot mithilfe des Tank-Blot Systems folgte direkt nach Durchführung der SDS-PAGE, die aufgetrennten Proteine sollten dabei auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Die Gele wurden zunächst aus den Glasplatten befreit und in 1x Transferpuffer (4 °C) gelegt, ebenso wie die Filterpapiere. Die PVDF-Membranen mussten zunächst mit 100 % Methanol aktiviert und ebenfalls kurz in den 1x Transferpuffer gelegt werden. Die Reihenfolge der Western-Blot-Kassetten war folgende:



**Abbildung 6: Der Aufbau eines Western-Blot.** Das Gel und die Membran liegen zwischen Filterpapieren und Schwämmen. Der Proteintransfer erfolgt vom Gel auf die Membran in Richtung der Anode.

Es war hierbei wichtig die Reihenfolge und die Transferrichtung von Kathode zu Anode zu beachten. Die Kassetten wurden anschließend in die BioRad-Einsätze für Western Blot gespannt. In die Kammern wurde sowohl ein Kühlpack als auch ein Magnetrührfisch gegeben, bevor sie mit kaltem (4 °C) Transfepuffer gefüllt wurde. Der Transfer erfolgte bei 350 mA für 70 min auf einem Magnetrührgerät. Die Membranen wurden anschließend bei RT getrocknet und für 1 h bei RT in 5 % Milch/TBST auf einem Schüttler blockiert. Die gewünschten primären Antikörper wurden je nach Angabe des Herstellers in 5 % BSA/TBST oder 5 % Milch/TBST verdünnt, genauere Informationen befinden sich in der Materialliste unter Antikörper. Die Membranen wurden mit den Antikörpern in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Es folgten 3x Waschschriffe mit 1x TBST jeweils für 10 min auf dem Schüttler. Der Sekundäantikörper wurde stets in 5 % Milch/TBST angesetzt. Je nach Antikörper musst anti-rabbit, anti-mouse oder anti-goat verwendet werden, die Konzentration befindet sich in Tabelle 9. Es folgte eine Inkubation bei RT für mindestens 2 h auf einem Schüttler. Die Membranen wurden anschließend 3x in 1x TBST gewaschen und konnten nun detektiert werden. Zur Detektion wurden die Membranen mit der Proteinseite in Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat gelegt. Die beiden ECL-Substrate wurden zuvor 1:1 gemischt und somit die Reaktion gestartet. Bei schwer zu detektierenden Proteinen wurde entweder SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate oder eine Mischung von 1:1 von beiden (ECL und Femto) verwendet. Die Detektion erfolgte mit Fuji Super RX-Filmen an dem Röntgenfilm-Prozessor SRX-101A. Es wurden dabei verschiedene Belichtungszeiten aufgenommen. Als Ladekontrolle wurde in jedem der nachfolgenden Western-Blot Experimente zusätzlich das Protein  $\beta$ -ACTIN detektiert, um einen Pipettierfehler oder das fehlerhafte Herstellen von Lysaten auszuschließen.

### **Immunfluoreszenz**

Die Zellen wurden nach Kultivierung 2x mit DPBS gewaschen und anschließend 10 min bei RT in 4 % Formaldehydlösung fixiert. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit DPBS und zur Permeabilisierung eine Behandlung der Zellen mit 0,5 % Triton-X-100 bei RT für 5 min. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut mit 1x DPBS gewaschen und für 1 h bei RT in 10 % FCS in 1x PBS blockiert. Die Antikörper wurden in DPBS mit 10 % Serum (der Quelle des Zweitantikörpers) und 0,1 % Saponin nach Angaben des Herstellers verdünnt. Für jedes Deckgläschen wurde 100  $\mu$ l der Antikörperlösung hergestellt und diese wurden auf Parafilm über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Zweitantikörper wurde stets 1:400 in in DPBS mit 10 % Serum (der Quelle des Zweitantikörperst) und 0,1 % Saponin verdünnt. Da der Zweitantikörper mit einem lichtsensitivem Fluorchrom gekoppelt ist, sollte hierbei immer im Dunkeln gearbeitet

werden, da diese sonst ihre Fluoreszenz-Intensität verlieren. Die Deckgläschen mussten zunächst in 1x DPBS gewaschen werden und wurden anschließend in 100 µl des Zweitantikörpers für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte erneut ein Waschschrift in DPBS und abschließend in Wasser um Salzkristallbildung zu verhindern. Abschließend wurden die Deckgläschen auf einen 15 µl Tropfen von Vectaschild mit DAPI auf den Objektträger gegeben. Die Versiegelung der Deckgläschen erfolgte mit Nagellack. Die Zellen konnten daraufhin am Konfokalmikroskop oder Weitfeldmikroskop untersucht werden. Derselbe Prozess wurde auch mit Hydrogel-Deckgläschen durchgeführt, die Waschschrift wurde hier etwas verlängert und es musste darauf geachtet werden das Gel nicht zu beschädigen oder zu verlieren.

#### **4.2.5 Biochemische Methoden**

##### **Luciferase-Reporterassay**

Für einen Luciferase-Reporterassay wurden die Zellen in der Regel in 12-Well-Platten kultiviert und behandelt. Es folgte ein Waschschrift mit 1x DPBS und die Zellen wurden anschließend mit 200 µl 1x Passive Lysis Buffer (PLB) lysiert. Für eine vollständige Lyse wurden die Platten für 30 min bei RT auf einen Orbitalschüttler gestellt. Der Luciferase-Assay erfolgte in speziellen Platten (weiß, runder Boden). Es wurden immer Triplikate gemessen, dazu wurde jeweils 50 µl des Zelllysats im Triplikat in die Platte übertragen. Die Platte wurde schließlich am Orion L microplate Luminometer vermessen. Eingesetzt wurde hierbei die Beetle-Juice Luciferase Assay Firefly Mixtur. Die Maschine setzte 50 µl dieser Mixtur pro Well ein, um anschließend für 5 s die Lichtemission zu messen.

##### **Alkalischer Phosphatase-Assay (AP-Assay)**

Für den AP-Assay wurden C3H10T1/2-Zellen auf Hydrogel-Deckgläschen in einer 12-Well-Platte 100 % konfluent ( $5 \times 10^5$  Zellen pro Well) ausgesät. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten, wurde das Medium zu 0,5 % FCS-DMEM gewechselt und der Hh-Aktivator SAG (100 nM) zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 4 d bei 37 °C. Die Deckgläschen wurden anschließend in eine frische 12-Well-Platte überführt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen 1x mit DPBS gewaschen. In jedes Well wurde 200 µl 1x PLB gegeben und die Platte für 20 min bei RT auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die Lysate mussten daraufhin sowohl für den AP-Assay als auch für einen Bradford-Assay in eine 96-Well-Platte, farblos überführt werden. Für den AP-Assay wurde dafür jeweils 20 µl Lysat pro Well im Triplikat überführt, für den Bradford-Assay jeweils 5 µl jedes Lysats im Triplikat. Die Lösungen des AP-Assay-Kits mussten

anschließend 1:1 gemischt werden und jeweils 200 µl dieses Gemisch pro Well pipettiert werden. Die Platte wurden bei RT im Dunkeln gelangert und jeweils nach 30 min wurde eine Endpunkt-Messung am SPECTRA MAX340 (für Multiwell-Platten) bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt, bis keine Veränderung des Farbumschlags mehr sichtbar war. Für den Bradford-Assay wurde das 5x Reagenz mit H<sub>2</sub>O auf eine 1x Mischung verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl der Bradford-Reagenz in die Lysate gegeben, sowie eine Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen an BSA in PLB angefertigt. Die Messung des Bradford-Assays fand ebenfalls am SPECTRA MAX340 (für Multiwell-Platten) als Endpunkt-Messung bei 595 nm statt.

### **Gewinnung Ganzzellproteinextrakte**

Für die Gewinnung von Ganzzellproteinextrakten für Western Blot-Analysen wurde zunächst das Medium in den Kulturplatten abgenommen. Es folgten ein Waschschrift mit 1x DPBS und eine anschließende Zugabe von 1x SDS-Ladepuffer. Dieser wurde aus einem 5x Stock mit 1x DPBS hergestellt. Die Zellen wurden durch kratzende und rührende Bewegungen mit einer Pipette vermischt und in ein Eppi überführt. Das Lysat wurde anschließend bei 100 °C für 10 min aufgekocht und auf Eis abgekühlt. Die Proben konnten entweder direkt für eine SDS-PAGE verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

### **4.2.6 Xenograft-Experiment**

Für das Xenograft-Experiment wurden weibliche, athymische Nacktmäuse verwendet. Diese wurden willkürlich in drei Gruppen aufgeteilt und jeweils mit einer Kombination an Tumor- und Stromazellen resuspendiert in 200 µl DMEM behandelt:

Gruppe 1:  $0,5 \times 10^6$  PaTu8988T

Gruppe 2:  $0,5 \times 10^6$  PaTu8988T +  $1 \times 10^6$  mPSC4

Gruppe 3:  $0,5 \times 10^6$  PaTu8988T +  $1 \times 10^6$  mPSC4 [ItgaV KO]

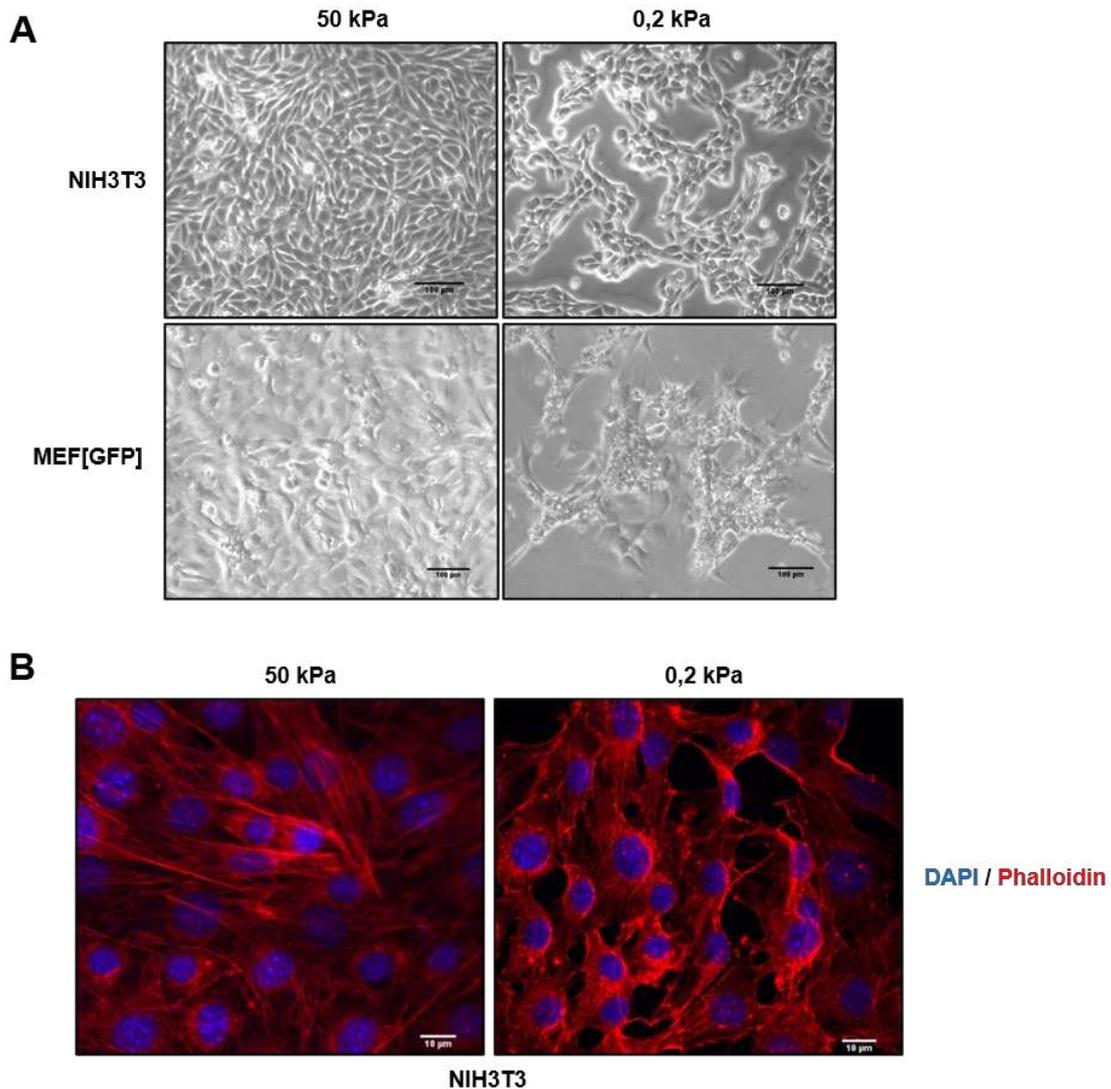
Die Zellsuspensionen wurden subkutan in die posterioren Flanken der Mäuse injiziert. Das Volumen der wachsenden Tumore wurde in regelmäßigen Zeitabständen überprüft und mithilfe der Formel **(LängexBreite<sup>2</sup>)/2** bestimmt. Die Länge stellt dabei die längere Achse und die Breite die kürzere Achse des Tumors dar. Nach Erreichen des Endpunktes wurden die Mäuse euthanasiert und der Tumor entnommen.

## 5. Ergebnisse

Ein erhöhter Härtegrad des Gewebes hat Einfluss auf eine Vielzahl von Zelltypen, einschließlich Fibroblasten. In einigen Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Festigung des Gewebes die Bildung von Fibrose unterstützt oder die Proliferation und Chemotherapieresistenz von Tumorzellen beispielsweise des HCC verbessert [260, 372]. Im Folgenden soll der Effekt einer Verhärtung des Gewebes auf unterschiedliche mechanosensitive Signalwege und Proteine untersucht werden, unter anderem dem Hh-Signalweg und dem metabolischen Masterregulator AMPK. Die gewonnenen Ergebnisse sollen anschließend einen genaueren Einblick in die Tumor-Stroma-Interaktion des bekannten soliden Tumors PDAC geben und damit eine mögliche Hilfestellung für neue Therapieansätze aufzeigen.

### 5.1 Der Stabilisierungsmechanismus des AMPK-Proteins in Zellen auf festem Untergrund

Zur Imitation weichen und festen Untergrunds konnten keine herkömmlichen Zellkulturschalen verwendet werden, weshalb sogenannte Softwells oder auch Hydrogele benutzt wurden. Diese Hydrogele sind Zellkulturschalen, die mit einer Gelmatrix aus Polyacrylamid, vernetzt mit Bisacrylamid, beschichtet sind. Die Menge an Polyacrylamid und Bisacrylamid kann den Härtegrad beeinflussen, der durch das Elastizitätsmodul (Youngsches Modul) in kPa angegeben wird. Zudem wurden die verwendeten Hydrogele mit Kollagen-I beschichtet, welches ein Bestandteil der normalen extrazellulären Matrix darstellt und somit eine erfolgreiche Kultivierung der Zellen sicherstellte. Innerhalb dieser Arbeit wurden Hydrogele mit zwei verschiedenen Härtegraden verwendet: 50 kPa zur Imitation festen, kanzerogenen Gewebes und 0,2 kPa zur Imitation weichen, gesunden Gewebes [352, 379].



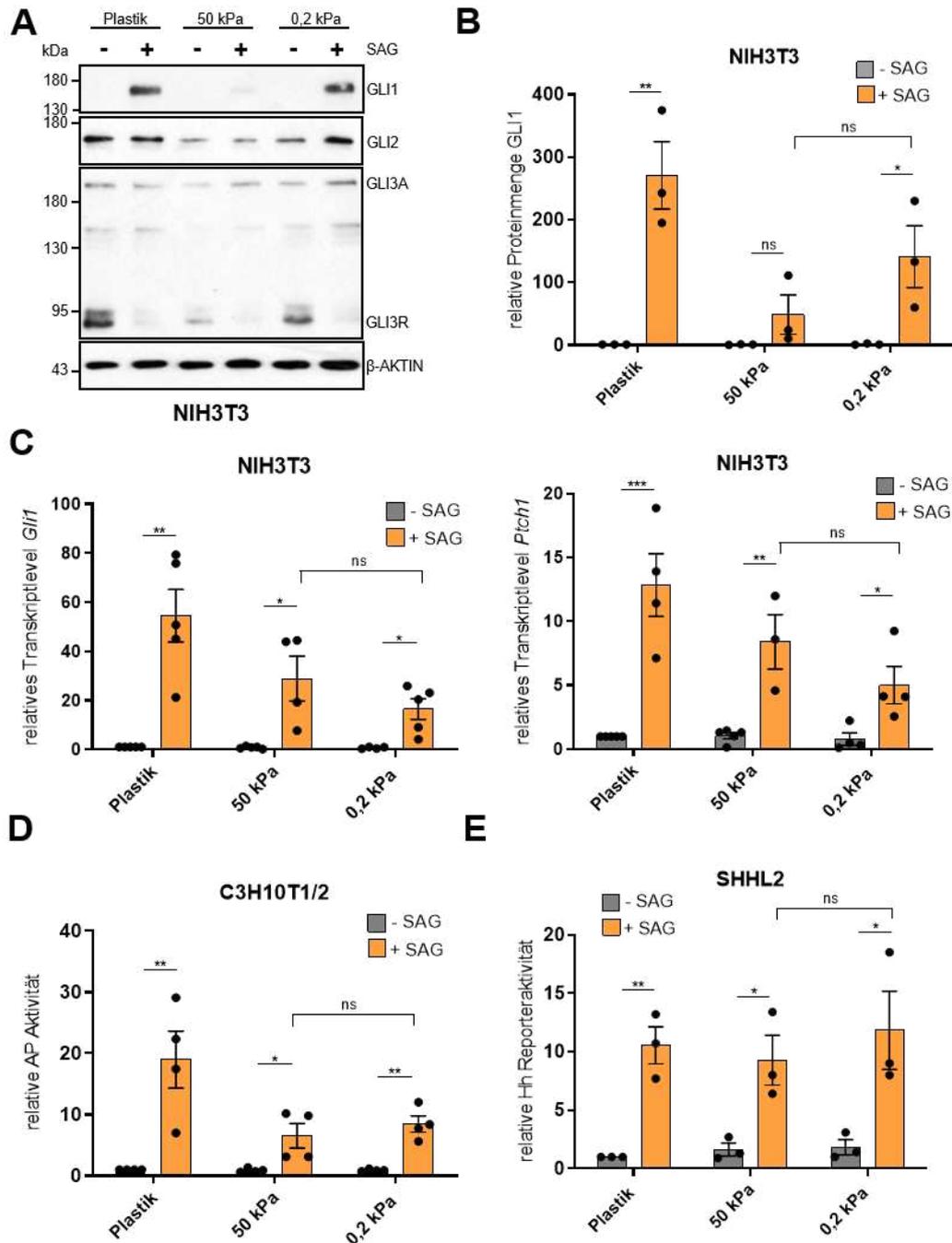
**Abbildung 7: Die Veränderung der Fibroblasten-Morphologie durch die Untergrundhärte.** Fibroblasten wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät und in 0,5 % FCS DMEM für 2 d kultiviert. (A) Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von NIH3T3 und MEF[GFP] in einer 10x Vergrößerung durchgeführt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m (B) Das Aktinzytoskelett der NIH3T3-Fibroblasten wurden mit dem Phalloidin-California-Red Konjugat (rot) und der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt. Es wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach-Zoom durchgeführt. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Die Kultivierung von Mausfibroblasten auf Hydrogelen unterschiedlichen Härtegrades hatte bereits eine morphologische Veränderung zur Folge, die lichtmikroskopisch analysiert werden konnte (Abb. 7A). Sowohl NIH3T3 als auch MEF[GFP] besaßen auf harten Gelen die typische elongierte Erscheinung und verteilten sich gleichmäßig über die ganze Kulturschale. Die Zellen auf 0,2 kPa Gelen dagegen waren rundlicher und weniger verteilt. Die Vermutung lag nahe, dass es sich hierbei um eine Reorganisation des Aktinzytoskelett handelte. Dieses spielt bei dem Prozess der Mechanotransduktion über die FAs eine essentielle Rolle und kann durch Reorganisation die Morphologie von Zellen beeinflussen [100, 407]. Eine Färbung des Aktinzytoskelett mithilfe des Phalloidin-

California-Red Konjugates zeigte einen deutlichen Unterschied in dessen Anordnung (Abb. 7B). Phalloidin ist ein Cyclopeptid, welches eine Affinität zu Aktinfasern (F-Aktin), nicht aber zu monomerem G-Aktin besitzt und daher geeignet war, das Zytoskelett sichtbar zu machen. Während das F-Aktin in Fibroblasten bei 50 kPa die typischen, langen Fasern bildete, welche sich durch die gesamte Zelle zogen, wirkte das Zytoskelett in Zellen bei 0,2 kPa gebrochen und nur wenige, lange Fasern waren noch zu erkennen. Dieser Unterschied könnte entscheidend für das Verhalten der Zellen in verschiedenen Gewebehärten sein. Das Aktinzytoskelett selbst besitzt eine Vielzahl von Funktionen, eine davon ist die Ziliogenese [104]. Das Primärzilium ist entscheidend für den Hh-Signalweg. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob die Härte des Untergrunds nicht nur das Aktinzytoskelett, sondern auch damit zusammenhängende Signalwege wie etwa den Hh-Signalweg beeinflusst.

### **5.1.1 Der Härtegrad des Untergrunds hat nur bedingt Einfluss auf den Hh-Signalweg von Fibroblasten**

Der Hh-Signalweg spielt vor allem in der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation und der Gewebsmusterung eine wichtige Rolle [195]. Der Signalweg ist in Fibroblasten nicht aktiv und musste daher zunächst mithilfe des *smoothed agonist* SAG chemisch aktiviert werden. SAG gehört zu der Familie der Chlorobenzothiophenen, es agiert unabhängig von PTCH und bindet direkt an SMO, wodurch der nachgeschaltete Signalweg aktiviert wird [69]. Ein entscheidender Marker für einen aktiven, kanonischen Hh-Signalweg ist ein erhöhter Level des Transkriptionsfaktors GLI1. Die NIH3T3-Fibroblasten wurden auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und für 48 h in 0,5 % FCS DMEM mit dem Hh-Aktivator SAG behandelt. Die Proteinanalyse mittels Western-Blot zeigte einen deutlichen Anstieg der GLI1-Expression in Fibroblasten auf weichem Untergrund, während kein Anstieg auf hartem Untergrund zu erkennen war (Abb. 8A). Interessanterweise verschwand nach Zugabe von SAG die GLI3-Repressorform und es kam zu einer Zunahme der GLI3-Aktivatorform unter beiden Bedingungen. Dies deutete ebenfalls auf einen aktiven Hh-Signalweg hin. Die Quantifizierung der Immunoblots bestätigte sowohl auf Plastik als auch auf den weichen Gelen einen signifikanten Anstieg der GLI1-Proteinexpression nach SAG-Gabe (Abb. 8B). Im Gegensatz dazu stand die relative *Gli1*-Transkriptmenge: Es konnte ein erhöhtes Transkriptlevel von *Gli1* unter harten Bedingungen (Plastik und 50 kPa Gel) gemessen werden. Die Menge unter weichen Bedingungen war zwar signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle ohne SAG, aber dennoch geringer als bei 50 kPa (Abb. 8C).

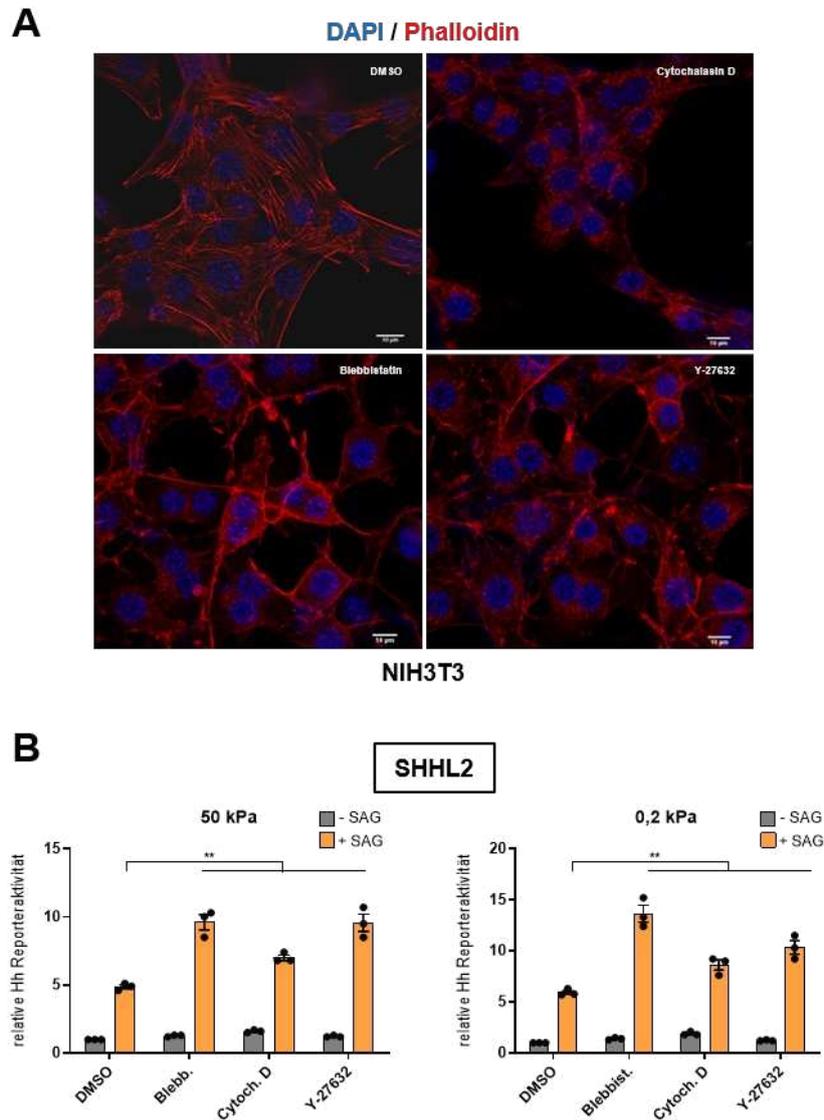


**Abbildung 8: Der geringe Einfluss der Untergrundhärte auf den Hh-Signalweg.**

Verschiedene Maus-Zelllinien wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät, es folgte eine Behandlung mit SAG (100 nM) für 48 h oder 4 d (AP-Assay) in 0,5 % FCS DMEM. (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der GLI-Transkriptionsfaktoren in NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt; β-AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 4 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD. (C) Es wurde eine RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Gli1* und *Ptch1* in NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von n = 3 unabhängigen Experimenten ± SD. (D) Es wurde ein Alkalischer-Phosphatase-Assay zur kolorimetrischen Detektion der AP-Aktivität von C3H10T1/2-Zellen durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von n = 4 unabhängigen Experimenten ± SD. (E) Es wurde ein Luciferase-Assay zur Detektion der Hh-Reporteraktivität in SHHL2-Fibroblasten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von n = 3 unabhängigen Experimenten ± SD.

Dieses Ergebnis konnte auch anhand der Analyse des *Ptch1*-Transkripts bestätigt werden. GLI1 sowie PTCH1 sind nicht nur Teil des kanonischen Hh-Signalwegs, sondern auch deren Zielgene, die durch einen aktiven Signalweg von den GLI-Transkriptionsfaktoren hochreguliert werden [438]. Es wurde jedoch sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptebene deutlich, dass der Unterschied zwischen der Menge an GLI und somit der Stärke des Signalwegs bei 50 kPa und 0,2 kPa statistisch nicht signifikant war. Um die widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse genauer zu untersuchen, wurde ein Alkalischer-Phosphatase-(AP)-Assay durchgeführt. In der murinen, pluripotenten, mesenchymalen Zelllinie C3H10T1/2 kann die Aktivierung des Hh-Signalwegs zur Differenzierung der Zellen in Osteoblasten führen und verbunden damit zur Stimulierung der AP-Aktivität in den Zellen [304]. Die AP-Aktivität und im Umkehrschluss die Hh-Aktivität konnte mithilfe eines kolorimetrischen Assays gemessen werden (Abb. 8D). Die viertägige Gabe von SAG führte zu einem deutlichen Anstieg der AP-Aktivität unter festen und weichen Bedingungen, somit fand die Differenzierung erfolgreich in allen +SAG-Zellen statt. Interessanterweise gab es keinen signifikanten Unterschied der AP-Aktivität zwischen den Zellen auf 50 kPa oder 0,2 kPa Gelen. Es konnte demnach kein Effekt der unterschiedlichen Festigkeit des Untergrunds auf den Hh-Signalweg festgestellt werden. Eine weitere Methode zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse war eine Messung der relativen Hh-Reporteraktivität in einem Luciferase-Assay mithilfe von SHHL2-Zellen. SHHL2-Zellen sind NIH3T3-Mausfibroblasten, die konstitutiv Renilla-Luciferase exprimieren und einen *Gli*-responsiven *Firefly*-Reporter besitzen. Nach Aktivierung des Hh-Signalwegs konnte die *Gli*-Aktivität mit einem Luminometer detektiert werden. Die Behandlung der Zellen mit SAG auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ergab zwar eine erhöhte *Gli*-Aktivität unter allen Bedingungen nach Zugabe von SAG, es gab jedoch, ähnlich den vorhergehenden Experimenten, keinen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen (Abb. 8E).

Die Festigkeit des Untergrunds hatte demnach einen Einfluss auf das Aktinzytoskelett, während es kaum einen Einfluss auf den Hh-Signalweg zu haben scheint. Das Aktinzytoskelett besaß auf weichem Untergrund weniger F-Aktin-Fasern, was auch chemisch durch Aktinmodulatoren imitiert werden konnte. Es wurden daher SHHL2-Zellen mit drei verschiedenen Aktinmodulatoren behandelt. Hierzu gehörten Cytochalasin D, ein Inhibitor der Aktinpolymerisierung, Blebbistatin, ein Inhibitor der Myosin-II-ATPase-Aktivität und Y-27632, ein ROCK-Inhibitor. Die Wirksamkeit der Substanzen auf das Zytoskelett wurde nach Behandlung von NIH3T3-Fibroblasten mittels Phalloidin färbung und anschließenden mikroskopischen Aufnahmen bestätigt (Abb. 9A).

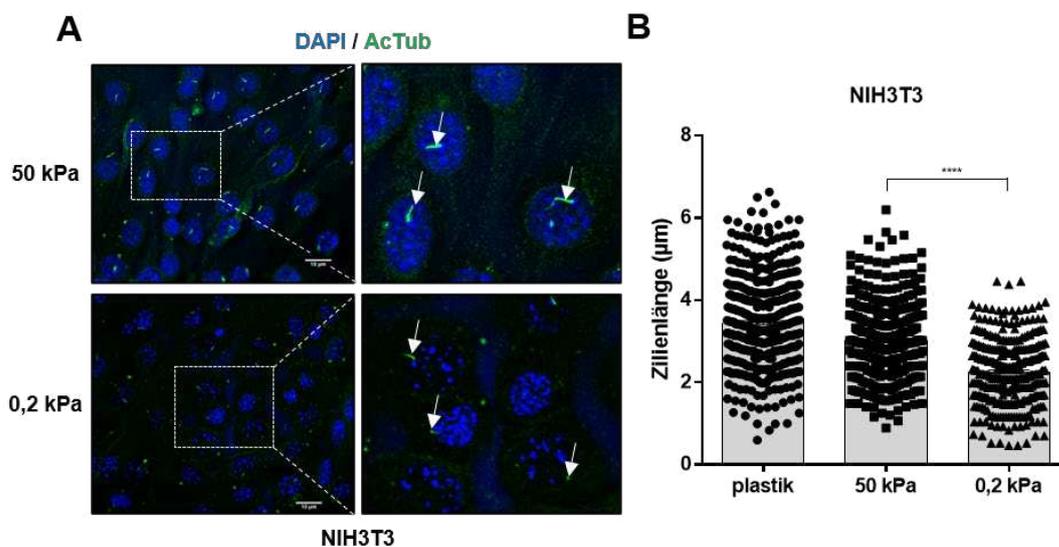


**Abbildung 9: Der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf den Hh-Signalweg.** (A) NIH3T3-Fibroblasten wurden auf Glas-Deckgläschen ausgesät und mit DMSO, Blebbistatin (10  $\mu$ M), Cytochalasin D (1  $\mu$ M) und Y-27632 (10  $\mu$ M) für 8 h in 0,5 % FCS DMEM behandelt. Das Aktinzytoskelett wurde mit dem Phalloidin-California-Red Konjugat (rot) und der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt. Es wurden wefeldmikroskopische Aufnahmen in einer 63x Vergrößerung durchgeführt; gezeigt ist die Maximumintensitätsprojektion. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m. (B) SHHL2-Fibroblasten wurden auf harter (50 kPa) und weicher (0,2 kPa) Gelmatrix ausgesät und mit SAG (100 nM) sowie Aktin/Myosin-Modulatoren behandelt (Blebbistatin 10  $\mu$ M, Cytochalasin D 1  $\mu$ M und Y-27632 10  $\mu$ M). Gemessen wurde die *Gli*-Aktivität mittels Luciferase-Assay. Dargestellt ist der Mittelwert der Triplikate einer Durchführung des Experiments  $\pm$  SD.

SHHL2-Zellen wurden sowohl mit SAG (48 h) als auch mit den Aktinmodulatoren für 24 h auf den weichen und harten Gelen behandelt. Dieses Experiment sollte überprüfen, ob die Behandlung der Zellen auf hartem Untergrund mit den Modulatoren zur Simulation des Aktinzytoskeletts auf weichem Untergrund einen Effekt auf den Hh-Signalweg besitzt. Die Daten zeigten, dass alle drei Modulatoren einen signifikanten Effekt auf die *Gli1*-Aktivität in SHHL2 nach SAG-Gabe besaßen (Abb. 9B). Dieser stimulierende Effekt war bei Zellen auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen messbar, es konnte somit keine eindeutige

Verbindung zwischen dem Härtegrad des Untergrunds über das Zytoskelett zum Hh-Signalweg hergestellt werden.

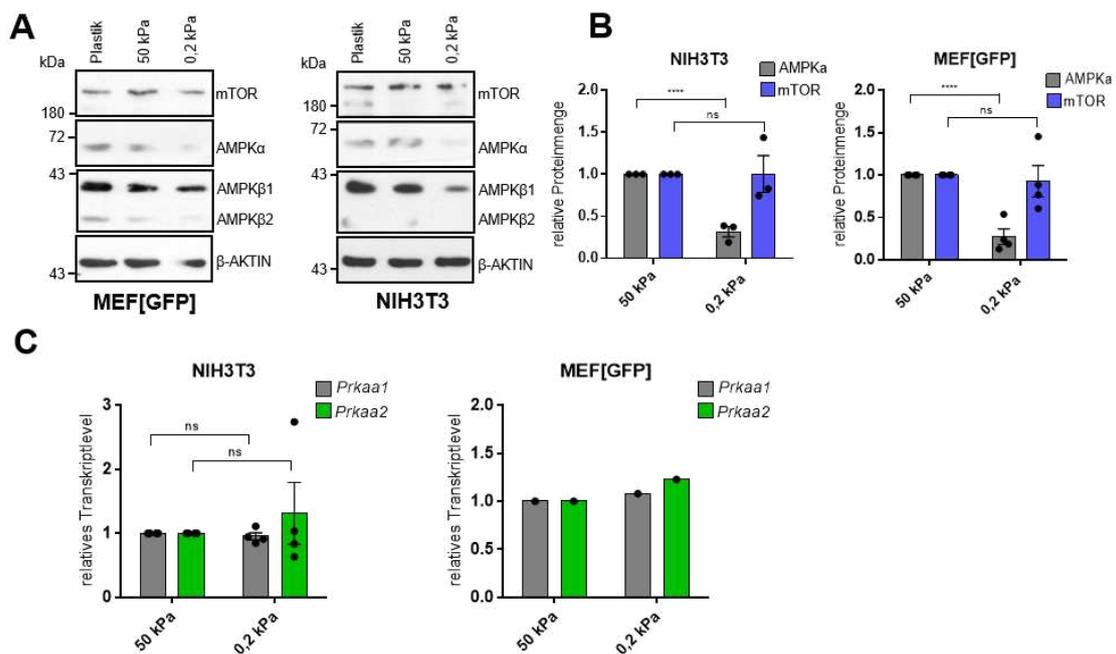
Für den kanonischen Hh-Signalweg ist das Primärzilium von entscheidender Bedeutung, da SMO bei einem aktivem Signalweg in das Zilium relokalisiert und nachgeschaltete Signale aktiviert [85]. Zudem ist bekannt, dass das Aktinnetzwerk einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung und die Länge des Ziliums hat [467]. Im nächsten Schritt sollte daher die Länge der Zilien in NIH3T3-Fibroblasten, gesät auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen, untersucht werden. In einem Immunfluoreszenz Experiment wurden die Primärzilien mithilfe eines Antikörpers gegen acetyliertes Tubulin angefärbt und vermessen. Sowohl auf hartem als auch auf weichem Untergrund besaßen etwa 90 % der NIH3T3-Zellen ein Primärzilium, die Härte des Untergrunds hatte somit keinen Einfluss auf deren Anzahl (Abb. 10A). Die Messung der Zilienlänge zeigte allerdings einen signifikanten Unterschied. Die Zilien der Zellen auf weichem Untergrund waren deutlich kleiner als auf hartem Untergrund (Abb. 10B).



**Abbildung 10: Längere Primärzilien in Zellen auf hartem Untergrund.** NIH3T3-Fibroblasten wurden auf Deckgläschen, beschichtet mit einer weichen (0,2 kPa) und einer harter (50 kPa) Gelmatrix, ausgesät. (A) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von acetyliertem Tubulin (AcTub) markiert mit AF488 zur Darstellung der Zilien (grün) und dem Zellkern mit DAPI (blau) durchgeführt. Es folgten konfokalmikroskopische Aufnahme in einer 20x Vergrößerung mit 5fach Zoom. Maßstabsbalken = 10 μm (B) Dargestellt ist die Quantifizierung der Länge der Primärzilien in μm ± SD, jeder Punkt repräsentiert die Länge eines Ziliums.

### 5.1.2 Die Gewebehärte beeinflusst die AMPK-Proteinexpression

Bereits die Gruppe um Park *et al.* [323] fand heraus, dass die Veränderung der Zellumgebung zu einer Reorganisation des Aktinzytoskelett führt und dies Einfluss auf metabolische Signalwege, wie etwa die Glykolyse besitzt. Sie konnten zudem zeigen, dass neben der Glykolyse auch eine Reihe weiterer metabolischer Signalwege unter weichen Bedingungen herunterreguliert wurde [323]. Einer der metabolischen Masterregulatoren ist AMPK. Diese Kinase ist essentiell für die Reprogrammierung des Metabolismus bei Nährstoffmangel. Sie fördert katabolische Prozesse, während sein Gegenspieler mTOR anabolische Prozesse fördert [137]. Es sollte nun untersucht werden, ob die Expression der AMPK ebenfalls durch eine Veränderung der Härte der Umgebung beeinflusst wird. Hierfür wurden zunächst zwei Mausfibroblasten-Zelllinien, MEF[GFP] und NIH3T3, auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und die Menge an AMPK-Protein mittels Immunoblot analysiert (Abb. 11A).



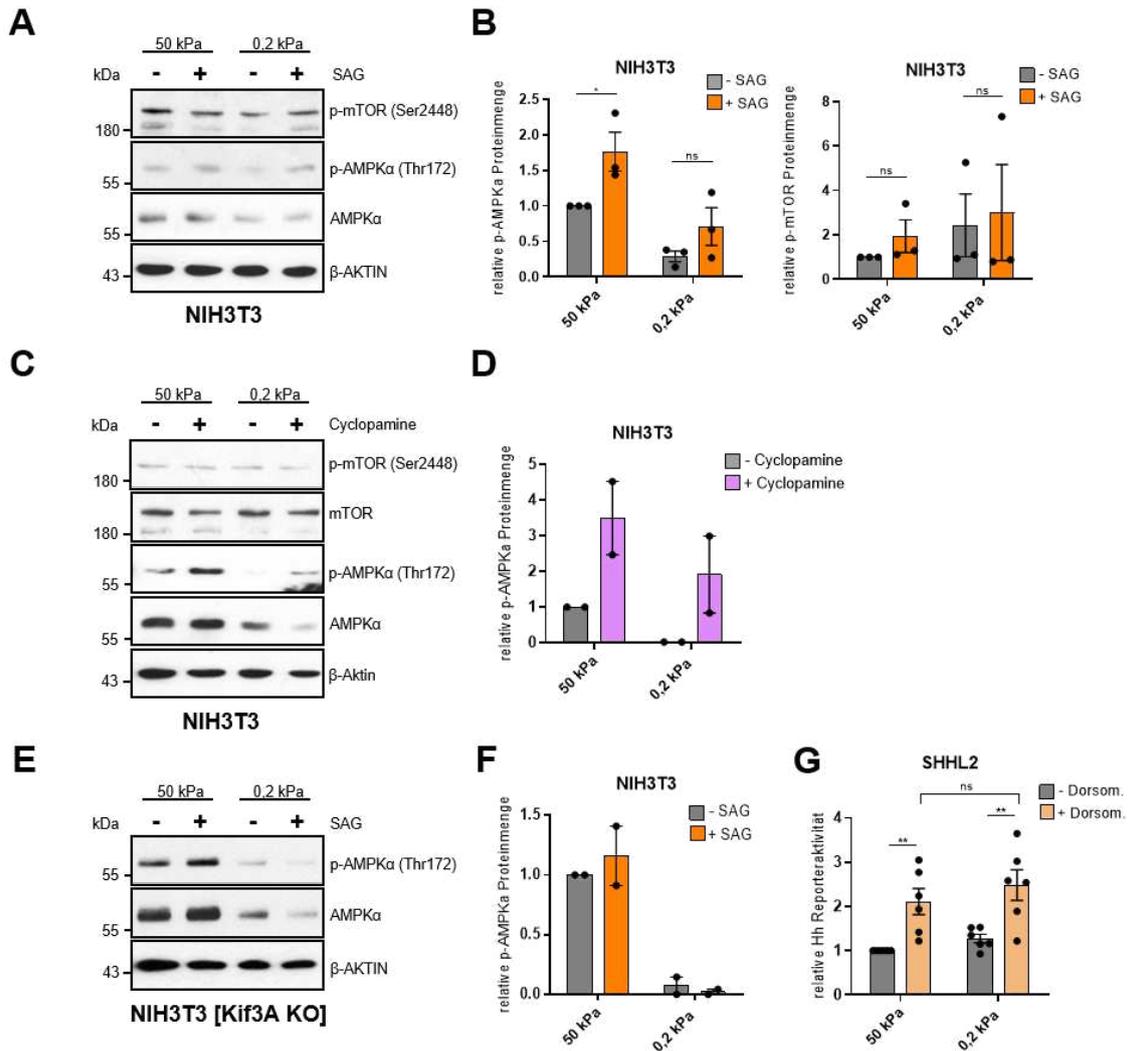
**Abbildung 11: Eine erhöhte AMPK-Proteinexpression in Mausfibroblasten auf hartem Untergrund.** Mausfibroblasten wurden auf harter (50 kPa) und weicher (0,2 kPa) Gelmatrix ausgesät und 48 h in 0,5 % FCS DMEM kultiviert. (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der AMPK- und mTOR-Proteine in NIH3T3 und MEF[GFP] durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von  $n = 3$  unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Prkaa1* und *Prkaa2* in NIH3T3 und MEF[GFP] durchgeführt. Im Graph für die NIH3T3-Fibroblasten ist der Mittelwert von  $n = 3$  unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD dargestellt. Im Graph für MEF[GFP] ist  $n = 1$  Experiment dargestellt.

Sowohl der repräsentative Blot als auch die Quantifizierung (Abb. 11B) zeigten einen signifikanten Anstieg der AMPK-Proteinexpression in Zellen auf hartem Untergrund. Das AMPK-Protein besteht aus einer  $\alpha$ -, zwei  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -UE. Der Anstieg der Proteinexpression in Fibroblasten auf festem Untergrund wurde für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -UE gezeigt. Interessanterweise hatte die Festigkeit des Untergrunds keinen Einfluss auf mTOR, dem Gegenspieler zu AMPK. Der Effekt tritt somit AMPK-spezifisch auf. Die Menge an Protein könnte durch verschiedene Mechanismen reguliert werden, von denen der offenkundigste ein Anstieg der Transkriptmenge ist. Es wurden daher die Level an Transkript der *protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1 (Prkaa1)* und der *protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2 (Prkaa2)* in Fibroblasten auf Hydrogelen mittels RT-qPCR bestimmt (Abb. 11C). Es war jedoch kein signifikanter Unterschied der Transkriptmengen in NIH3T3-Fibroblasten und MEFs zwischen weichem oder festem Untergrund zu erkennen. Es kann daher postuliert werden, dass sich der Effekt der Festigkeit des Untergrunds auf AMPK ausschließlich auf der Proteinebene und nicht auf der Transkriptebene abspielt.

Die niedrigere AMPK-Proteinmenge in Fibroblasten gesät auf weichem Untergrund könnte einen negativen Effekt auf die Funktionen des Proteins innerhalb der Zelle besitzen, daher sollte im Folgenden die Funktionalität des AMPK-Proteins geprüft werden. Innerhalb der Zellen wird die Kinase durch eine Phosphorylierung des Thr172 aktiviert, beispielsweise bei Energiemangel durch die Kinase LKB1 [167] oder durch die unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aktivierte Kinase CAMKK2 [188]. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und somit die Aktivierung von CAMKK2 kann durch die Aktivierung des Hh-Signalwegs erreicht werden. Es wurde bereits beschrieben, dass die nicht-kanonische Aktivierung des Hh-Signalwegs unabhängig von den GLI-Transkriptionsfaktoren zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und somit zur Aktivierung von AMPK führt [413]. Als Funktionalitätstest wurden daher NIH3T3-Fibroblasten auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und für 48 h mit dem Hh-Stimulator SAG behandelt. Die Daten zeigten sowohl im repräsentativen Immunoblot (Abb. 12A) als auch in der Quantifizierung (Abb. 12B) einen deutlichen Anstieg an phospho-(p)-AMPK-Proteinexpression nach Zugabe von SAG bei beiden Härtegraden. Der Gegenspieler mTOR kann ebenfalls durch eine Phosphorylierung (Ser2448) aktiviert werden, die Expression an p-mTOR-Protein blieb jedoch unverändert. Die Phosphorylierung von AMPK über den Hh-Signalweg konnte ebenfalls durch den SMO-Antagonisten Cyclopamine erreicht werden. Es handelt sich dabei um ein steroidales Alkaloid, welches die Akkumulation des Proteins SMO im Zilium induziert, jedoch weitere Signaltransduktion unterbindet [414]. Trotz der Inhibition seiner Signalkaskade ist SMO dennoch in der Lage den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu initiieren und somit theoretisch das AMPK-

Protein zu aktivieren. Für die Verifizierung der Ergebnisse, die mit SAG generiert wurden, wurden daher NIH3T3-Fibroblasten auf den Gelen für 48 h mit Cyclopamine behandelt. Es konnte ebenfalls eine erhöhte Menge an p-AMPK nach Behandlung in Zellen auf festem und auf weichem Untergrund detektiert werden (Abb. 12C/D). Im Gegensatz dazu konnte auch hier kein Effekt auf die Menge an p-mTOR festgestellt werden. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem weiteren SMO-Antagonisten, SANT, für 48 h behandelt. Die Wirkungsweise ist ähnlich der von Cyclopamine, jedoch kann SMO nicht in das Zilium lokalisieren. Es konnte daher kein Anstieg an p-AMPK detektiert werden (Abb. E3), da eine Relokalisierung des SMO essentiell für dessen Wirkweise ist. Das Primärzilium spielt für die SMO-Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivierung von AMPK eine essentielle Rolle. Es sollte nun festgestellt werden, ob der aktivierende Effekt zilienabhängig und somit dem oben beschriebenen Mechanismus über SMO entspricht. Hierfür wurden Kif3A-Knockouts (KO) der NIH3T3-Fibroblasten generiert, KIF3A ist ein entscheidendes Motorprotein für die Ziliogenese [256]. Diese Zellen besitzen demnach kein Primärzilium und sollten nicht in der Lage sein, AMPK durch SAG über SMO zu aktivieren. Die Daten bestätigten die Hypothese, da keine Veränderung der p-AMPK-Proteinexpression in NIH3T3-KO-Fibroblasten nach Behandlung mit SAG sowohl auf 50 kPa als auch auf 0,2 kPa Gelen detektiert wurde (Abb. 12E/F). Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass AMPK trotz der unterschiedlichen Proteinmenge auf weichem und auf hartem Untergrund in derselben Art und Weise auf Stimuli reagierte.

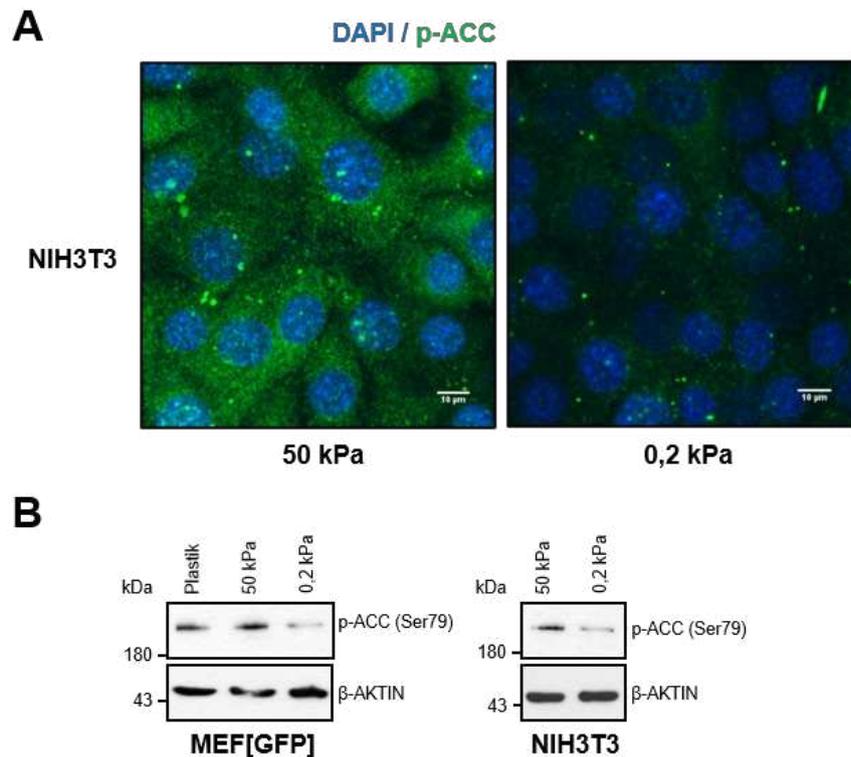
Der Hh-Signalweg hat nicht nur Einfluss auf die Aktivierung von AMPK. AMPK selbst ist ein Regulator von GLI1, einem Transkriptionsfaktor und wichtigem Protein des kanonischen Hh-Signalwegs. AMPK ist in der Lage, GLI1 mittels Phosphorylierung an Ser102 und Ser408 sowie Thr1074 zu destabilisieren, was schließlich zum Abbau führt [252]. Um eine komplette Funktionalität des AMPK-Proteins auf den unterschiedlichen Hydrogelen bestätigen zu können, musste nicht nur überprüft werden, ob die Kinase auf Stimuli anspricht, sondern auch bekannte Funktionen der Signalkaskade erfüllt. Die Behandlung von SHHL2-Fibroblasten, einer Zelllinie deren GLI1-Expression mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt kombiniert ist, mit SAG und dem AMPK-Inhibitor Dorsomorphin führte zu einer signifikant erhöhten *Gli1*-Aktivität sowohl auf den 50 kPa als auch auf den 0,2 kPa Gelen (Abb. 12G). Die Funktionalität der AMPK unter weichen und harten Bedingungen konnte somit in den meisten Experimenten bestätigt werden.



**Abbildung 12: Die Funktionalität des AMPK-Proteins in Fibroblasten auf weichem oder hartem Untergrund.** NIH3T3-Fibroblasten wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät und für 48 h mit den jeweiligen Substanzen in 0,5 % FCS DMEM kultiviert. (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von p-AMPK (Thr172) und p-mTOR (Ser2448) in NIH3T3-Fibroblasten nach Behandlung mit SAG (100 nM) durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von p-AMPK und p-mTOR in n = 3, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von p-AMPK (Thr172) in NIH3T3-Fibroblasten nach Behandlung mit Cyclopamine (10 μM) durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladekontrolle. (D) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von p-AMPK in n = 2, wie in (C) gezeigten Experimenten ± SD. (E) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von p-AMPK (Thr172) in Kif3A-Knockouts der NIH3T3-Fibroblasten nach Behandlung mit SAG (100 nM) durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladekontrolle. (F) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von p-AMPK in n = 2, wie in (E) gezeigten Experimenten ± SD. (G) Es wurde ein Luciferase-Assay zur Detektion der *Gli1*-Expression in SHHL2-Fibroblasten nach Behandlung aller Ansätze mit SAG (100 nM) sowie +/- Dorsomorphin (5 μM) durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von n = 6 Experimenten ± SD.

Ein weiteres bekanntes Substrat von AMPK ist die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC). ACC ist ein essentielles Protein der Fettsäurebiosynthese [440], die eine hohe Menge an ATP verbraucht. Das aktive AMPK phosphoryliert daher ACC am Ser79 und inaktiviert es somit [57, 297]. Der Einfluss von AMPK auf die p-ACC-Proteinexpression in NIH3T3-

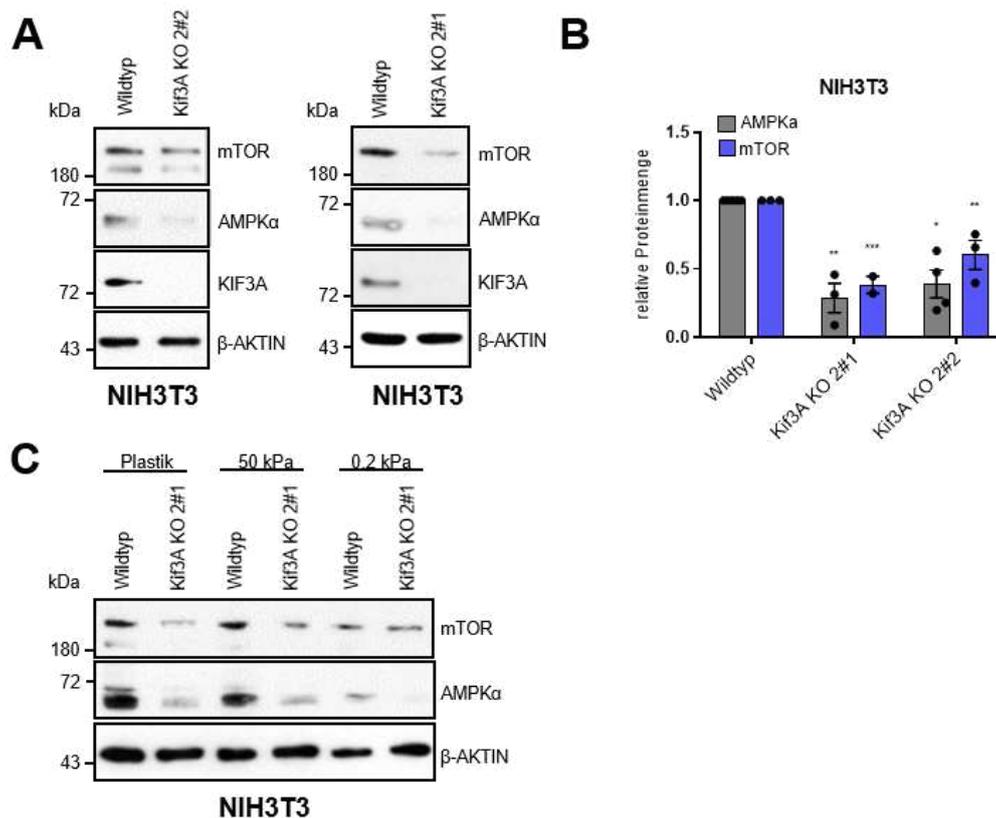
Zellen auf 0,2 kPa und 50 kPa Gelen wurde auf zwei unterschiedliche Arten analysiert. Zum einen wurden die Zellen auf Hydrogel-Deckgläschen gesät und eine Immunfluoreszenzfärbung von p-ACC durchgeführt (Abb. 13A). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten einen deutlichen Abfall an p-ACC in Fibroblasten auf weichem Untergrund. Diese Daten wurden mittels Proteinanalyse in MEF[GFP] bestätigt (Abb. 13B). In dem Immunoblot war ebenfalls ein deutlicher und p-ACC-spezifischer Abfall der Proteinexpression auf weichem Untergrund zu erkennen.



**Abbildung 13: Der Einfluss der Untergrundhärte auf die p-ACC-Proteinexpression.** (A) NIH3T3-Fibroblasten wurden auf Deckgläschen beschichtet mit einer weichen (0,2 kPa) und einer harten (50 kPa) Gelmatrix, ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h in 0,5 %igem FCS DMEM kultiviert. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung von p-ACC (Ser79) markiert mit AF-488 (grün) und dem Zellkern mit DAPI (blau). Es wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach-Zoom durchgeführt. Maßstabsbalken = 10 µm (B) NIH3T3-Fibroblasten und MEF[GFP] wurden auf Zellkulturschalen, beschichtet mit einer weichen (0,2 kPa) und einer harten (50 kPa) Gelmatrix, ausgesät. Die Zellen wurden für 48 h in 0,5 %igem FCS DMEM kultiviert. Es folgte ein Western-Blot zur Detektion von p-ACC (Ser79); β-AKTIN diente als Ladekontrolle.

Anhand der obigen Daten wurde bereits deutlich, welche entscheidende Rolle das Primärzilium für die Aktivierung von AMPK über den Hh-Signalweg spielt. Die Zilien unterschieden sich in ihrer Länge zwischen Fibroblasten auf weichem oder hartem Untergrund (Abb. 9), daher könnte eine Verbindung zwischen der unterschiedlichen Proteinexpression von AMPK und dem Primärzilium bestehen. Zur Analyse dieser Hypothese wurden Proteinlysate von den Kif3A-Knockouts der NIH3T3-Fibroblasten hergestellt, die bekanntermaßen kein Zilium besaßen. Es wurden zwei Knockout-Klone

auf Plastik und der vielversprechendste Klon schließlich auf den Hydrogelen getestet. Die Experimente zeigten einen signifikanten Abfall der AMPK-Proteinexpression in den Zellen ohne Zilium im Vergleich zu Wildtyp-NIH3T3 (Abb. 14A/B). Dieses Ergebnis konnte ebenfalls mit zilienlosen pankreatischen Sternzellen bestätigt werden (Abb. E4). Die Reduktion der AMPK-Proteinexpression konnte zudem auf den 50 kPa und 0,2 kPa Gelen detektiert werden (Abb. 14C). Interessanterweise war ebenfalls ein Abfall der mTOR-Proteinexpression in den Kif3A-Knockout-Fibroblasten sowohl auf Plastik als auch auf den Gelen zu erkennen. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der AMPK-Proteinexpression nicht spezifisch für dieses Protein war. Die vorherigen Ergebnisse zeigten jedoch eine von mTOR unbeeinflusste Reduktion der AMPK-Expression. Dieser Mechanismus der AMPK-Regulation sollte in dieser Arbeit im Vordergrund stehen.

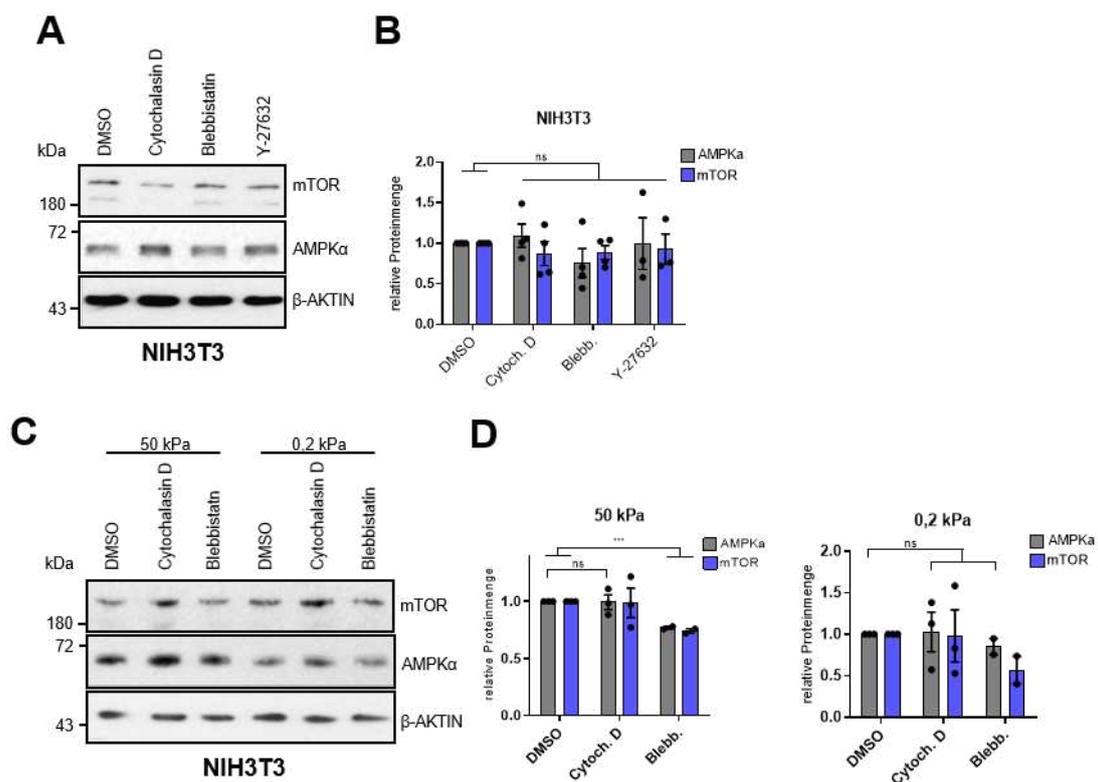


**Abbildung 14: Der Einfluss des Primärziliums auf die Proteinmenge von AMPK und mTOR.**

(A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der AMPK- und mTOR-Proteinmenge in NIH3T3-Wildtyp-Fibroblasten und Kif3A-Knockout-Klonen kultiviert auf Plastik für 48 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der AMPK- und mTOR-Proteinmenge in NIH3T3-Wildtyp und Kif3A-Knockout-Fibroblasten auf einer weichen (0,2 kPa) und harten (50 kPa) Gelmatrix und kultiviert für 48 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle.

### 5.1.3 Das Aktinzytoskelett und mechanosensitive Proteine haben keinen Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression

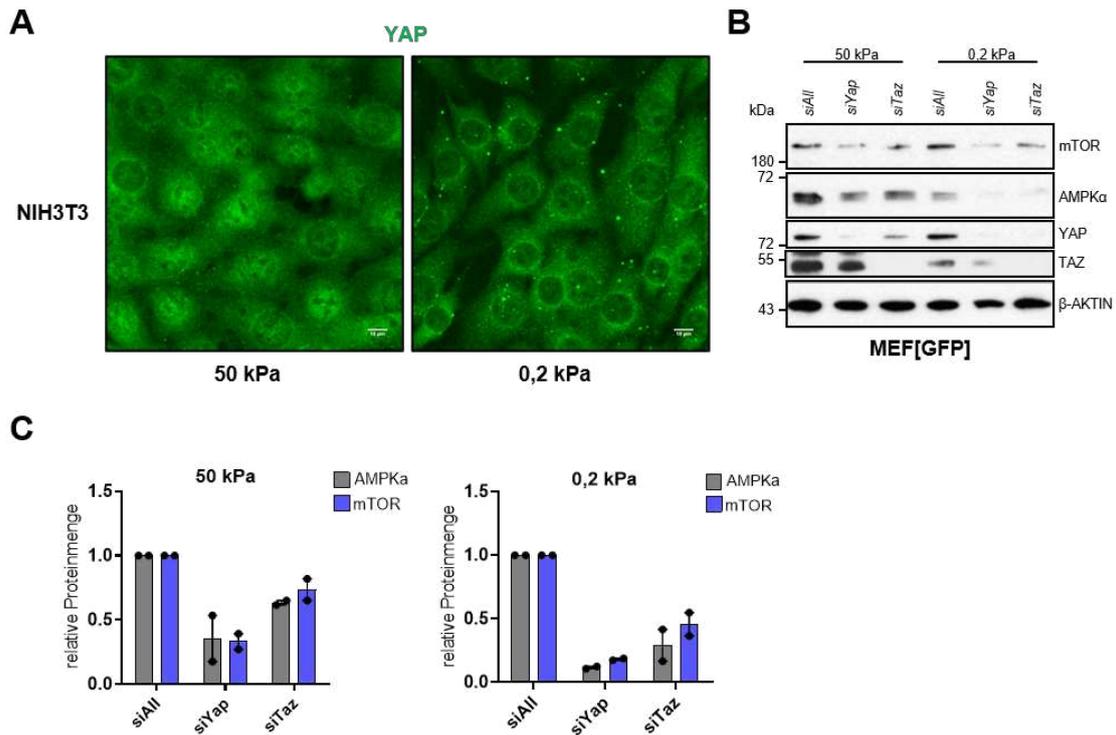
Es war bereits bekannt, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts in Muskelzellen über LKB1 zu einer Inhibierung der AMPK-Aktivierung führen kann [439]. Auch in diesem Fall könnte das Aktinzytoskelett Einfluss auf das AMPK, speziell dessen Proteinexpression besitzen. Es gab einen deutlichen Unterschied der F-Aktin-Fasern in Fibroblasten auf weichem oder hartem Untergrund, was im Zusammenhang mit der Regulation der AMPK-Proteinexpression stehen könnte. Zur genaueren Analyse wurden NIH3T3-Fibroblasten auf Plastik Kulturschalen für 8 h mit verschiedenen Aktinmodulatoren (Cytochalasin D, Blebbistatin und Y-27632) behandelt. Diese drei Modulatoren beeinflussen die Formierung des F-Aktins und können daher chemisch das Aktinzytoskelett in Fibroblasten auf weichem Untergrund imitieren, wie es bereits in Abschnitt 5.1.1 beschrieben wurde.



**Abbildung 15: Der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Proteinmenge von AMPK oder mTOR.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in NIH3T3-Fibroblasten auf Plastik Kulturschalen nach Behandlung mit DMSO, Blebbistatin (10  $\mu$ M), Cytochalasin D (1  $\mu$ M) und Y-27632 (10  $\mu$ M) für 8 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 4 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in NIH3T3-Fibroblasten gesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix, behandelt mit DMSO, Blebbistatin (10  $\mu$ M) und Cytochalasin D (1  $\mu$ M) für 8 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. (D) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (C) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.

Die Ergebnisse der Immunoblotanalyse zeigten, dass keiner der Modulatoren einen signifikanten Einfluss auf die Menge an AMPK oder mTOR besaßen (Abb. 15A/B). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden NIH3T3-Fibroblasten auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und für 8 h mit Cytochalasin D und Blebbistatin behandelt. Die Experimente zeigten die bereits beobachtete Reduktion des AMPK-Proteins in Zellen auf weichem Untergrund, die Aktinmodulatoren besaßen aber weder in Zellen auf 50 kPa noch auf 0,2 kPa Gelen einen Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression (Abb. 15C/D).

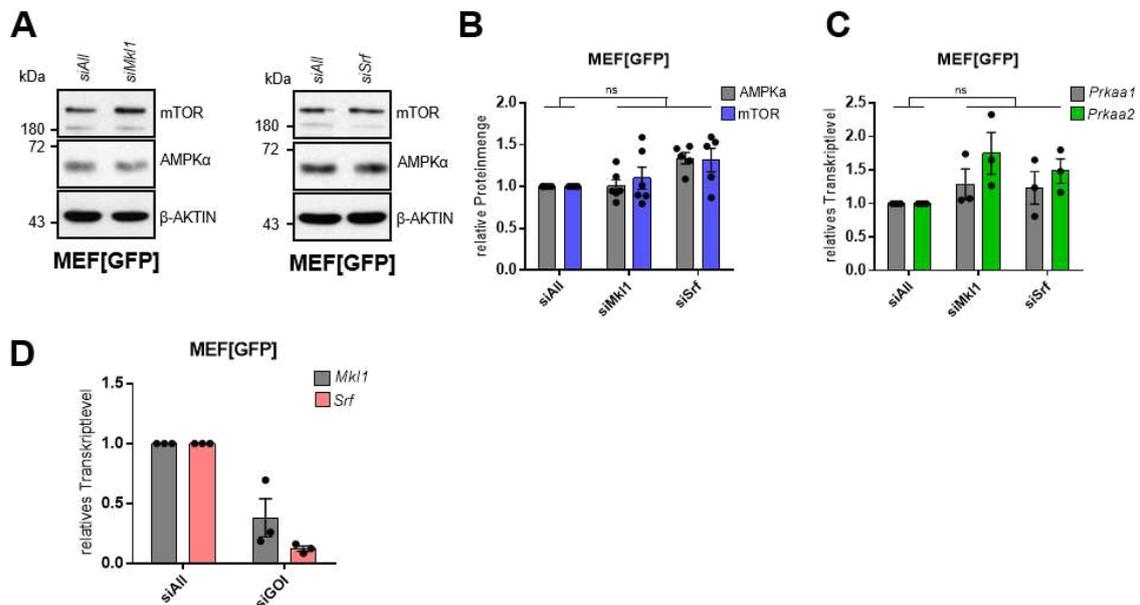
Neben dem Aktinzytoskelett gibt es noch weitere Proteine, die durch eine Verhärtung der Umgebung aktiviert und deren Lokalisations- oder Expressionsverhalten sich verändert. Hierzu gehören die transkriptionellen Koaktivatoren YAP und TAZ. Die beiden Proteine können durch Änderung der ECM und darauffolgende Polymerisierung von F-Aktin aktiviert werden. Im aktiven Zustand relokalisieren sie vom Zytoplasma in den Zellkern, um dort mit den Transkriptionsfaktoren der TEAD-Proteinfamilie die Expression von Zielgenen zu regulieren [106, 482]. Das Protein YAP wurde in NIH3T3-Fibroblasten, die auf Hydrogel-Deckgläschen ausgesät wurden, mit einem fluoreszierenden Antikörper angefärbt (Abb. 16A). Es ist zu erkennen, dass die Lokalisation von YAP sich je nach Härte des Untergrunds unterschied. In den Zellen auf 50 kPa Gelen befand sich YAP sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma, während es sich bei 0,2 kPa vermehrt im Zytoplasma aufhielt. Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung bereits publizierte Ergebnisse der Abhängigkeit der YAP-Aktivierung von der Härte der Umgebung [106]. Aufgrund dieser Abhängigkeit könnten YAP und TAZ auch am Mechanismus der AMPK-Regulation bei unterschiedlichen Härtegraden beteiligt sein. Es sollte daher überprüft werden, ob die Herunterregulierungen von YAP oder TAZ Einfluss auf die AMPK-Proteinmenge besitzen. Hierfür wurde zunächst der durch siRNA erzeugte Knockdown mittels Immunoblot verifiziert (Abb. 16B). Sowohl der repräsentative Blot als auch die Quantifizierung von  $n = 2$  unabhängigen Experimenten zeigten, dass das Herunterregulieren auch zu einer Reduktion der AMPK-Proteinexpression in MEF[GFP] auf hartem und auf weichem Untergrund führte. Allerdings konnte auch eine Reduktion von mTOR beobachtet werden (Abb. 16C). Ähnlich der Kif3A-Knockouts der NIH3T3-Zellen schien der Effekt von YAP und TAZ auf die AMPK-Proteinexpression auch die mTOR-Expression zu beeinflussen. Wie bereits beschrieben untersucht diese Arbeit jedoch den Mechanismus, welcher AMPK selektiv beeinflusst.



**Abbildung 16: Der Einfluss von YAP/TAZ auf die Proteinexpression von AMPK und mTOR.** (A) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von YAP (grün) in NIH3T3-Fibroblasten auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix durchgeführt. Es wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach-Zoom durchgeführt. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m (B) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix nach Knockdown von YAP und TAZ über siRNA durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. (C) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 2 unabhängigen, wie in (B) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.

Es wurde bereits deutlich, dass Aktin keinen Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression besitzt. Die Aktin-abhängigen Koregulatoren YAP und TAZ dagegen schienen einen Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression zu besitzen, die auch die mTOR-Menge beeinflusste. Zur genaueren Analyse sollte daher ein weiterer Aktin-sensitiver, transkriptioneller Koaktivator (MKL1 bzw. MAL) überprüft werden. MKL1 wird durch die Polymerisierung von F-Aktin aktiviert und relokalisiert in den Zellkern, ähnlich wie YAP und TAZ. Dort agiert das Protein als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors SRF und reguliert somit die Expression von Zielgenen [285]. Es wurde ein siRNA-vermittelter Knockdown von MKL1 und seinem Interaktionspartner SRF in MEF[GFP]-Zellen auf Plastik-Zellkulturschalen erzeugt, um anschließend die AMPK-Proteinmenge mittels Immunoblot zu detektieren. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Menge an AMPK oder mTOR (Abb.17 A/B). Es konnte ebenfalls kein Effekt auf das AMPK-Transkriptlevel gemessen werden (Abb. 17C). Der Knockdown wurde durch RT-qPCR bestätigt. (Abb. 17D). Anhand der vorliegenden Daten wurde deutlich, dass es entweder keinen Effekt oder keinen AMPK-spezifischen Effekt auf die Proteinexpression

durch das Aktinzytoskelett und damit zusammenhängende, mechanosensitive Proteine gab.

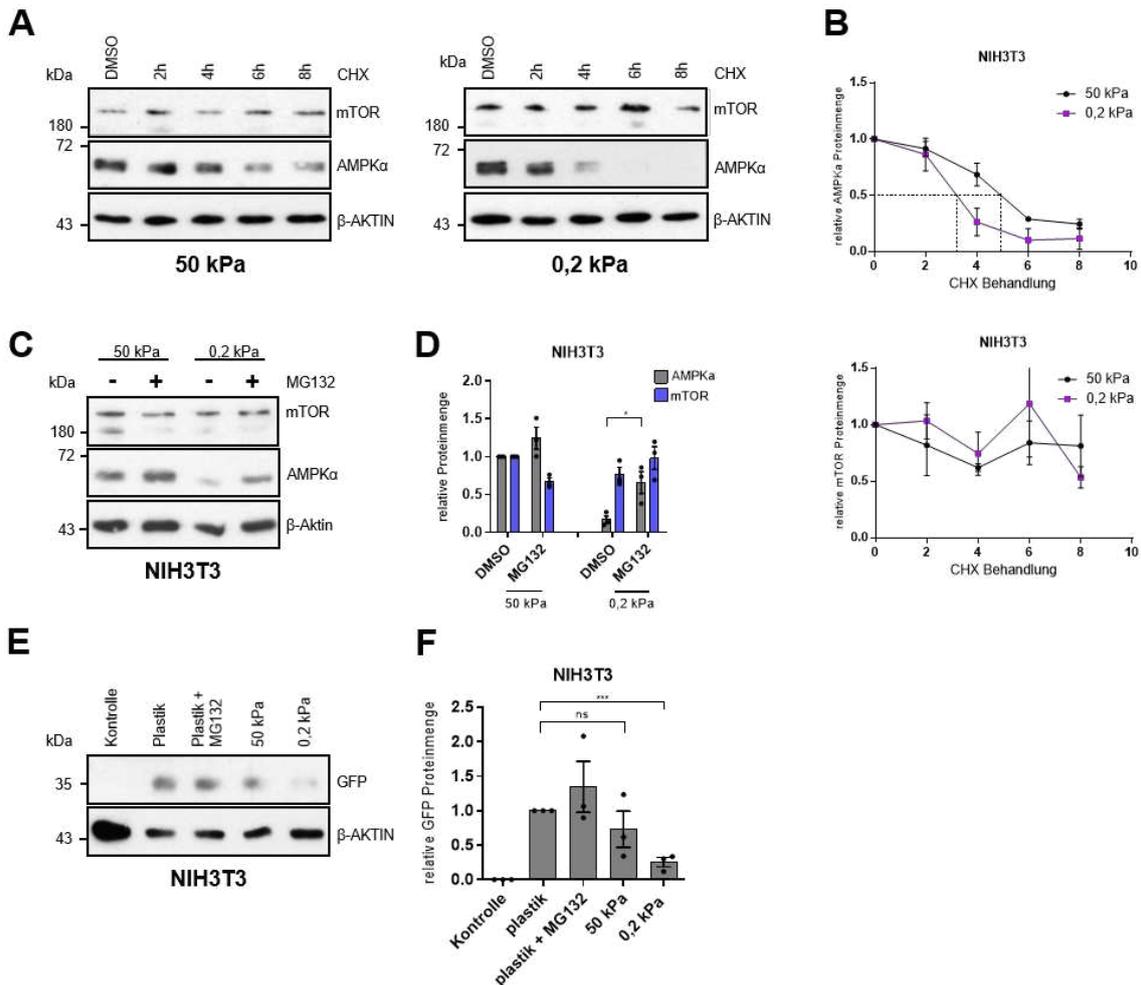


**Abbildung 17: Der Einfluss von MKL1 auf die AMPK-Proteinmenge.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] nach siRNA-vermitteltem Knockdown von *Mkl1* und *Srf* durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 5 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Prkaa1* und *Prkaa2* in MEF[GFP] nach Knockdown von *Mkl1* und *Srf* durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von n = 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. (D) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Mkl1* und *Srf* in MEF[GFP] nach Knockdown von *Mkl1* und *Srf* durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von n = 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD.

### 5.1.4 Das AMPK-Protein ist in Zellen auf hartem Untergrund stabiler

Die bisherigen Daten zeigten, dass die erhöhte Menge an AMPK unabhängig von dessen Transkriptlevel ist. Folglich musste eine erhöhte Festigkeit der Umgebung zu einer Stabilisierung des Proteins führen. Zur genauen Analyse wurden NIH3T3-Fibroblasten auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h und 8 h) mit Cycloheximid (CHX) behandelt, einem Inhibitor der Translation. Durch das stoppen der Proteinbiosynthese konnte die Halbwertszeiten des AMPK-Proteins auf den unterschiedlichen Oberflächen bestimmt und verglichen werden. Die Immunoblotanalysen zeigten einen schnelleren Abbau der AMPK unter weichen Bedingungen (Abb. 18A). Dies schien spezifisch für AMPK zu gelten, da mTOR keinen Unterschied im Abbau zwischen harter und weicher Umgebung zeigte. Die Halbwertszeit von AMPK auf weichem Untergrund betrug etwa 2,5 h und auf hartem Untergrund etwa

5 h (Abb. 18B). Im Gegensatz dazu startete der Abbau von mTOR erst nach den 8 h auf 0,2 kPa Gelen.



**Abbildung 18: Die Stabilisierung des AMPK-Proteins in Zellen auf hartem Untergrund.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in NIH3T3-Fibroblasten nach Behandlung mit Cycloheximid (100 µg/ml) zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Zellen wurden vor der Behandlung auf weicher (0,2 kPa) und auf harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät; β-AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD. Die Halbwertszeit von AMPK betrug unter weichen Bedingungen ~2,5 h unter harten Bedingungen ~5 h. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in NIH3T3-Fibroblasten gesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix und unter Behandlung mit MG132 (10 µM) durchgeführt; β-AKTIN diente als Ladekontrolle. (D) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (C) gezeigten Experimenten ± SD. (E) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von GFP in NIH3T3-Fibroblasten, transfiziert mit dem Plasmid d2EGFP und ausgesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix durchgeführt. Die transfizierten Zellen auf Plastik wurden zur Kontrolle mit MG132 (10 µM) behandelt, zudem wurden Wildtyp-NIH3T3 als Transfektionskontrolle aufgetragen; β-AKTIN diente als Ladekontrolle. (F) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (E) gezeigten Experimenten ± SD.

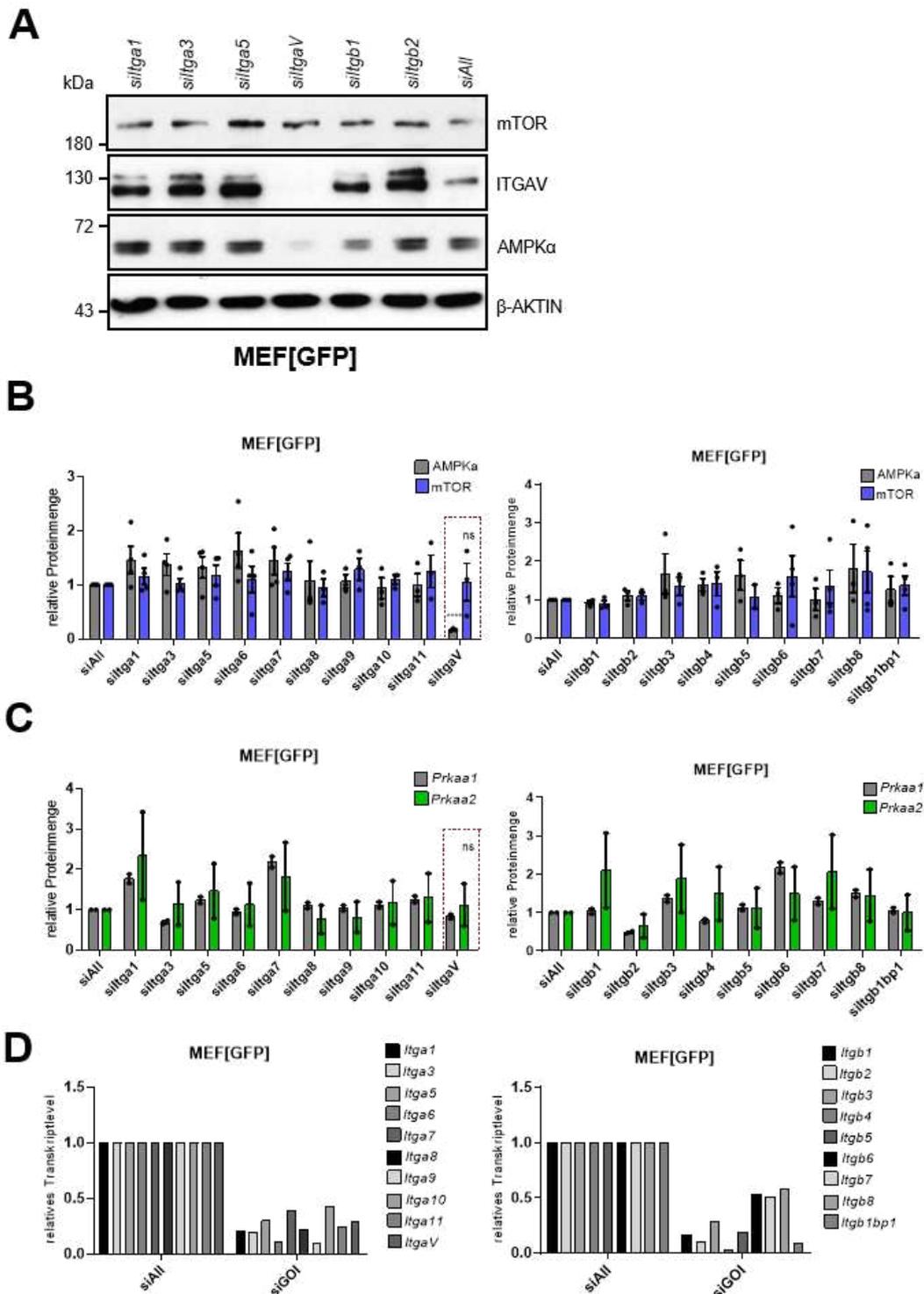
Es kann davon ausgegangen werden, dass ein fester Untergrund zu einer erhöhten Stabilisierung der AMPK führt. Im Umkehrschluss sollte es möglich sein, das Protein unter weichen Bedingungen mithilfe eines Proteasom-Inhibitors (MG132) zu

stabilisieren. Dies wurde ebenfalls in NIH3T3-Fibroblasten getestet. Nach 8 h Behandlung konnte eine signifikant höhere Menge an AMPK-Protein in Zellen unter weichen Bedingungen gemessen werden (Abb. 18C/D). Die Menge an mTOR blieb dagegen unter beiden Bedingungen unverändert. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden die Fibroblasten mit d2EGFP transfiziert. Das d2EGFP enthält innerhalb der EGFP Sequenz eine proteolytische Signaldomäne (PEST-Sequenz), welche die Halbwertszeit des EGFP von >24 h auf <2 h reduziert [11]. Mithilfe dieser PEST-Sequenz wird das EGFP nahezu unverzüglich nach Expression proteasomal abgebaut. Anhand dieses Konstruktes konnte deutlich gemacht werden, dass der Abbau unter weichen Bedingungen schneller verlief, als unter harten Bedingungen (Abb. 18E). Die Quantifizierung zeigte einen Anstieg an GFP nach Behandlung mit MG132 (Abb. 18F) sowie einen signifikanten Abfall an GFP auf 0,2 kPa Gelen im Vergleich zu Plastik, während bei 50 kPa Gelen nur ein schwacher Abfall zu erkennen war. Anhand der vorliegenden Daten konnte demnach postuliert werden, dass AMPK in Zellen auf harter Oberfläche besser stabilisiert wird und demzufolge der proteasomale Abbau auf weichen Oberflächen deutlich schneller abläuft.

### 5.1.5 Integrin $\alpha$ V und FAK beeinflussen die AMPK-Proteinexpression

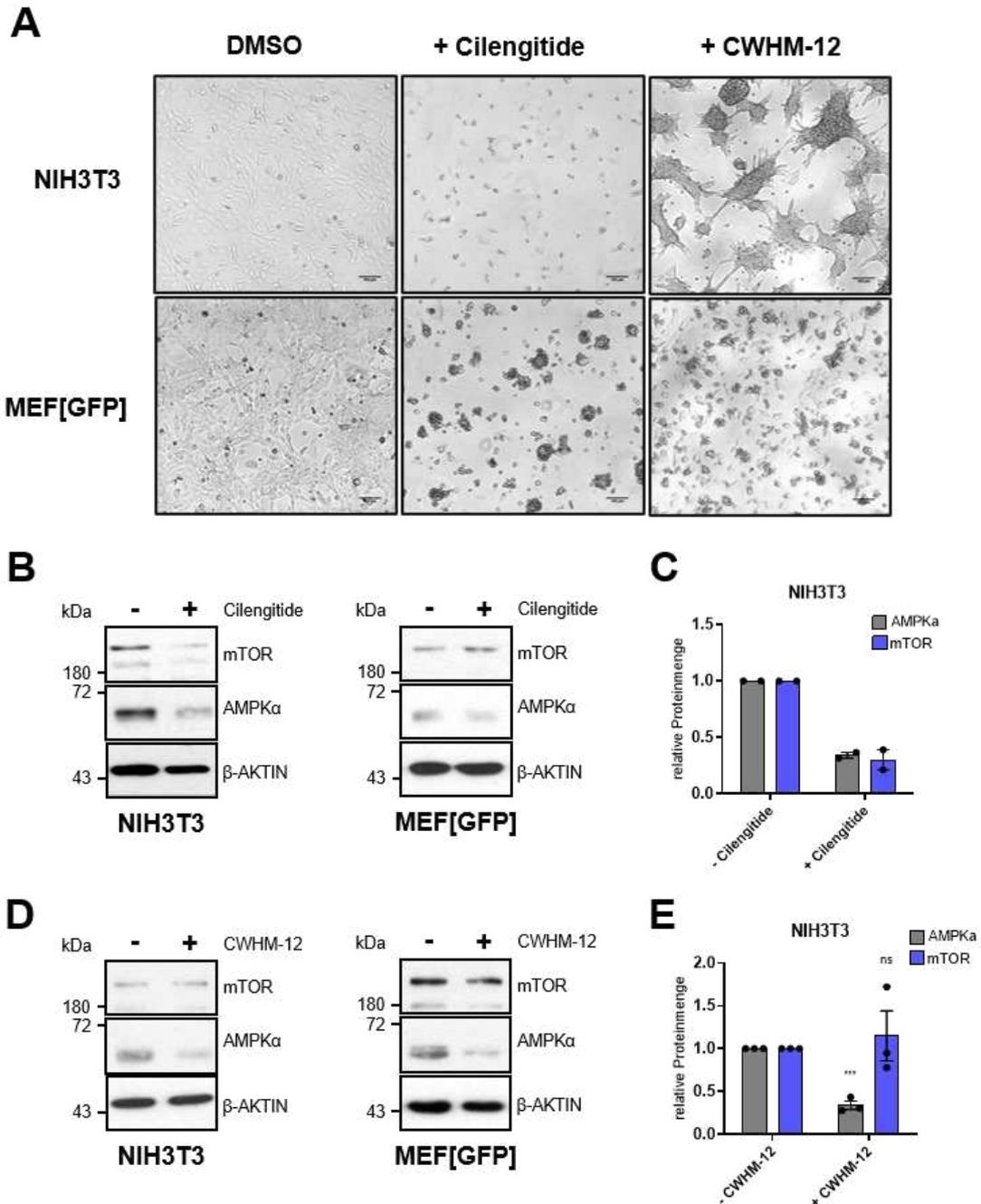
In dem Prozess des *Mechanosensing* sind vor allem die FAs von essentieller Bedeutung. Diese Komplexe bestehen aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, wie etwa den Integrinen oder FAK. Sie verbinden das Zytoskelett der Zelle mit der Umgebung und können so veränderte Umgebungsbedingungen, wie etwa die erhöhte Festigkeit von Gewebe, detektieren und die Signale an das Innere der Zelle weiterleiten [192]. Die Menge von AMPK wird durch die Festigkeit der Umgebung beeinflusst, daher ist es möglich, dass die FA am Stabilisierungsprozess beteiligt sind. Zur genaueren Untersuchung einer möglichen Verbindung zwischen einer Hauptkomponente der FA, den Integrinen, und AMPK wurde ein Screening mit Hilfe von siRNA-vermittelten Knockdowns durchgeführt. Integrine sind Heterodimere und bestehen in der Regel aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -UE, die zwar theoretisch beliebig kombiniert werden können, es aber dennoch Einschränkungen gibt [190]. Es wurden daher eine Reihe von  $\alpha$ - und  $\beta$ -UE in MEF[GFP]-Zellen auf Plastik-Kulturschalen mittels siRNA-Pools herunterreguliert und die Auswirkung auf die AMPK-Proteinexpression detektiert (Abb. 19A/B). Keine der acht untersuchten  $\beta$ -UE sowie die meisten der zehn  $\alpha$ -UE schien einen signifikanten Einfluss auf die AMPK- oder die mTOR-Proteinmenge zu besitzen. Interessanterweise

konnte bei einem Integrin, *ItgaV*, ein signifikanter Abfall der Menge an AMPK nach dem Herunterregulieren festgestellt werden; das Level an mTOR blieb dabei unverändert.



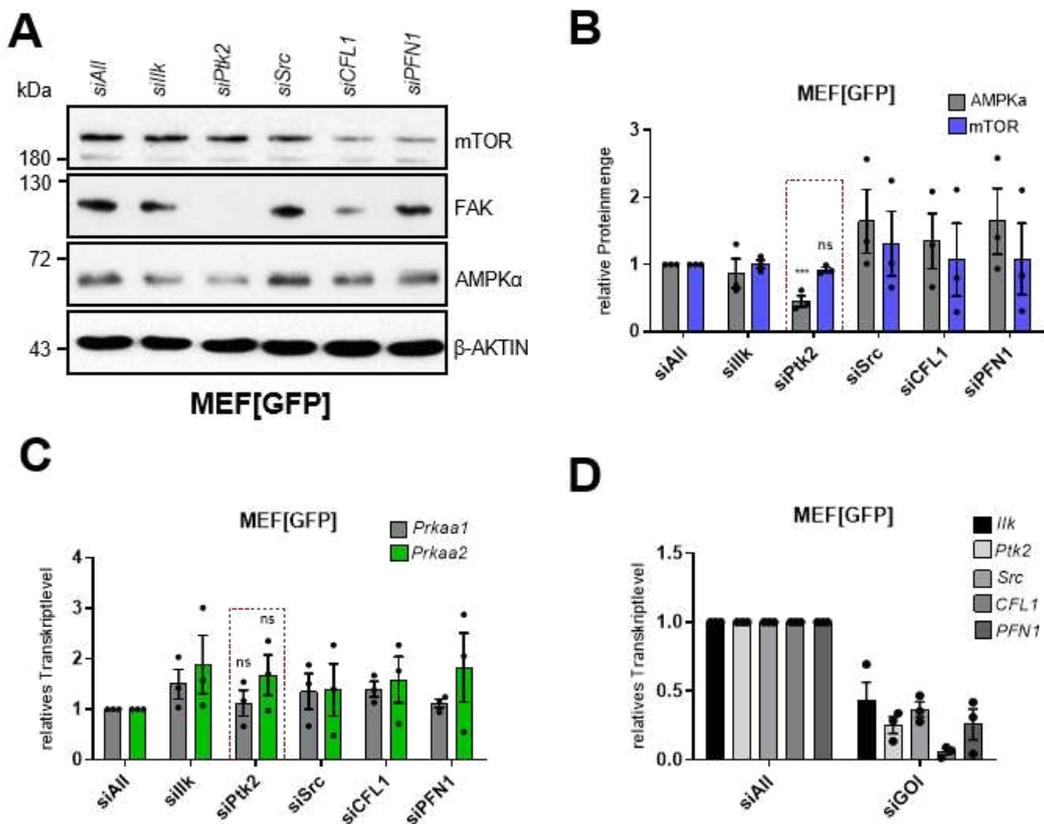
**Abbildung 19: Die Stabilisierung der AMPK über *ItgaV*.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] auf Plastikculturschalen nach siRNA-vermittelterm Knockdown von diversen Integrin-Untereinheiten durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von  $n = 3$  unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Prkaa1* und *Prkaa2* in MEF[GFP] durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von  $n = 2$  unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. (D) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels der Integrine in MEF[GFP] durchgeführt.

Der Knockdown der Integrin-Untereinheiten wurde mithilfe einer RT-qPCR überprüft (Abb. 19D). Zusätzlich konnte der Knockdown des Itg $\alpha$ V im repräsentativen Immunoblot überprüft und bestätigt werden. Die Ergebnisse der Proteinanalyse wurden anschließend auf Transkriptebene untersucht, speziell im Fall von Itg $\alpha$ V konnte kein signifikanter Effekt für die beiden AMPK-Transkripte *Prkaa1* und *Prkaa2* festgestellt werden (Abb. 19C). Diese Daten zeigten einen Einfluss von Itg $\alpha$ V lediglich auf Proteinebene, nicht aber auf Transkriptebene der AMPK, vergleichbar mit dem Effekt der 0,2 kPa und 50 kPa Gele. Die Vermutung lag daher nahe, dass Itg $\alpha$ V bei dem Stabilisierungsprozess von AMPK beteiligt ist. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Fibroblastenzelllinien mit zwei unterschiedlichen Itg $\alpha$ V-Inhibitoren, Cilengitide und CWHM-12, behandelt, um deren Effekt auf das AMPK-Protein zu untersuchen. Anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen war bereits deutlich zu erkennen, dass die Substanzen schon nach 16 h zu einer morphologischen Veränderung der Mausfibroblasten führten (Abb. 20A). Speziell im Fall der NIH3T3-Fibroblasten bildeten die Zellen nach Behandlung mit CWHM-12 Zellaggregate, während sie mit Cilengitide abgerundete Formen annahmen und abstarben. Integrine sind an der Adhäsion der Zellen beteiligt. Werden sie inhibiert, ändert sich die Form der Fibroblasten von dem typischen, elongierten Auftreten zu rundlichen Zellen, bis sie schließlich in die Apoptose gehen [437]. Cilengitide war dabei toxischer als CWHM-12, was auch in den mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen war. Nach Behandlung mit Cilengitide war zwar ein Abfall der AMPK-Proteinexpression sowohl in NIH3T3- als auch in MEF[GFP]-Fibroblasten zu beobachten, da jedoch auch die Menge an mTOR und  $\beta$ -AKTIN reduziert war, war der Effekt vermutlich auf die toxische Natur der Substanz zurückzuführen (Abb. 14B/C). Im Gegensatz dazu war eine signifikante Reduktion an AMPK nach CWHM-12-Behandlung zu beobachten, die aber nicht bei dem mTOR-Protein auftrat (Abb. 14D/E) Es konnte somit sowohl durch einen Knockdown als auch pharmakologisch bestätigt werden, dass Itg $\alpha$ V einen Einfluss auf die AMPK-Proteinmenge besaß, welcher im Zusammenhang mit der Stabilisierung des Proteins unter festen Bedingungen stehen könnte.



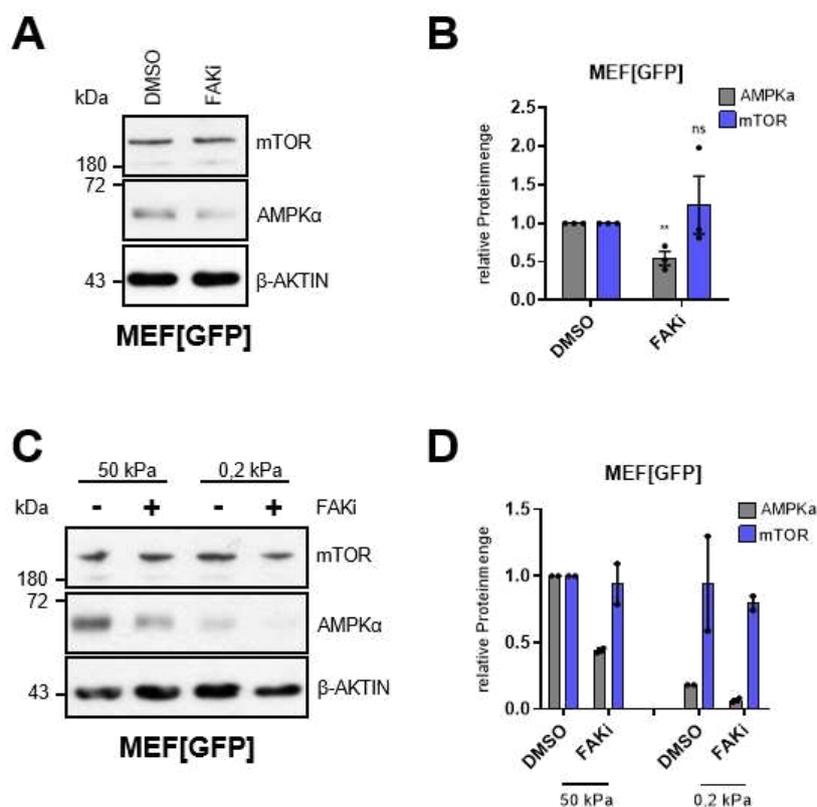
**Abbildung 20: Die Reduktion der AMPK-Proteinexpression in Mausfibroblasten durch einen ItgαV-Inhibitor.** (A) Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von NIH3T3 und MEF[GFP] nach 16 h Behandlung mit Cilengitide (0,5 μM) und CWHM-12 (0,5 μM) in einer 10x Vergrößerung durchgeführt. Maßstabsbalken = 100 μm (B) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] und NIH3T3 nach 16 h Behandlung mit Cilengitide (0,5 μM) durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladungskontrolle. (C) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 2 unabhängigen, wie in (B) gezeigten Experimenten mit NIH3T3-Fibroblasten ± SD. (D) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] und NIH3T3 nach 16 h Behandlung mit CWHM-12 (0,5 μM) durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladungskontrolle. (E) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (D) gezeigten Experimenten mit NIH3T3-Fibroblasten ± SD.

Nicht nur die Integrine sind ein essentieller Teil der Mechanotransduktion, eine Reihe weitere Proteine, die sowohl mit den Integrinen als auch mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind, könnten eine Auswirkung auf AMPK haben. Es wurde daher ein weiteres Screening mittels siRNA-vermittelten Knockdowns von Integrin-Modulatoren und Aktin-Regulatoren durchgeführt. Das Screening umfasste Cofilin, Profilin, Src Kinase, Ilk und FAK (hier *Ptk2*) (Abb. 21A). Der Knockdown wurde durch eine RT-qPCR in allen Fällen bestätigt (Abb. 21D). Es war sowohl im repräsentativen Immunoblot als auch in der Quantifizierung (Abb. 21B) zu erkennen, dass ausschließlich *Ptk2* einen Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression zu haben schien. AMPK wurde nach dem Knockdown von *Ptk2* signifikant herunterreguliert, während das Level an mTOR-Protein unverändert blieb. Im Gegensatz dazu war auch hier das Transkriptlevel unbeeinflusst (Abb. 21C), der Effekt fand demzufolge ausschließlich auf Proteinebene statt.



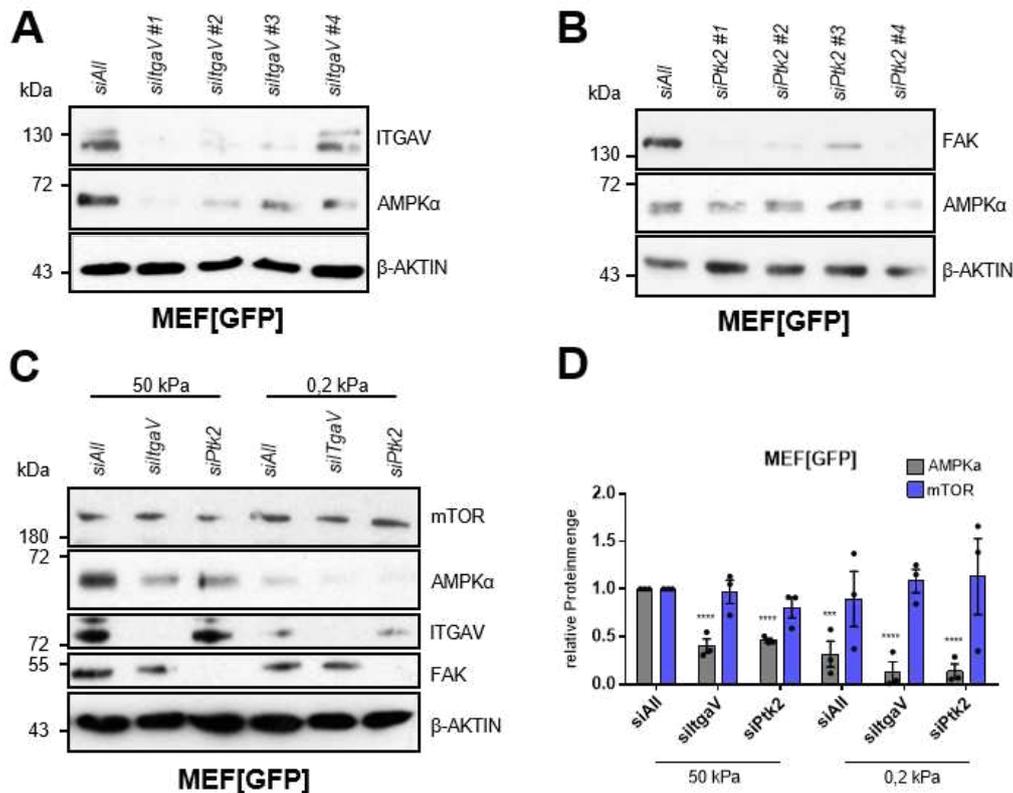
**Abbildung 21: Die Stabilisierung von AMPK über FAK.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] nach siRNA-vermitteltem Knockdown von Integrin- und Aktin-Modulatoren durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladungskontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Prkaa1* und *Prkaa2* in MEF[GFP] nach Knockdown von Integrin- und Aktin-Modulatoren durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD von n = 3 unabhängigen Experimenten. (D) Es wurden RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels der Integrin- und Aktin-Modulatoren in MEF[GFP] durchgeführt.

Die Ergebnisse der Herunterregulierung des FAK sollte nun mithilfe eines pharmakologischen Inhibitors verifiziert werden. Es wurden dabei MEF[GFP]-Zellen für 16 h mit dem FAK-Inhibitor (FAKi) PF-573228 behandelt und die AMPK-Proteinmenge mittels Immunoblot analysiert. Es konnte bestätigt werden, dass auch durch einen Inhibitor die Proteinmenge von AMPK reduziert wurde (Abb. 22A/B). Die Menge an mTOR-Protein blieb dabei unverändert. Der FAKi wurde anschließend auf den Hydrogelen getestet. MEF[GFP]-Zellen wurden dazu auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und ebenfalls für 16 h mit dem Inhibitor behandelt. Es konnte sowohl auf weichem als auch auf hartem Untergrund eine Reduktion der Menge an AMPK bei unverändertem mTOR-Level festgestellt werden (Abb. 22C/D).



**Abbildung 22: Die Reduktion der AMPK-Proteinmenge in Mausfibroblasten durch einen FAK-Inhibitor.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] nach Behandlung mit FAKi (10  $\mu$ M) durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladungskontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix nach Behandlung mit FAKi (10  $\mu$ M) durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladungskontrolle. (D) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 2 unabhängigen, wie in (C) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.

Das Herunterregulieren sowohl von *ItgaV* als auch von *FAK/Ptk2* in den Mausfibroblasten wurde jeweils mit einem Pool aus vier unterschiedlichen siRNA durchgeführt. Es musste daher noch verifiziert werden, ob die einzelnen siRNAs aus den Pools ebenfalls den gewünschten Effekt auf die AMPK-Proteinmenge besaßen. Hierfür wurde ein Knockdown sowohl von *ItgaV* (Abb. 23A) als auch von *Ptk2* (Abb. 23B) in MEF[GFP]-Zellen mit den einzelnen siRNA der Pools durchgeführt. Bei mindestens zweien der im Pool enthaltenen siRNA konnte ein Knockdown und der bereits festgestellte Effekt auf die AMPK-Proteinexpression detektiert werden. Es war daher auszuschließen, dass der Effekt auf das Protein lediglich durch eine der siRNA entstanden ist und es sich somit nicht um ein Artefakt handelte. Das Herunterregulieren mit den einzelnen siRNA hatte zudem eine unterschiedliche Effizienz, dies wurde im repräsentativen Immunoblot deutlich. Je besser der Knockdown war, desto besser der reduzierende Effekt auf das AMPK.

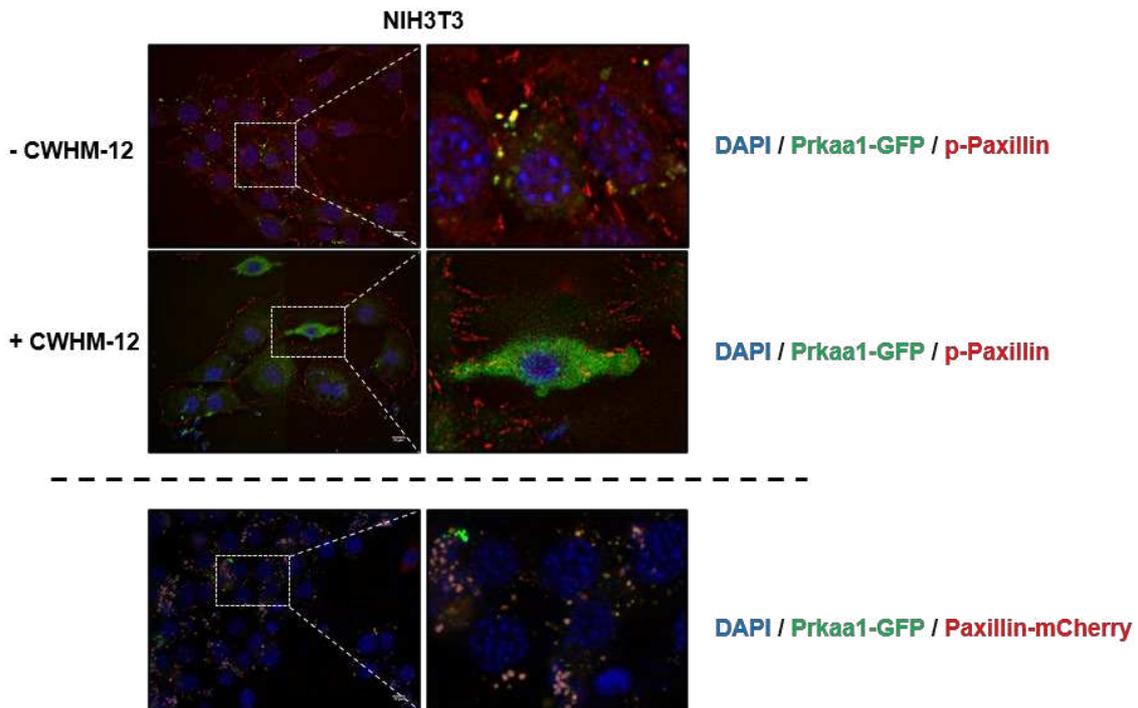


**Abbildung 23: Die Stabilisierung der AMPK über *ItgaV* und FAK in Zellen auf weicher und auf harter Gelmatrix.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und ITGAV in MEF[GFP] nach Knockdown mit verschiedenen *ItgaV*-siRNA durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladungskontrolle. (B) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und FAK in MEF[GFP] nach Knockdown mit verschiedenen *Ptk2*-siRNA durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladungskontrolle. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in MEF[GFP] auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix nach Knockdown von *ItgaV* und *Ptk2* durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diene als Ladungskontrolle. (D) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (C) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.

Im Anschluss wurde der Knockdown von *ItgaV* und *Ptk2* in MEF[GFP]-Zellen auf Hydrogelen getestet. Im repräsentativen Immunoblot war deutlich zu erkennen, dass der AMPK-herunterregulierende Effekt des Knockdowns sowohl auf 50 kPa als auch auf 0,2 kPa Gelen zu detektieren war (Abb. 23C). Die Quantifizierung drei unabhängigen Experimenten bestätigte diese Annahme (Abb. 23D) und zeigte außerdem, dass mTOR nicht beeinflusst wurde. Der Knockdown konnte ebenfalls anhand des Immunoblots überprüft werden. Die Ergebnisse zeigten, dass ITGAV und FAK einen stabilisierenden Effekt auf das AMPK-Protein besaßen. Dieser Effekt konnte sowohl auf festem als auch auf weichem Untergrund detektiert werden.

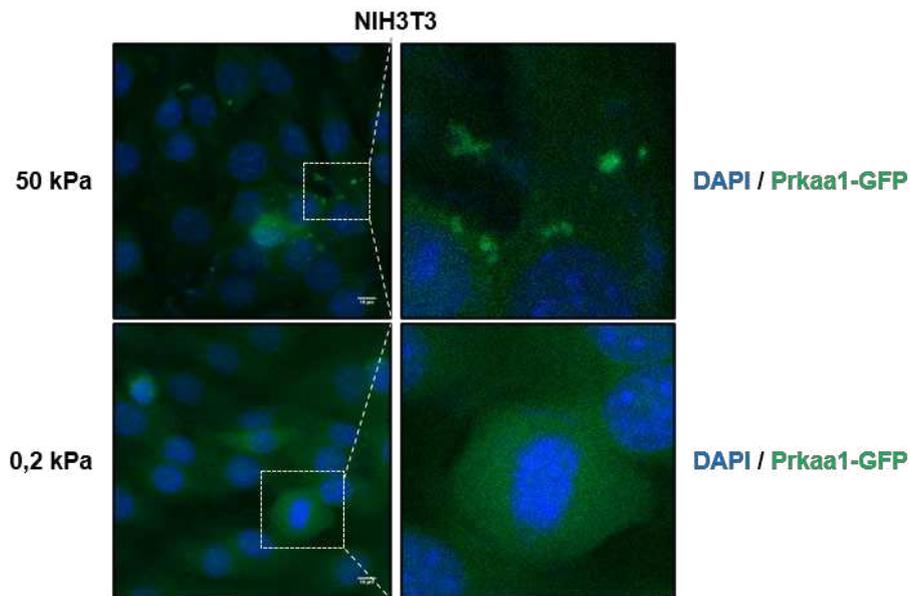
## 5.2 Lokalisation von AMPK in Fibroblasten

Im vorausgehenden Abschnitt konnte deutlich gemacht werden, dass die FA einen Einfluss auf die Stabilisierung des AMPK-Proteins in Zellen auf hartem Untergrund besaßen. Nun sollte eine Lokalisation des Proteins in der Zelle einen genaueren Einblick in den zugrunde liegenden Mechanismus geben. Es war nicht möglich, endogenes AMPK-Protein mittels Antikörperfärbung in den Zellen zu detektieren, daher wurde ein Prkaa1-GFP-Expressionsplasmid in NIH3T3-Fibroblasten transfiziert. Zusätzlich wurde p-Paxillin, ein weiteres Protein der FA (Abb. 4) [425], mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert (Abb. 24A). Anhand der Aufnahme war zu erkennen, dass p-Paxillin eine ringähnliche Formation um die Zelle bildete, was eine Lokalisation an der Zellmembran vermuten lässt. Interessanterweise war eine deutliche Kolokalisation des p-Paxillin und des Prkaa1-GFP in punktförmigen Strukturen zu erkennen. Nach Behandlung mit dem *ItgaV*-Inhibitor CWHM-12 verschwand diese Kolokalisation und das Prkaa1-GFP verteilte sich im kompletten Zytoplasma der Zelle. Die Kolokalisation konnte auch mit einer Kotransfektion mit Paxillin-mCherry zusätzlich zu Prkaa1-GFP bestätigt werden. Hier war ebenfalls eine deutliche Kolokalisation von Prkaa1 und Paxillin in punktförmigen Strukturen zu erkennen.



**Abbildung 24: Die Kolokalisation von Prkaa1-GFP und p-Paxillin/Paxillin.** (A) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Fibroblasten auf Glasdeckgläschen, transfiziert mit einem Prkaa1-GFP Konstrukt und behandelt für 16 h mit 0,5  $\mu$ M CWHM-12 durchgeführt. Angefärbt wurden p-Paxillin (rot) und Zellkerne mit DAPI (blau). Es wurde außerdem eine Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Fibroblasten auf Glasdeckgläschen, transfiziert mit einem Prkaa1-GFP-Konstrukt und einem Paxillin-mCherry-Konstrukt und inkubiert für 24 h in 0,5 % FBS DMEM durchgeführt. Es folgten weitfeldmikroskopische Aufnahmen in einer 63x Vergrößerung. Gezeigt ist eine Ebene nach Dekonvolution. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

Anhand der Kolokalisation konnte festgestellt werden, dass der Itg $\alpha$ V-Inhibitor die Lokalisation von Prkaa1 beeinflusst. Da aus den vorherigen Daten gefolgert werden konnte, dass Itg $\alpha$ V AMPK auf weichem und hartem Untergrund beeinflusst, sollte im Folgenden die Lokalisation von Prkaa1 auf den Hydrogelen überprüft werden. Hierfür wurden NIH3T3-Fibroblasten mit dem Prkaa1-GFP-Konstrukt transfiziert und auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen war zu erkennen, dass die punktuelle Lokalisation des Prkaa1 lediglich auf 50 kPa Gelen sichtbar war, während sich das Protein auf den 0,2 kPa Gelen hauptsächlich im Zytoplasma aufhielt (Abb. 25).



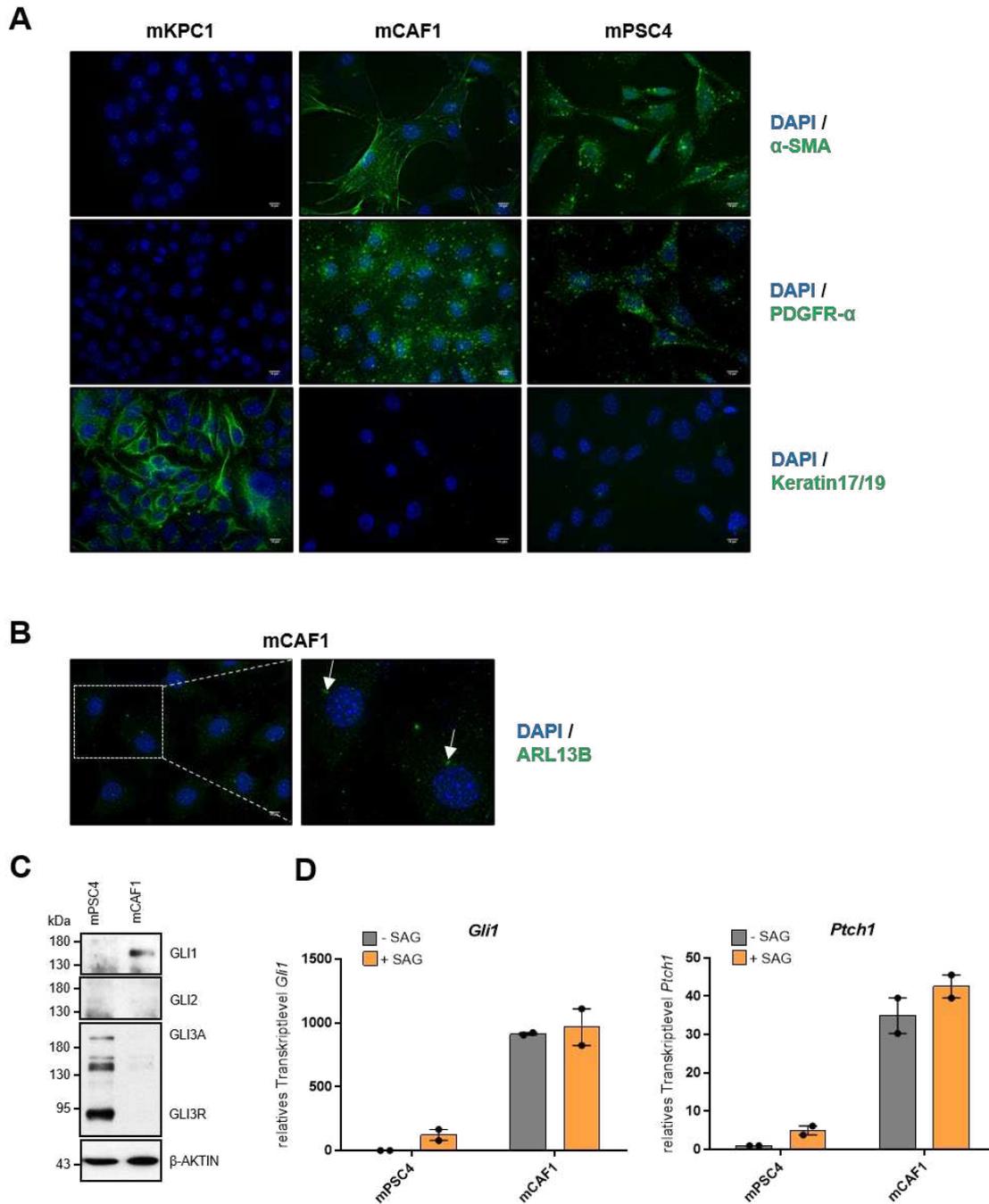
**Abbildung 25: Die Lokalisation von Prkaa1-GFP in punktförmigen Strukturen unter harten Bedingungen.** Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Fibroblasten, transfiziert mit einem Prkaa1-GFP-Konstrukt und ausgesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix durchgeführt. Angefärbt wurde der Zellkern mit DAPI (blau). Es folgten konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach Zoom. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

### 5.3 Verifizierung des AMPK-Stabilisierungsmechanismus in PDAC-Stromazellen

Der Stabilisierungsmechanismus über die FA sollte nun in PDAC, einem der stromareichsten Tumoren, verifiziert werden. Aufgrund des ausladenden Stromas und demzufolge auch der erhöhten Festigkeit ist diese Tumorart gut geeignet um den AMPK-Mechanismus und dessen therapeutische Relevanz genauer zu untersuchen.

#### 5.3.1 Die primären Mausfibroblasten mCAF1

In den folgenden Untersuchungen wurden einige immortalisierte Zelllinien des PDAC-Stromas verwendet. Für ein besseres Verständnis und einer direkten Relation zum realen Tumor sollten allerdings auch primäre Zellen, die aus einer KPC-Maus isoliert wurden, analysiert werden. Die Methode zur Isolierung der Primärzellen ist im Methodenteil genauer beschrieben (Abschnitt 4.2.1).

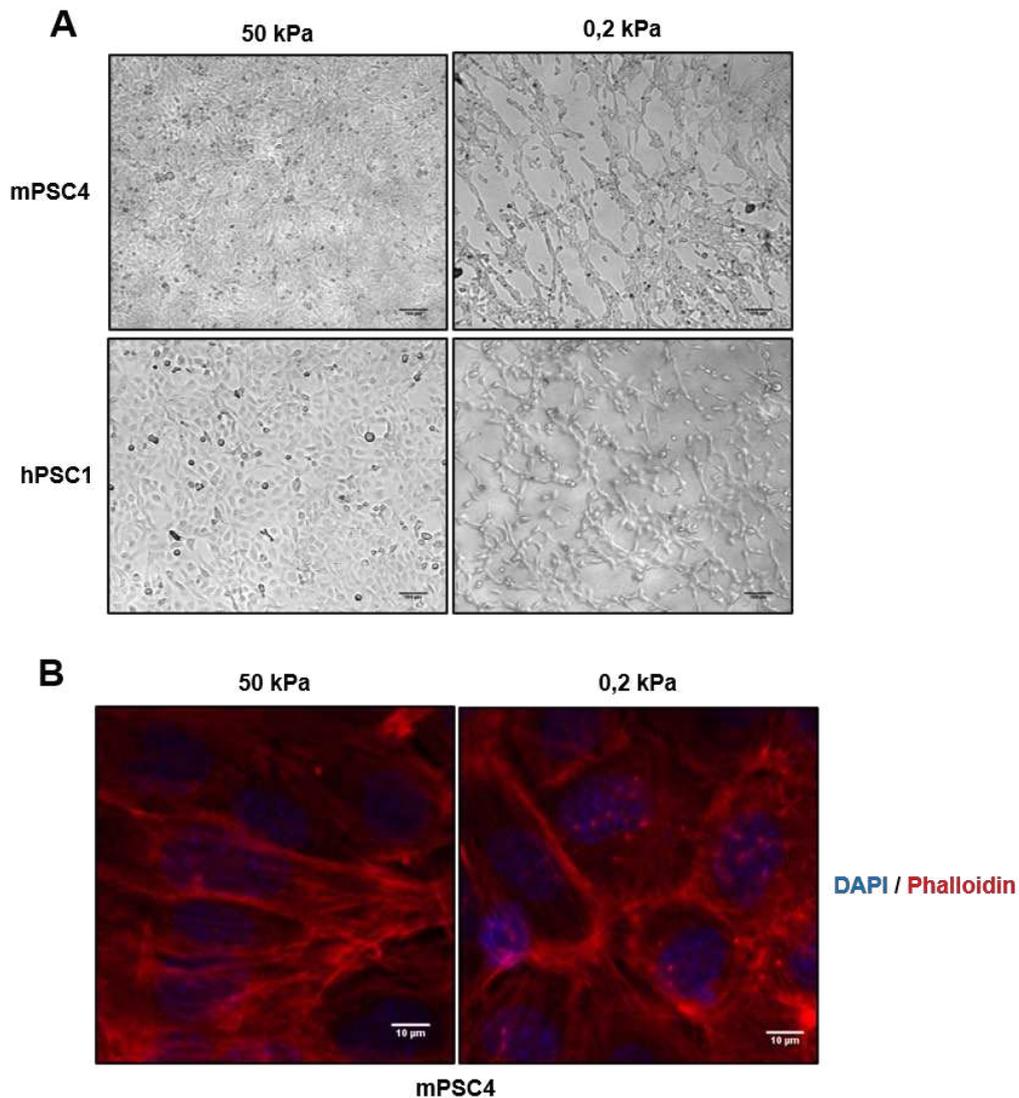


**Abbildung 26: Der Hh-Signalweg in der isolierten Primärzelllinie mCAF1.** (A) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von mKPC1, mPSC4 und mCAF1 auf Glasdeckgläschen durchgeführt. Anfärbt wurde der epitheliale Marker Keratin17/19 (grün) und die mesenchymalen Marker PDGFR- $\alpha$  (grün) und  $\alpha$ -SMA (grün) sowie der Zellkern mit DAPI (blau). Es folgten weitfeldmikroskopische Aufnahmen in einer 63x Vergrößerung, gezeigt ist die Maximumintensitätsprojektion. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m (B) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von mCAF1 auf Glas-Deckgläschen durchgeführt. Anfärbt wurden die Primärzilien mittels ARL13B-Antikörper (grün) und der Zellkern mit DAPI (blau). Es folgten weitfeldmikroskopische Aufnahme in einer 63x Vergrößerung, gezeigt ist die Maximumintensitätsprojektion. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der GLI-Transkriptionsfaktoren in mCAF1 im Vergleich zu mPSC4 auf Plastik durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladungskontrolle. (D) Es wurde eine RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Gli1* und *Ptch1* in mCAF1 durchgeführt. In den Graphen ist der Mittelwert  $\pm$  SD von n = 2 unabhängigen Experimenten dargestellt.

Zur Identifizierung der gewonnenen Zellen als CAFs wurden sie zusammen mit einer PSC-Zelllinie und einer KPC-Tumorzelllinie auf epitheliale und mesenchymale Marker untersucht. Es wurden der epitheliale Marker Keratin 17/19 und die mesenchymalen Marker PDGFR $\alpha$  und  $\alpha$ -SMA mittels Immunfluoreszenz angefärbt (Abb. 26A). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten in den mCAF1 ein deutliches Signal bei den mesenchymalen Markern, während der epitheliale Marker nicht detektiert werden konnte. Die Kontrollen, mPSC4 (mesenchymal) und mKPC1 (epithelial), waren dabei positiv auf ihre jeweiligen Marker. Es wurde zudem ein Test auf die *KRAS*- und *Trp53*-Mutationen durchgeführt. Da die Zellen aus einem KPC-Tier isoliert wurden, sollten die Tumorzellen diese Mutationen aufweisen, die Stromazellen jedoch nicht. In den mCAF1-Zellen konnte keine der Mutationen festgestellt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein weiterer Test war eine Immunfluoreszenzfärbung der Primärzilien mittels ARL13B-Antikörper (Abb. 26B), da PDAC-Tumorzellen kein Primärzilium besitzen, Fibroblasten jedoch schon. Es wurde anhand der mikroskopischen Aufnahmen deutlich, dass die isolierten Zellen Primärzilien besaßen. In den Primärzellen wurde im Immunoblot und auf Transkriptebeine ein aktiver Hh-Signalweg nachgewiesen (Abb. 26C/D). Die Expression des Transkriptionsfaktors GLI1 war in den mCAF1-Zellen deutlich erhöht im Vergleich zu der mPSC4-Kontrolle. Es wurde bereits publiziert, dass Tumorzellen durch die Sekretion des SHH-Liganden zu einer Aktivierung des Hh-Signalwegs im Stroma führen. Diese parakrine Signalübertragung fördert PDAC-Wachstum und Metastasierung [18]. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die mCAF1-Zelllinie aus dem Tumorstroma stammte und es sich nicht um eine Tumorzelllinie handelte. Es war daher möglich die isolierten Primärzellen für weiterführende Untersuchungen des Tumorstromas zu verwenden.

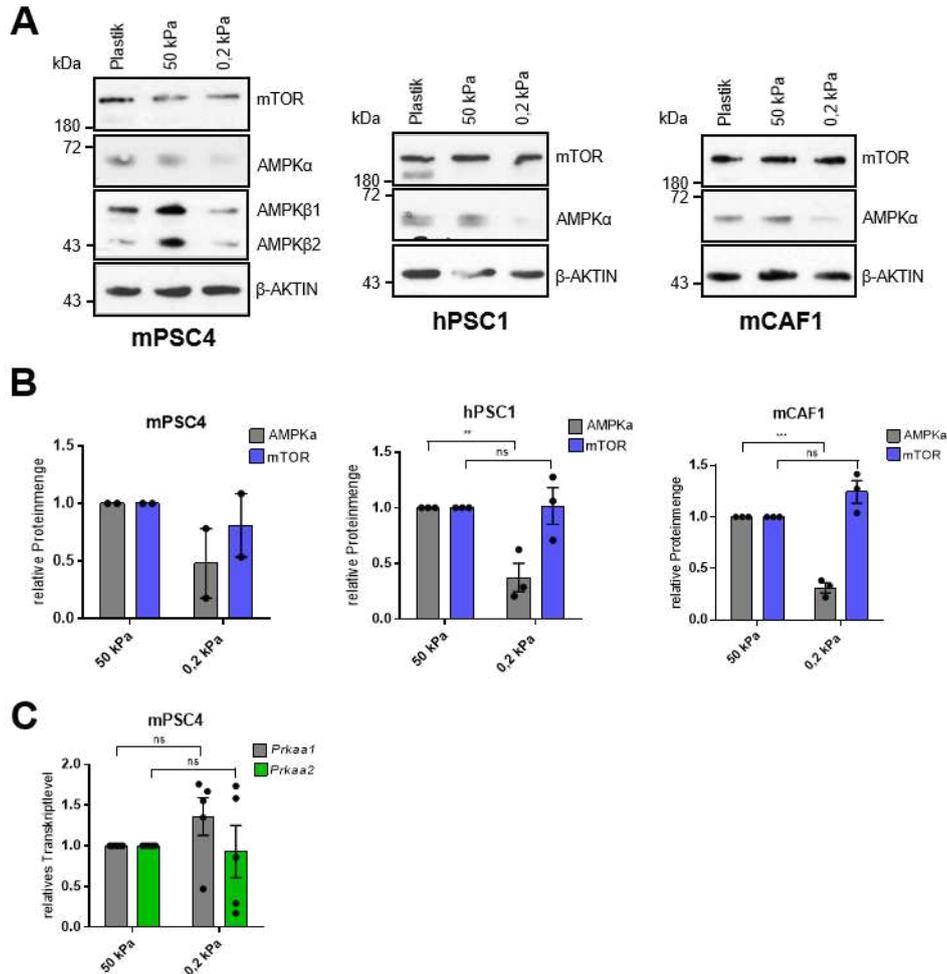
### 5.3.2 Itg $\alpha$ V und FAK beeinflussen die AMPK-Proteinexpression in PSCs

Es wurde bereits gezeigt, dass die Festigkeit des Untergrunds einen Einfluss auf die Morphologie von Mausfibroblasten besitzt. Dieses Ergebnis sollte nun auf das PDAC-Stroma übertragen werden. Hierfür wurden murine und humane PSC-Zellen auf 50 kPa und 0,2 kPa Gele ausgesät. In lichtmikroskopischen Aufnahmen war eine ähnliche morphologische Veränderung der Zellen zu erkennen: Auf weichem Untergrund waren sie rundlicher, während sie auf festem Untergrund die typische elongierte Form besaßen (Abb. 27A).



**Abbildung 27: Die Veränderung der PSC-Morphologie durch die Untergrundhärte.** PSCs wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät. (A) Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von murinen PSC4 und humanen PSC1 in einer 10x Vergrößerung durchgeführt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m (B) Das Aktinzytoskelett von mPSC4 wurden mit dem Phalloidin-California-Red Konjugat (rot) und der Zellkern mit DAPI (blau) angefärbt. Anschließend wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach-Zoom durchgeführt. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m.

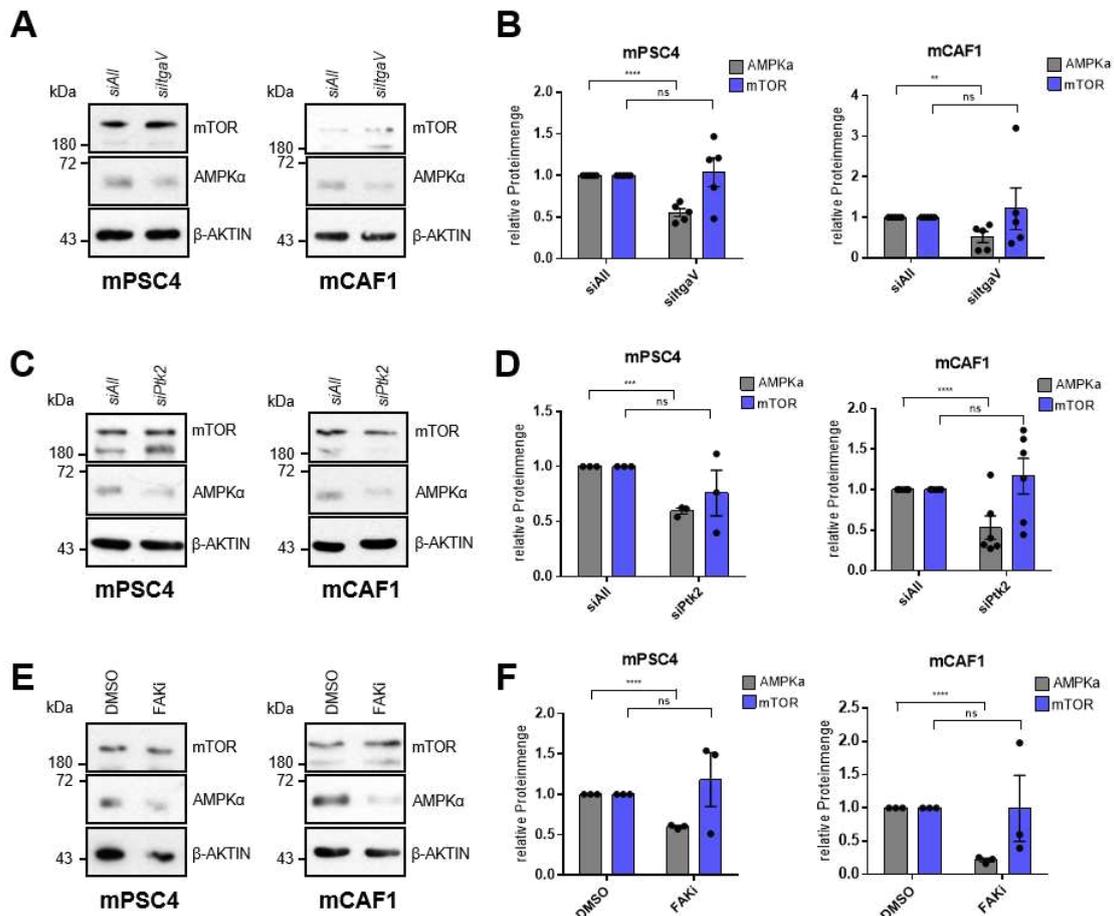
Eine Färbung des Aktinzytoskeletts mithilfe des Farbstoffs Phalloidin bestätigte, dass auch in PSC-Zellen die F-Aktin-Fasern unter festen Bedingungen ausgeprägter waren als unter weichen (Abb. 27B). Es konnte zudem bestätigt werden, dass die AMPK-Proteinexpression sowohl in murinen und humanen PSCs sowie in den generierten murinen Primärzellen mCAF1 unter weichen Bedingungen signifikant reduziert war (Abb. 28A/B) (Abb. E2).



**Abbildung 28: Eine erhöhte AMPK-Proteinexpression in PSCs auf hartem Untergrund.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in mPSC4, hPSC1 und mCAF1 auf weicher (0,2 kPa) und fester (50 kPa) Gelmatrix durchgeführt; β-AKTIN diente als Ladungskontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 (mPSC4 n = 2) unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD. (C) Es wurde eine RT-qPCR zur Detektion des Transkriptlevels von *Prkaa1* und *Prkaa2* in mPSC4 durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von n = 5 unabhängigen Experimenten.

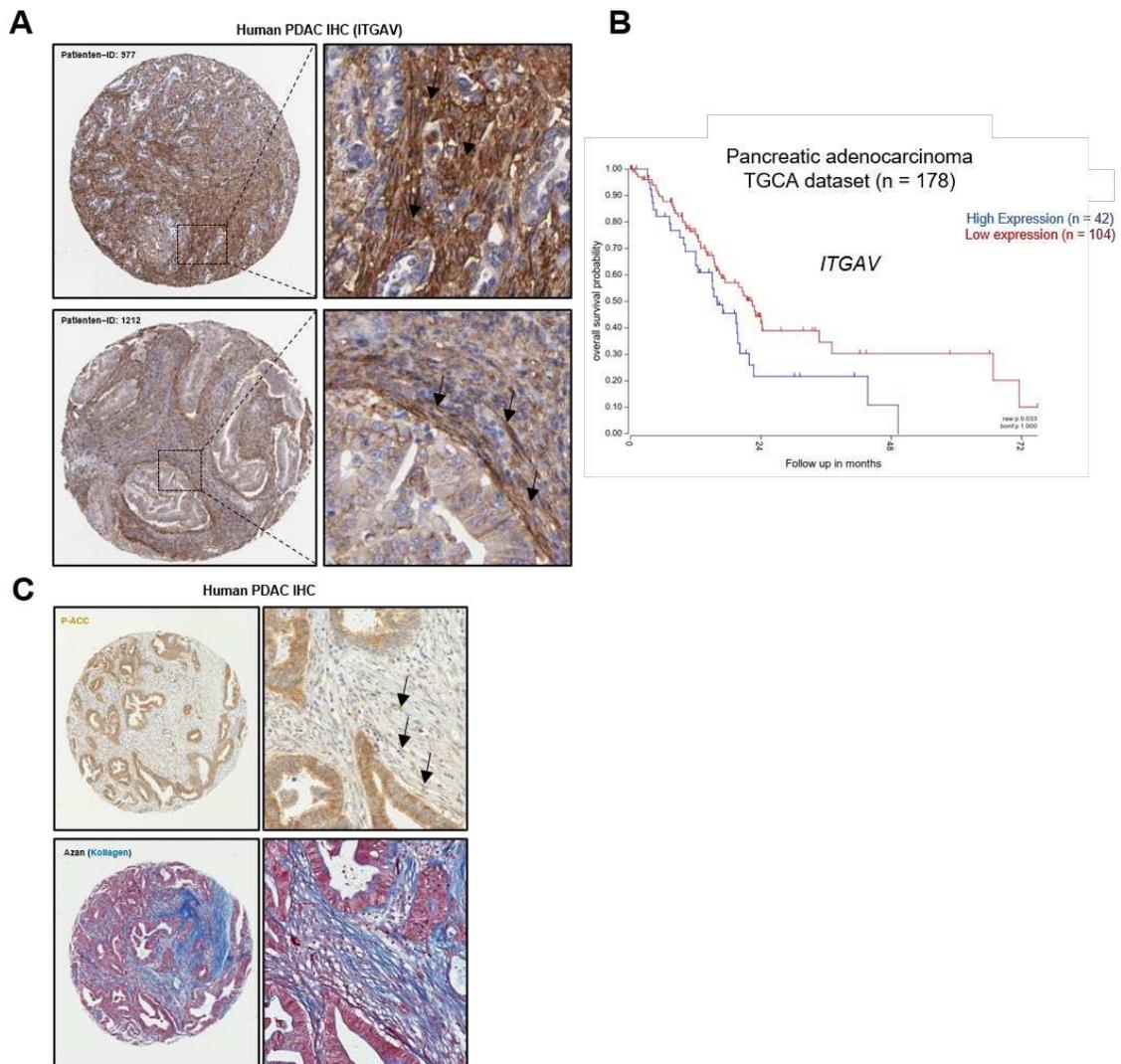
Zudem blieb die Menge des mTOR-Proteins unverändert. Anhand einer RT-qPCR der Transkripte der AMPK-Untereinheiten war außerdem zu erkennen, dass lediglich die Proteinmenge, nicht aber die Transkriptmenge auf den weichen Gelen reduziert war (Abb. 28C). Diese Daten stimmten mit den zuvor generierten Daten in den Mausfibroblasten überein; es konnte daher davon ausgegangen werden, dass der Mechanismus der besseren Stabilisierung von AMPK unter festen Bedingungen auch in den PSCs zutrif. Zur Bestätigung des Mechanismus und der beteiligten Proteine der FAs wurde auch in PSCs der Effekt der Herunterregulierung von *ItgaV* und *Ptk2* untersucht. Sowohl in der murinen PSC-Zelllinie als auch in den murinen Primärzellen mCAF1 konnte ein signifikanter Abfall der AMPK-Proteinmenge nach Knockdown von FAK (Abb. 29A/B) oder *ItgaV* (Abb. 29C/D) detektiert werden. Dies wurde sowohl in den

Immunoblots als auch in den Quantifizierungen deutlich. Dieses Ergebnis konnte auch mit dem FAK-Inhibitor PF-573228 (Abb. 29E/F) und mit dem ItgaV-Inhibitor CWHM-12 (Abb. E5) bestätigt werden.



**Abbildung 29: Die Stabilisierung von AMPK über ItgaV und FAK in PSCs.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in mPSC4 und mCAF1 auf Plastik Kulturschalen nach Knockdown von *ItgaV* durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladungskontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD. (C) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in mPSC4 und mCAF1 auf Plastik Kulturschalen nach Knockdown von *Ptk2* durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladungskontrolle. (D) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (C) gezeigten Experimenten ± SD. (E) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in mPSC4 und mCAF1 auf Plastik Kulturschalen nach Behandlung mit einem FAK-Inhibitor durchgeführt; β-AKTIN diene als Ladungskontrolle. (F) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (E) gezeigten Experimenten ± SD.

Die Daten zeigten bisher einen Einfluss der FA-Proteine, insbesondere ItgaV und FAK, auf die AMPK-Proteinmenge in den Stromazellen des Pankreas. In Patienten mit PDAC ist das Stroma heterogen, es gibt Bereiche mit ECM-reicheren und somit festerem Gewebe und Bereiche mit weniger ECM [88]. In Abbildung 30A ist eine immunhistochemische Färbung von ITGAV des Gewebeschnitts eines PDAC-Patienten zu sehen. Diese Färbung stammte von einer öffentlichen Datenbank (Protein Atlas).



**Abbildung 30: Die Korrelation zwischen der erhöhten ITGAV-Proteinmenge in stromareicher Umgebung und der PDAC-Mortalitätsrate.** (A) Dargestellt ist eine immunhistochemische Färbung von humanen PDAC-Gewebeschnitten aus Patienten (Protein Atlas). Anfärbt wurde das ITGAV-Protein. (B) Dargestellt ist eine Kaplan-Meier-Kurve (TCGA Dataset) von PDAC-Patienten, die eine Korrelation zwischen der Überlebensrate und der ITGAV-Expression aufzeigt. (C) Es wurde eine immunhistochemische Färbung von humanen PDAC-Gewebeschnitten aus Patienten durchgeführt. Anfärbt wurde das Protein p-ACC und Kollagen mittels Azan-Färbung.

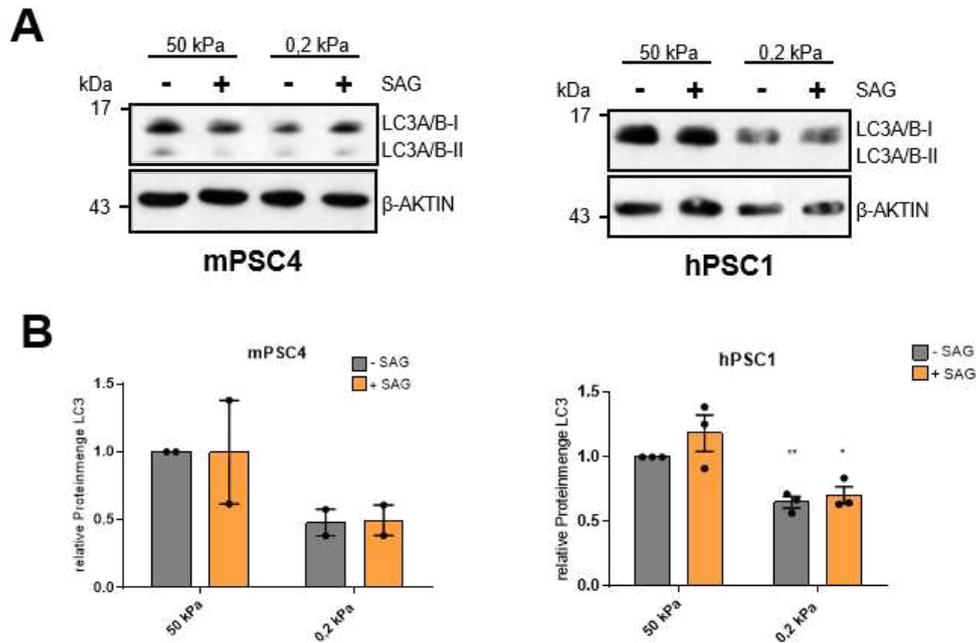
Die Bereiche mit verstärkter ITGAV-Expression waren in einem hohen Maß um die Tumorzellen lokalisiert. Dies wurde in der Publikation um Öhlund *et al.* deutlich, in der gezeigt wurde, dass die myCAFs eine höhere Menge an ECM produzieren und unmittelbar an den Tumorzellen lokalisiert sind. iCAFs dagegen lokalisieren sich in einer größeren Distanz zu den Tumorzellen und produzieren eine geringere Mengen an ECM [312]. Es konnte daher eine Korrelation zwischen festerem Tumorstroma und der Expression von ITGAV hergestellt werden. Die Kaplan-Meier-Kurve der ITGAV-Expression in Korrelation mit der Überlebensrate von PDAC-Patienten lässt erkennen,

dass eine erhöhte Expression von ITGAV zu einer deutlich geringeren Überlebensrate der Patienten führte. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte auch ein Zusammenhang mit AMPK, welches von der ITGAV-Expression abhängig ist, nicht ausgeschlossen werden. Eine immunhistochemische Anfärbung von AMPK in PDAC-Gewebeproben war nicht möglich, daher wurde eines der bekannten AMPK-Substrate, p-ACC sowie Kollagen als Marker für eine erhöhte Festigkeit des Gewebes angefärbt (Abb. 30C). Die Färbungen wurden von der Core Facility des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt. In der Aufnahme war zu erkennen, dass die Zellen in kollagenreichen Bereichen des Gewebes eine erhöhte p-ACC-Expression und demzufolge eine erhöhte AMPK-Expression aufwiesen.

## **5.4 Der Härtegrad beeinflusst die Autophagierate der Zelle**

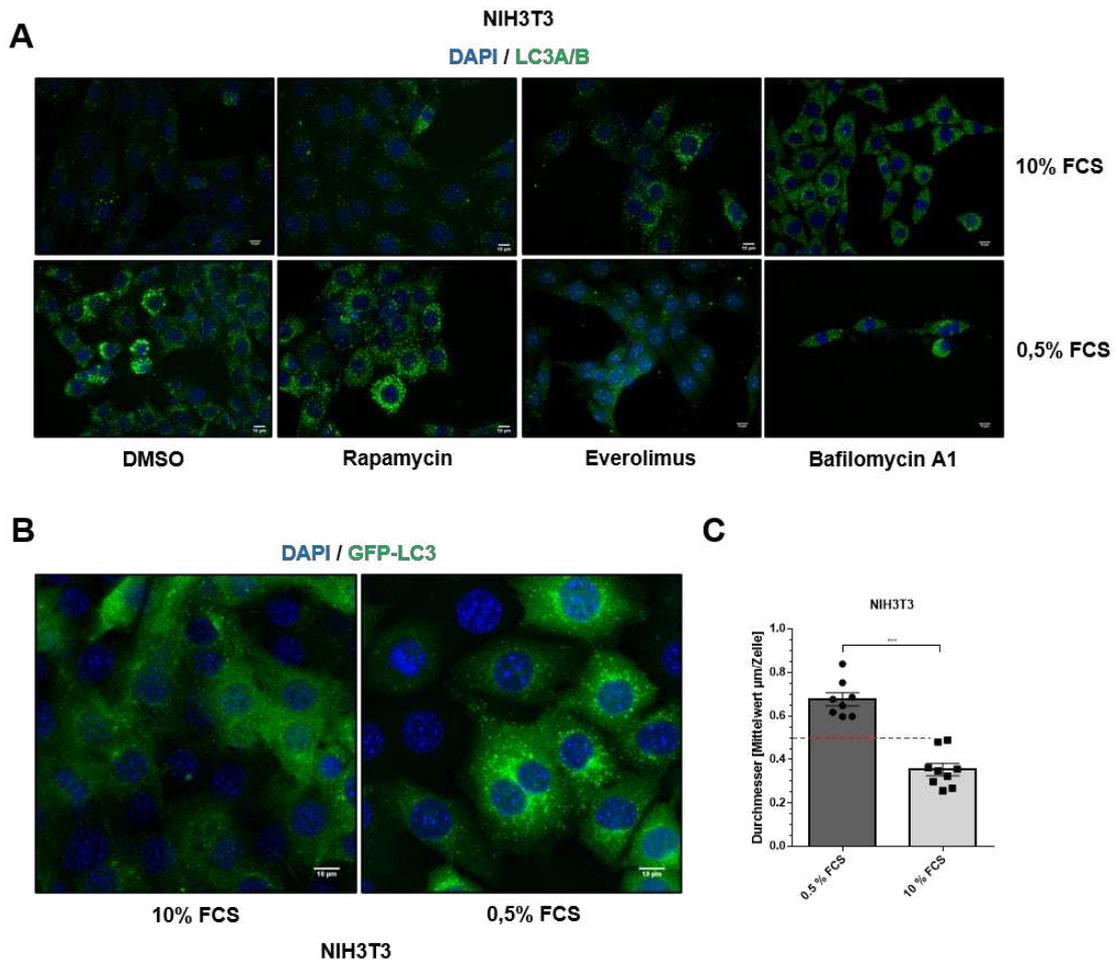
### **5.4.1 Die Autophagierate ist unter festen Bedingungen erhöht**

AMPK besitzt eine Reihe von Funktionen innerhalb der Zellen, eine davon ist die Regulation der Autophagie über die aktivierende Phosphorylierung von ULK1. Ein essentieller Marker der Autophagie ist das Protein LC3, das in die kleinere Form LC3-II gespalten wird und ein Teil der Membran der Autophagosomen ist [155]. Aufgrund der Unterschiede der AMPK-Expression je nach Härte des Untergrunds sollte nun die Expression des Proteins LC3 untersucht werden. Es wurden humane und murine PSCs auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und für 48 h mit SAG behandelt. Die Behandlung im Zusammenhang mit dem nährstoffarmen Medium diente zur Aktivierung von AMPK. Neben dem Vergleich der Proteinmenge auf weichem und hartem Untergrund sollte auch eine möglicherweise höhere Expression von LC3 durch Aktivierung der AMPK über SAG untersucht werden. Das Protein LC3 wurde mittels Immunoblot detektiert (Abb. 31A/B). Ähnlich dem AMPK-Protein, war hier eine deutlich niedrigere Expression an LC3 unter weichen Bedingungen zu erkennen. Diese Daten konnten sowohl in den murinen als auch in den humanen PSCs sowie in den Fibroblastenzelllinien NIH3T3 und MEF[GFP] repliziert werden (Abb. E6). Eine verstärkte Spaltung des LC3-I in die in der Autophagosomen-Membran vorkommenden LC3-II-Form war allerdings nicht zu erkennen, vielmehr war die Proteinmenge des gesamt-LC3 unter harten Bedingungen erhöht. Es wurde zudem kein Einfluss von SAG auf die Proteinexpression detektiert.



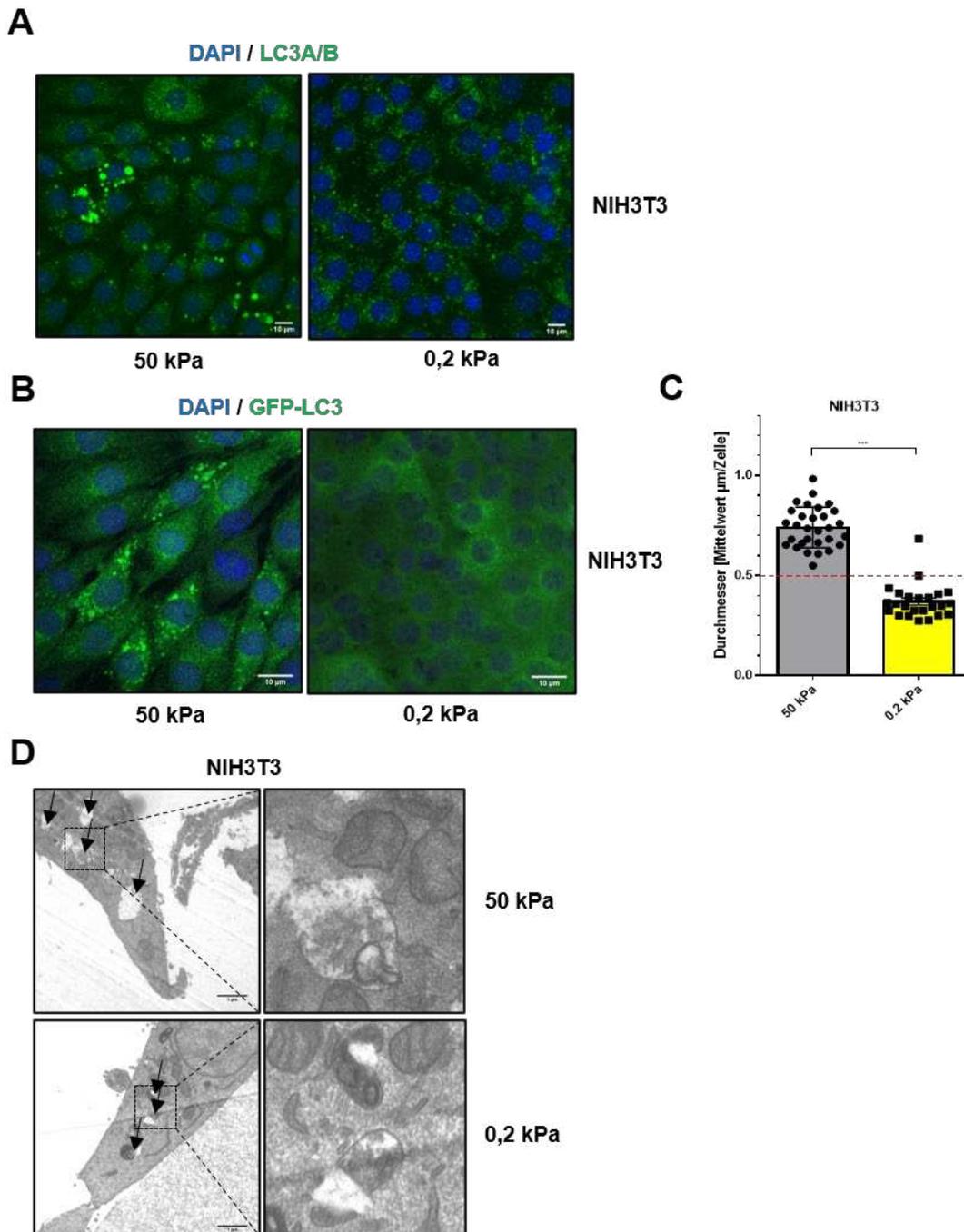
**Abbildung 31: Eine erhöhte LC3-Proteinexpression in PSCs auf hartem Untergrund.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von LC3 in hPSC1 und mPSC4, ausgesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix und behandelt mit SAG (100 nM) für 48 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeführt; β-AKTIN diente als Ladungskontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD.

Zur Bestätigung dieser Daten wurde das LC3 mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Zunächst sollte allerdings überprüft werden, ob die Immunfluoreszenzfärbung des LC3 funktioniert. Hierfür wurden Fibroblasten mit unterschiedlichen Autophagie-regulierenden Substanzen behandelt: Rapamycin (Sirolimus), ein mTORC1-Inhibitor und somit Induktor von Autophagie [392]; Everolimus, ein Rapamycin-Derivat und daher ebenfalls ein mTORC1-Inhibitor und Autophagie-Induktor [67]; Bafilomycin A1 (Baf. A1), ein Inhibitor der Fusion von Autophagosom und Lysosom und somit ein Autophagie-Inhibitor (Abb. 32A) [309]. Autophagie wurde durch Nährstoffmangel (0 % FBS) induziert, wie bei der DMSO-Kontrolle zu sehen ist. Es konnte weniger LC3 bei der Behandlung mit 10 %igem FCS-Medium nachgewiesen werden, während sich die Menge bei Behandlung mit serumreduziertem Medium erhöhte. Bei Behandlung mit den Autophagie-induzierenden Substanzen Rapamycin und Everolimus zeigte sich auch bei 10 % FCS Medium eine erhöhte Menge an LC3 und somit Autophagie. Baf. A1 wurde als Autophagie-Inhibitor eingesetzt, da die Autophagosomen aber trotzdem gebildet werden, war auch hier vermehrtes LC3 zu erkennen. Anhand dieser mikroskopischen Aufnahmen wurde deutlich, dass LC3 ein effektiver Marker für Autophagie ist. Es traten sowohl in serumreduziertem als auch in 10 %igem FCS-Medium nach Immunfärbung von LC3 grüne Vesikel auf, die sich allerdings in ihrer Größe unterschieden.



**Abbildung 32: Test der Immunfluoreszenzfärbung von LC3 und Definition eines Cutoffs.** (A) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Fibroblasten, behandelt mit den Autophagie Modulatoren Rapamycin (1  $\mu$ M), Everilonimus (1  $\mu$ M) und Bafilomycin A1 (100 nM) durchgeführt. Die Zellen wurden einmal in 0,5 % FCS Medium und einmal in 10 % FCS Medium kultiviert. Angefärbt wurde LC3A/B (grün) und der Zellkern mit DAPI (blau). Es folgten weitfeldmikroskopische Aufnahmen in einer 63x Vergrößerung, gezeigt ist die Maximumintensitätsprojektion. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m (B) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von stabilen NIH3T3 [GFP-LC3], kultiviert in 0,5 % und 10 % FCS-Medium durchgeführt. Angefärbt wurde der Zellkern mit DAPI (blau). Es folgten weitfeldmikroskopische Aufnahmen in einer 63x Vergrößerung, gezeigt ist die Maximumintensitätsprojektion. Maßstabsbalken = 10  $\mu$ m (C) Dargestellt ist die Quantifizierung der Größe der LC3-positiven Strukturen aus (B). Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD, jeder Punkt stellt ein Vesikel dar.

In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass nur Vesikel einer bestimmten Größe als Autophagosomen definiert werden können. Zur genaueren Definition wurden NIH3T3-Fibroblasten, die stabil LC3-GFP exprimierten, in 0,5 % und 10 % FCS DMEM für 48 h kultiviert und anschließend unter einem Weitfeldmikroskop analysiert (Abb. 32B). Daraufhin wurden die Größen der einzelnen Vesikel vermessen und ein Cutoff anhand der Größen in 0,5 % FCS und 10 % FCS bestimmt (Abb. 32C). Dieser Cutoff lag bei etwa 0,5  $\mu$ m: jedes Vesikel größer als 0,5  $\mu$ m wurde als Autophagosom definiert.

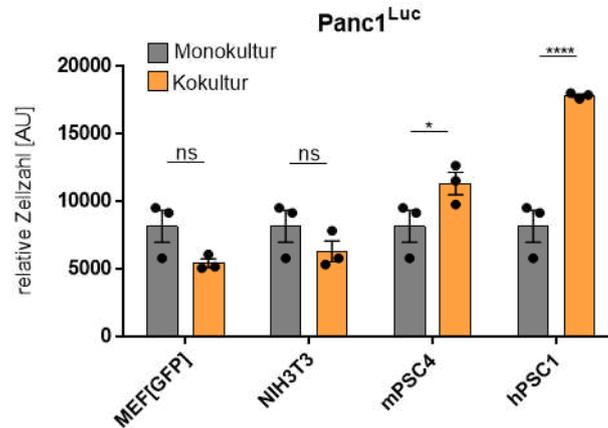


**Abbildung 33: Die Verstärkung der Autophagierate in Zellen auf festem Untergrund.** (A) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Fibroblasten auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix durchgeführt. Angefärbt wurde endogenes LC3A/B (grün) und der Zellkern mit DAPI (blau). Es folgten konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach-Zoom. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$  (B) Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von stabilen NIH3T3 [GFP-LC3] auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix durchgeführt. Angefärbt wurde der Zellkern mittels DAPI (blau). Es folgten konfokalmikroskopische Aufnahmen in einer 20x Vergrößerung mit 5fach-Zoom. Maßstabsbalken = 10  $\mu\text{m}$ . (C) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung der Größe der LC3-positiven Strukturen aus (B)  $\pm$  SD; jeder Punkt stellt ein Vesikel dar. (D) Dargestellt sind Aufnahmen von NIH3T3-Zellen auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (durchgeführt von der Core Facility EM des Universitätsklinikums Marburg). Die mit Pfeilen markierten Strukturen zeigen dabei die Autophagosomen.

Im Anschluss wurden NIH3T3-Zellen auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen ausgesät und erneut eine Immunfärbung des endogenem LC3 durchgeführt (Abb. 33A). Es war zu erkennen, dass die Autophagosomen in Zellen auf hartem Untergrund deutlich vergrößert auftraten. Dieses Ergebnis konnte mithilfe stabiler NIH3T3-[GFP-LC3]-Fibroblasten bestätigt werden (Abb. 33B). Auch hier waren die Autophagosomen unter harten Bedingungen deutlich vergrößert. Die Quantifizierung der Autophagosomen auf den unterschiedlichen Härtegraden bestätigte das bereits aufgrund der Bilder vermutete Ergebnis. Die LC3-positiven Strukturen waren in Zellen auf hartem Untergrund signifikant größer als unter weichen Bedingungen (Abb. 33C). Demzufolge besaßen Zellen auf hartem Untergrund eine deutlich erhöhte Autophagierate. Zur Bestätigung dieser Daten wurden die Zellen unter einem Transmissionselektronenmikroskop von der Core Facility EM des Universitätsklinikums Marburg untersucht. Auch hier war ein deutlicher Unterschied der Größe der Autophagosomen zwischen den unterschiedlichen Härtegraden zu erkennen (Abb. 33D).

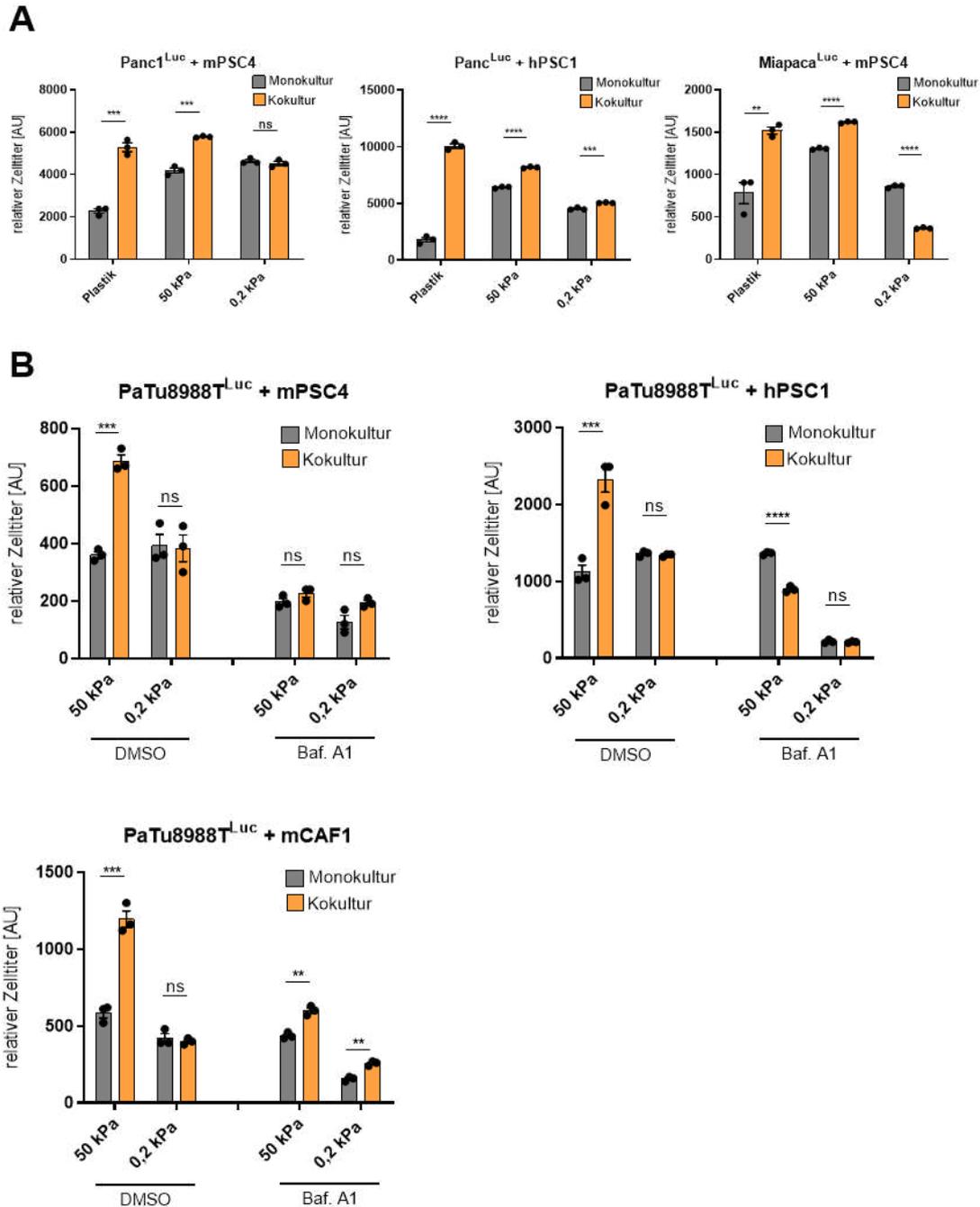
#### **5.4.2 Die Autophagie von Stromazellen beeinflusst das Wachstum der Tumorzellen**

Die Daten zeigten eine erhöhte Autophagierate in Zellen auf hartem Untergrund. Der Prozess der Autophagie dient zur Nährstoffgewinnung in nährstoffarmer Umgebung. Die Tumorzellen könnten durch die Signalauslösung der Stromazellen und der darauffolgenden Verhärtung der ECM die Autophagie in den Stromazellen anregen und somit genügend Nährstoffe zum Wachstum erhalten. Es wurden unterschiedliche Zelltypen, sowohl Mausfibroblasten als auch PSCs in Mono- und Kokultur mit einer Pankreaszelllinie, Panc1, die konstitutiv ein Luciferase-Reporterkonstrukt exprimiert, kultiviert. Anhand dieses Experiments sollte festgestellt werden, ob die Kokultur unter serumreduzierten Bedingungen einen verbesserten Effekt auf das Tumorstadium besaß. Der Luciferase-Assay zeigte ein signifikant besseres Wachstum der Tumorzellen in Kokultur mit PSCs, während die normalen Mausfibroblasten das Wachstum nicht beeinflussten (Abb. 34). Dies schien ein wichtiger Unterschied zwischen den Fibroblasten und den Fibroblasten-artigen PSCs zu sein. Lediglich die PSCs besaßen einen wachstumsfördernden Effekt auf die Tumorzellen.



**Abbildung 34: Die Förderung des Tumorwachstums durch PSCs.** Es wurden Viabilitätstests der Tumorzelllinie Panc1, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert ist, durchgeführt. Die Tumorzellen wurden entweder als Mono- oder als Kokultur mit diversen Zelllinien auf Plastikculturschalen für 4 d in 0 % FCS Medium kultiviert. Gezeigt ist der Mittelwert der Triplikate eines repräsentativen Luciferase-Assays von n = 3 unabhängigen Durchführungen des Experiments.

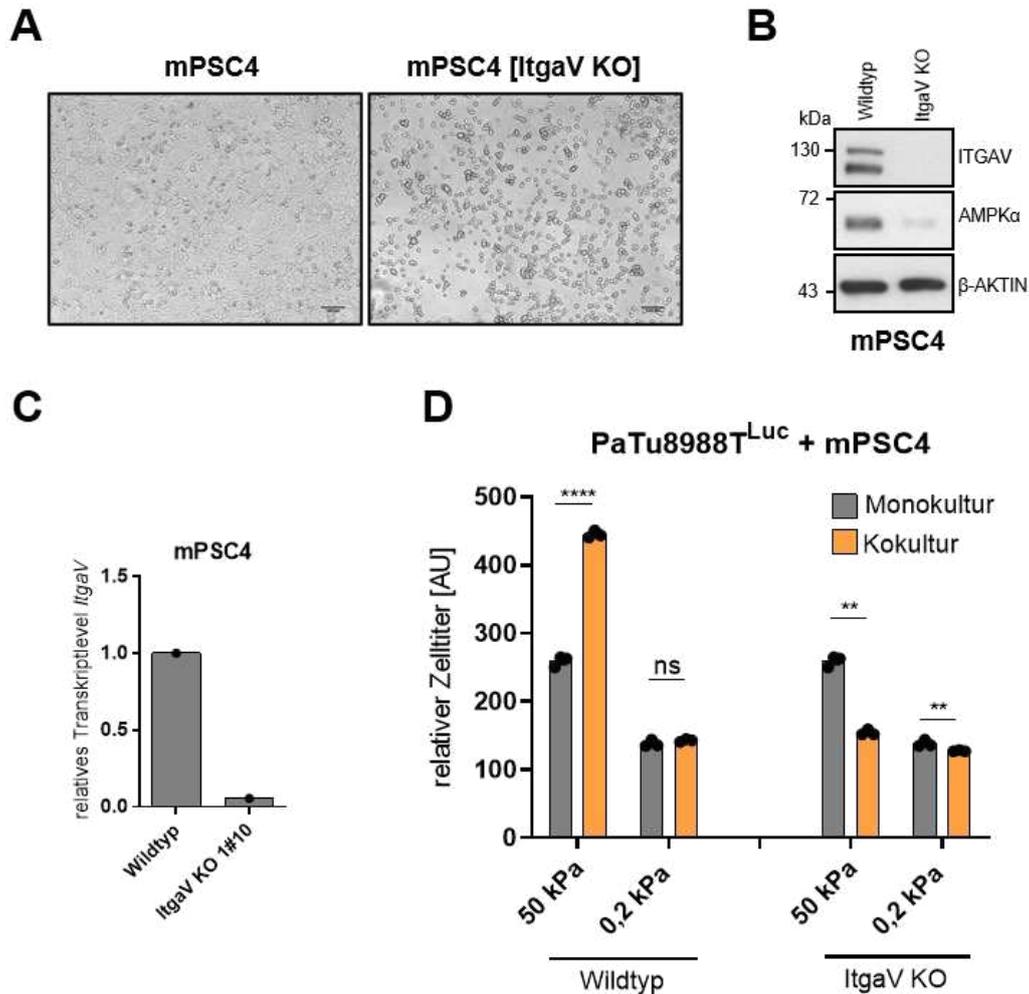
Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollte im Anschluss der Einfluss der PSCs auf das Tumorwachstum unter harten und weichen Bedingungen in 0 % FCS-Medium überprüft werden. Es wurden sowohl humane als auch murine PSCs mit Panc1<sup>Luc</sup>-Zellen kokultiviert und es konnte ein verstärktes Tumorwachstum auf Plastik und 50 kPa Gelen detektiert werden, während es auf 0,2 kPa Gelen ausblieb (Abb. 35A). Dieses Experiment wurde anschließend mit der murinen PSC-Zelllinie und einer weiteren Tumorzelllinie, Miapaca<sup>Luc</sup>, wiederholt und das Ergebnis bestätigt. Für eine weitere Bestätigung wurden humane und murine PSCs sowie die Primärzellen mCAF1 mit einer weiteren PDAC-Tumorzelllinie, PaTu8988T<sup>Luc</sup>, kokultiviert und zusätzlich mit dem Autophagie-Inhibitor Bafilomycin A1 für 4 d behandelt (Abb. 35B). Die Ergebnisse bestätigten zum einen die bereits beobachtete Förderung des Tumorwachstums lediglich unter harten Kultur-Bedingungen. Es konnte zudem durch den Autophagieinhibitor deutlich gemacht werden, dass diese Wachstumsförderung Autophagie-abhängig war, da sie nach Behandlung nicht mehr eintrat.



**Abbildung 35: Die Förderung des Tumorwachstums durch erhöhte Autophagie in PSCs.**

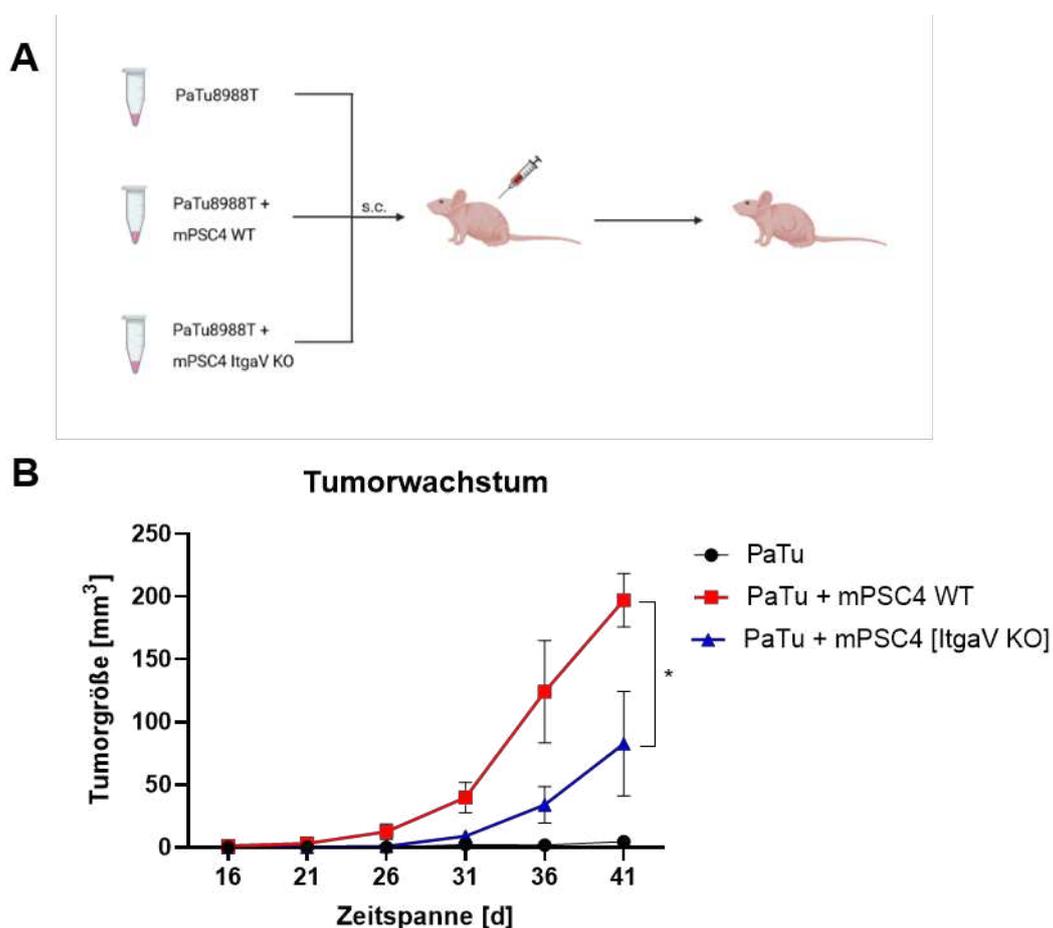
(A) Es wurden Viabilitätstests der Tumorzelllinien Panc1 und Miapaca, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert sind, durchgeführt. Die Tumorzellen wurden entweder als Mono- oder als Kokultur mit humanen und murinen PSC-Zelllinien auf Plastik Kulturschalen für 4 d in 0 % FCS Medium kultiviert. Gezeigt ist der Mittelwert der Triplikate eines repräsentativen Luciferase-Assays von n = 3 unabhängigen Durchführungen des Experiments. (B) Es wurden Viabilitätstests der Tumorzelllinien PaTu8988T, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert ist, durchgeführt. Die Tumorzellen wurden entweder als Mono- oder als Kokultur mit humanen und murinen PSC-Zelllinien sowie den Primärzellen mCAF1 für 4 d in 0 % FCS Medium auf den 50 kPa und 0,2 kPa Gelen kultiviert und mit Baf. A1 (100 nM) behandelt. Gezeigt ist der Mittelwert der Triplikate eines repräsentativen Luciferase-Assays von n = 3 unabhängigen Durchführungen des Experiments.

Um letztendlich eine Verbindung der bis jetzt in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über die Regulierung der Autophagie durch die Gewebehärtung und somit ITGAV und AMPK herzustellen, wurde über die CRISPR/Cas9-Technik ein *ItgaV*-Knockout der murinen PSC4-Zelllinie generiert. Der Knockout von *ItgaV* sollte eine Reduktion von AMPK und somit der Autophagie zur Folge haben.



**Abbildung 36: Der Einfluss des mPSC4-*ItgaV*-Knockout-(KO)-Klon auf das Tumorzellwachstum.** (A) Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp-mPSC4 und des mPSC4-*ItgaV*-Knockout-Klons auf Plastik in einer 10x Vergrößerung durchgeführt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m (B) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von ITGAV und AMPK in Wildtyp-mPSC4 und in Zellen des *ItgaV*-Knockouts nach Kultivierung für 48 h in 0,5 % FCS DMEM auf Plastik Kulturschalen durchgeführt;  $\beta$ -AKTIN diente als Ladungskontrolle. (C) Es wurde eine RT-qPCR zur Detektion des Transkriptniveaus von *ItgaV* im mPSC4-*ItgaV*-Knockout-Klon durchgeführt. (D) Es wurden Viabilitätstests der Tumorzelllinie PaTu8988T, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert ist, durchgeführt. Die Tumorzellen wurden entweder als Mono- oder als Kokultur mit Wildtyp-mPSC4 oder dem *ItgaV*-Knockout-Klon für 4 d auf 0,2 kPa und 50 kPa Gelen in 0 % FCS Medium kultiviert. Gezeigt ist der Mittelwert der Triplikate eines repräsentativen Luciferase-Assays von n = 3 unabhängigen Durchführungen des Experiments.

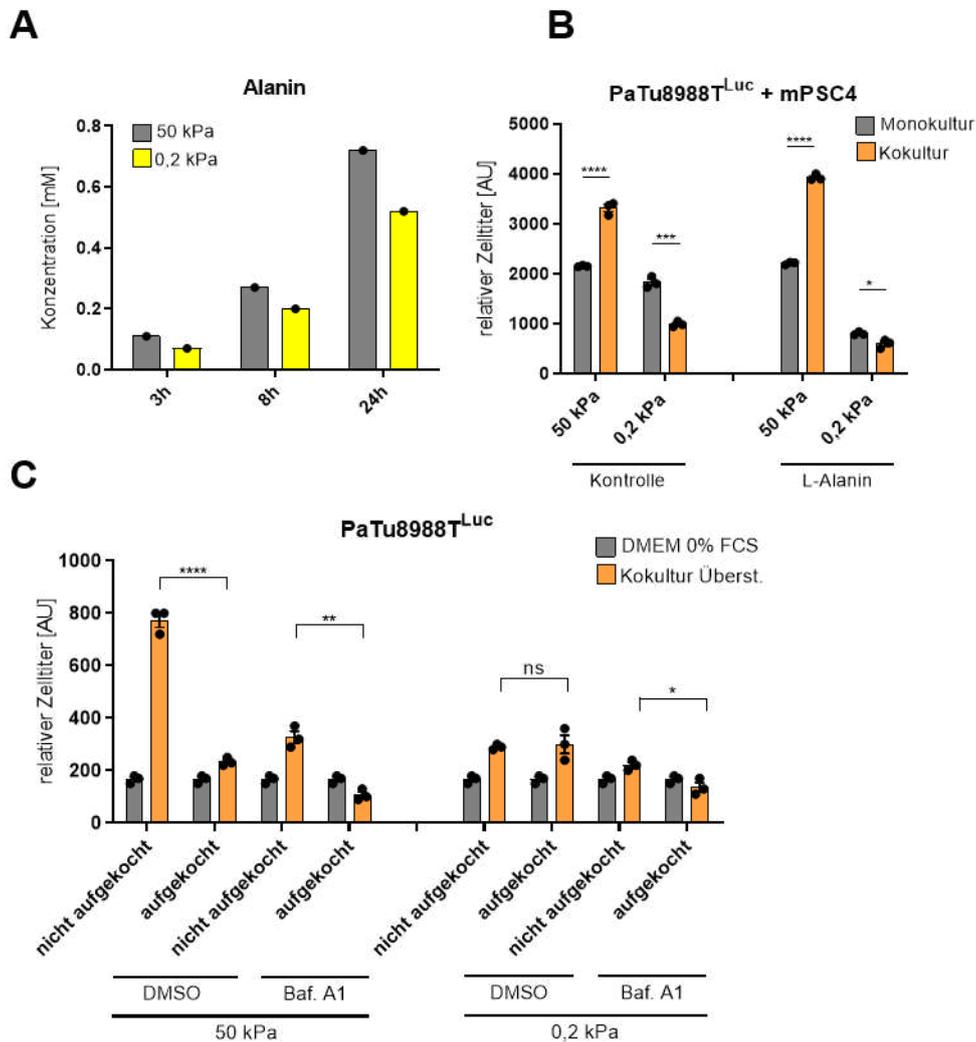
Die lichtmikroskopische Analyse zeigte eine deutliche morphologische Veränderung der Zellen nach erfolgreichem Knockout (Abb. 36A). Die Zellen waren abgerundet und weniger adhären, ähnlich dem Bild nach Behandlung mit dem *ItgaV*-Inhibitor CWHM-12. Der Knockout konnte sowohl auf Proteinebene mittels Immunoblot (Abb. 36B) als auch auf Transkriptebeine (Abb. 36C) bestätigt werden. Eine weitere Bestätigung war zudem der Abfall der AMPK-Proteinexpression nach vollständigem Knockout von *ItgaV*. Der Kokultur-Assay wurde nun sowohl mit Wildtyp-PSCs als auch mit den *ItgaV*-Knockout-PSCs zusammen mit der Tumorzelllinie PaTu8988T durchgeführt. Der anschließende Luciferase-Assay zeigte, dass lediglich die Wildtyp-PSCs einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum unter harten Bedingungen besaßen, die Knockout-Mutanten schienen diese Fähigkeit komplett verloren zu haben (Abb. 36D).



**Abbildung 37: Ein erhöhtes Tumorwachstum *in vivo* über die *ItgaV*-Signalkaskade in PSCs.** (A) Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Xenograft-Mausversuchs. Es wurde eine subkutane Injektion von PaTu8988T allein in Gruppe 1, von PaTu8988T + Wildtyp-mPSC4 in Gruppe 2 und von PaTu8988T + mPSC4 [ItgaV KO] in Gruppe 3 durchgeführt. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung des Tumorwachstums nach Injektion von jeweils n = 7 Mäusen pro Gruppe ± SD.

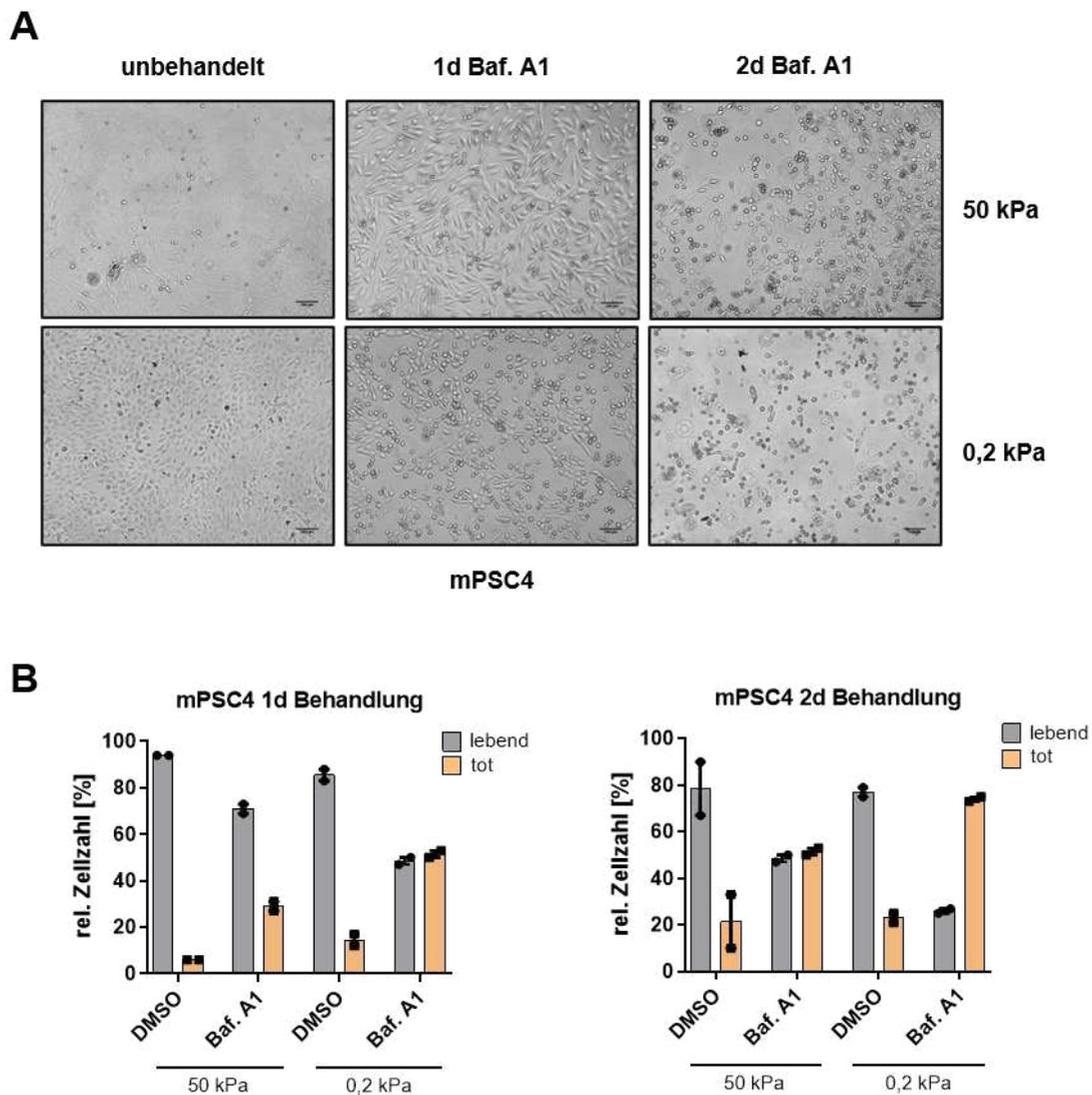
Die Ergebnisse *in vitro* sollten anschließend auch *in vivo* bestätigt werden. Hierfür wurde ein Xenograft-Modell verwendet. Die Nacktmäuse wurden in drei Gruppen zu jeweils sieben Tieren aufgeteilt und eine Kombination aus Tumorzellen und PSCs subkutan injiziert (Abb. 37A). In Kontrollgruppe 1 wurden die Tumorzellen PaTu8988T alleine gespritzt. In Gruppe 2 wurden die Tumorzellen PaTu8988T mit Wildtyp-PSCs in einem Verhältnis von 1:1 injiziert und in Gruppe 3 wurden die Tumorzellen mit *ItgaV*-Knockout-PSCs in einem Verhältnis von 1:1 injiziert. Es kam zu einem verringerten Tumorzellwachstum bei Abwesenheit von *ItgaV* in PSC-Zellen im Vergleich zu der Kombination mit den Wildtyp-PSCs (Abb. 37B). Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, wie die verstärkte Autophagie in den PSCs zu einem erhöhten Tumorwachstum führen. Es wurde bereits publiziert, dass die Aminosäure Alanin von den PSCs für die PDAC-Tumorzellen bereitgestellt wird. Diese Zellen benötigen Alanin z. B. für ihren Metabolismus, das Wachstum oder die Chemoresistenz [325]. Im Zusammenhang mit dem erhöhten Tumorwachstum in Kokultur mit PSCs auf hartem Untergrund könnte demnach auch die Sekretion von Alanin von Bedeutung sein. Mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse des Überstands von PSC-Kulturen in serumreduziertem Medium auf den Hydrogelen wurde deutlich, dass sich die Menge an Alanin im Laufe von 24 h unter beiden Bedingungen erhöhte (Abb. 38A). Die Massenspektrometrie-Analyse wurde von der Core Facility Metabolomics des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt. Ein Alanin-Rescue-Assay, bei dem die murine PSC-Zelllinie mit PaTu8988T-Tumorzellen auf Hydrogelen kokultiviert und parallel mit L-Alanin behandelt wurde, zeigte jedoch deutlich, dass die Konzentration an Alanin keinen Einfluss auf die Förderung des Wachstums unter weichen Bedingungen besaß. Alanin ist eine Aminosäure, die im Gegensatz zu Proteinen durch das Erhitzen nicht zerstört werden kann. Ein Teil der PSC-Überstände der Massenspektrometrie-Analyse sowie Überstände von mPSC4 behandelt mit Baf. A1 (100 nM) wurde bei 100 °C für 5 min erhitzt (aufgekocht). Anschließend wurden die aufgekochten und nicht aufgekochten Überstände auf die PaTu8988T<sup>Luc</sup>-Zellen gegeben und das Wachstum anhand eines Luciferase-Assays gemessen (Abb. 38B). Die unbehandelten Überstände hatten den bereits verifizierten Effekt auf das Wachstum der Tumorzellen. Die Überstände von Zellen auf 50 kPa Gelen besaßen den wachstumsfördernden Effekt, während die Überstände von Zellen auf 0,2 kPa Gelen keinen Einfluss auf das Tumorzellwachstum hatten. Vergleichbar mit den vorherigen Experimenten verlor sich der Effekt bei den Überständen, die von Baf. A1-behandelten mPSC4 stammten. Interessanterweise verlor sich der Effekt auf den 50 kPa Gelen auch nach dem Erhitzen der Überstände. Die Ergebnisse bestätigten somit, dass Alanin keinen Einfluss auf die

Wachstumsförderung der Tumorzellen durch die PSCs besaßen, vielmehr scheint es sich um einen Effekt von sekretierten Proteinen zu handeln.



**Abbildung 38: Der Einfluss von Alanin auf das Wachstum der Tumorzellen in Ko-Kultur mit PSCs.** (A) mPSC4-Zellen wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 8 h, 24 h) mit Bafilomycin A1 (100 nM) in 0 % FCS DMEM kultiviert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Massenspektrometrie-Analyse der Alaninkonzentration gegeben. Dargestellt ist die Konzentration aus einer Messung. Die Messung wurde von der Core Facility Metabolomics des Universitätsklinikums Marburg durchgeführt (B) Es wurden Viabilitätstests der Tumorzelllinie PaTu8988T, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert ist, durchgeführt. Die Tumorzellen wurden entweder als Mono- oder als Kokultur mit mPSC4-Zellen für 4 d in 0 % FCS-Medium kultiviert und mit L-Alanin (1 mM) behandelt. Gezeigt ist der Mittelwert der Triplikate eines repräsentativen Luciferase-Assays von n = 3 unabhängigen Durchführungen des Experiments. (C) Es wurden Viabilitätstests der Tumorzelllinie PaTu8988T, die mit einem Luciferase-Reporterkonstrukt transfiziert ist, durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit aufgekochten und nicht-aufgekochten Überständen, hergestellt wie in (A) allerdings für 3 d behandelt (DMSO oder Baf. A1, 100 nM) und für 4 d auf 50 kPa und 0,2 kPa Gelen kultiviert. Gezeigt ist der Mittelwert der Triplikate eines repräsentativen Luciferase-Assays von n = 3 unabhängigen Durchführungen des Experiments.

Es könnte auch möglich sein, dass die PSCs im Allgemeinen keinen Einfluss auf die Wachstumsförderung von Tumorzellen, sondern auf das eigene Überleben besitzen. Es wurden daher mPSC4-Zellen auf weichem und hartem Untergrund ausgesät und mit dem Autophagie-Inhibitor Baf. A1 für 1 d und 2 d behandelt (Abb. 39A). Es war zu erkennen, dass auf 0,2 kPa Gelen bereits nach 1 d Behandlung die Hälfte der Zellen abstarben, während bei 50 kPa Gelen dieser Effekt erst nach 2 d Behandlung zu beobachten war (Abb. 39B). Dieses Ergebnis könnte einen Hinweis darauf sein, dass die PSCs unter harten Kultur-Bedingungen besser überlebten.



**Abbildung 39: Der Einfluss der Untergrundhärte auf das Überleben von PSCs.** mPSC4 wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät und 1 d oder 2 d mit Baf. A1 (100 nM) in 0 % FCS DMEM kultiviert. (A) Es wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der mPSC4-Zellen nach der Behandlung in einer 10x Vergrößerung durchgeführt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m (B) Es folgte die Bestimmung der Anzahl an lebenden und toten mPSC4-Zellen mittels Trypanblaufärbung in einer Neubaur-Zählkammer. Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 2 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.

## 6. Diskussion

Die gewonnenen Ergebnisse konnten aufzeigen, dass die Autophagie der Stromazellen, speziell der PSCs, einen deutlichen Einfluss auf das Tumorwachstum in PDAC besitzt. Zudem wurde innerhalb dieser Arbeit aufgezeigt, dass der Prozess der Wachstumsförderung über die Umgebungshärte kontrolliert wird. Dies erfolgt über eine Signalkaskade, welche die Integrine, FAK und den metabloschen Masterregulator AMPK miteinschließt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse genauer diskutiert werden.

### 6.1 Der Hh-Signalweg wird nur zu einem geringen Maß von der Gewebehärte beeinflusst

Der Hh-Signalweg ist bei vielen zellulären Prozessen sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in adulten Geweben und ebenso in verschiedenen Tumoren beteiligt. Speziell für den kanonischen, aber auch für eine Anzahl an nicht-kanonischen Hh-Signalwegen ist das Primärzilium das entscheidende Organell der Signalweiterleitung. Die Ziliogenese ist dabei ein komplexer Mechanismus, der nicht nur den Aufbau des Ziliums, sondern auch dessen Länge bestimmt. Es gibt eine Reihe von Proteinen und Strukturen, die die Länge des Primärziliums regulieren und beeinflussen können, unter anderem das Aktinzytoskelett der Zelle. Das Aktinzytoskelett ist zum einen für die Migration des Basalkörpers verantwortlich, zum anderen verankert sich der Basalkörper mithilfe von FAs an das Zytoskelett der Zelle [12]. Die Gruppe um Kim *et al.* konnte zeigen, dass Proteine des Aktinzytoskeletts wie etwa Gelsolin (GSN), Advillin (AVIL) und *actin related protein 3* (ARP3) die Zilienlänge beeinflussen [218]. GSN und AVIL sind dabei Modulatoren, die das F-Aktin abtrennen können und somit die F-Aktin-Fasern zerstören, während ARP3 ein Teil des ARP2/3-Komplexes darstellt, der essentiell für die Aktinpolymerisierung ist. Das Herunterregulieren von GSN und AVIL führt zu einer Inhibition der Ziliogenese, während das Herunterregulieren von ARP3 eine Elongation des Ziliums zur Folge hat [218, 376]. Die Behandlung mit Aktinmodulatoren, wie etwa Cytochalasin D kann diese Ergebnisse bestätigen. Eine hohe Menge an F-Aktin inhibiert die Ziliogenese, während Aktindepolymerisierung die Elongation des Ziliums fördert [218, 287]. In Abbildung 7B ist eine deutliche Veränderung des Aktinzytoskeletts in Zellen bei unterschiedlichen Härtegraden des Untergrunds zu erkennen. Auf hartem Untergrund besitzen die Zellen ein verstärktes Netz an F-Aktin-Fasern, was die Zilienlänge und somit auch den Hh-Signalweg beeinflussen könnte. Interessanterweise zeigt die Messung der Zilienlänge anhand von

Immunfluoreszenzbildern ein signifikant längeres Primärzilium in Zellen auf hartem Untergrund im Vergleich zu Zellen auf weichem Untergrund (Abb. 10). Dieses überraschende Ergebnis zeigt, dass die physikalischen Eigenschaften der Umgebung zwar Einfluss auf die Zilienlänge besitzen, jedoch im Kontrast zu den obigen, bereits publizierten Erkenntnissen stehen. Es ist jedoch auch zu erwähnen, dass Stressfasern zwar einen negativen Einfluss auf die Ziliogenese besitzen, das F-Aktin-Netzwerk dennoch essentiell für das Primärzilium ist. Ein dichtes Netzwerk befindet sich in den Zilientaschen, um dort die Membran zu stabilisieren und die Struktur/Funktion des Ziliums zu erhalten [293]. Es ist zudem auch essentiell für die Stabilität des Ziliums und den IFT [472]. Das bruchstückhafte Aktinzytoskelett auf 0,2 kPa Gelen könnte entweder nicht ausreichend zerstört sein, um eine Verlängerung des Ziliums zu bewirken und/oder weitere unbekannte, mechanistische Faktoren haben Einfluss auf die Ziliumlänge, die unabhängig vom Aktinzytoskelett sind.

Das Primärzilium ist ein essentielles Organell für den Hh-Signalweg, da sowohl die Lokalisation der Rezeptoren wie SMO [85] als auch der IFT im Zusammenhang mit GLI2/3-Transport damit verbunden sind [161]. Proteine wie etwa *broad-minded* (BROMI) sind in der Lage sowohl die Ziliogenese als auch die Lokalisation von GLI2 im Zilium zu regulieren [223]. Während *missing in metastasis* (MIM) zum einen die Zilienlänge durch Inhibition der Aktinpolymerisierung reguliert, stellt es zum anderen auch einen entscheidenden Interaktionspartner von GLI2 und SUFU dar [33, 54]. Es ist somit ein Regulator, welcher die Zilienlänge und den Hh-Signalweg steuern kann. Es gibt zwar Proteine, welche die Zilienlänge mit dem Hh-Signalweg in Verbindung bringen, allerdings ist der Einfluss der Zilienlänge auf die Stärke des Signalwegs umstritten. In Publikationen konnte gezeigt werden, dass ein verkürztes Zilium eine schwächere Aktivierung des Hh-Signalwegs zur Folge hat [60], andere Publikationen wiederum zeigten, dass trotz verkürzter Zilien eine normale Hh-abhängige Entwicklung stattfinden kann [21]. Die Untersuchung des GLI1-Transkriptionsfaktors in Zellen auf weichem und hartem Untergrund zeigte sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptebeine keinen signifikanten Unterschied (Abb. 8). Jedoch war auf Proteinebene eine leicht erhöhte Expression von GLI1 unter weichen Bedingungen zu erkennen, während auf Transkriptebeine das Gegenteil der Fall war. Die Ergebnisse der Proteinanalyse konnten zudem auch durch eine *Gli1*-Expressionsanalyse, sowie einem Alkalischen-Phosphatase-Assay verifiziert werden. In beiden Fällen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen auf 0,2 kPa und 50 kPa Gelen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar die Zilienlänge durch den Untergrund beeinflusst wird, der Hh-Signalweg jedoch nur zu einem geringen Maß.

Die Verbindung des Hh-Signalwegs mit dem Aktinzytoskelett findet größtenteils auf nicht-kanonischer Ebene statt. Es kann zu einer SMO-abhängigen Reorganisation des Zytoskeletts und der Bildung von F-Aktin-Netzwerken kommen [76, 365]. Dies kann unter anderem durch die Aktivierung der Src-Kinase [43], über eine Tiam1-Rac-Signalkaskade [365] oder durch die Stimulierung des Leukotrien-Metabolismus [37] erfolgen. Ein direkter Effekt des Aktinzytoskelett auf den Signalweg ist jedoch weitestgehend unbekannt, die Literatur deutet eher auf eine Beteiligung des Primärziliums hin. Zur genaueren Analyse wurden in dieser Arbeit die Effekte von Aktinmodulatoren in Zellen auf Hydrogelen untersucht (Abb. 9). Durch die Behandlung von Mausfibroblasten mit Aktinmodulatoren, wie etwa Cytochalasin D, sollte auf den 50 kPa Gelen das Aktinnetzwerk der 0,2 kPa Gele imitiert werden. Der Einfluss auf den Hh-Signalweg war jedoch nach der Behandlung bei beiden Gelhärten ähnlich. Es kam unter beiden Bedingungen zu einem Anstieg und Hh-Aktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Veränderung des Aktinzytoskelett weder auf den Hh-Signalweg noch auf die Zilienlänge einen signifikanten Einfluss hat. Ebenso zeigen die Protein- und Transkriptanalysen keinen deutlichen Effekt der Gewebehärte auf die Aktivierung des Hh-Signalwegs in Fibroblasten. Lediglich die Zilienlänge schien durch unterschiedliche Festigkeiten des Untergrunds beeinflusst zu werden, der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt.

## 6.2 Die Stabilisierung von AMPK erfolgt über Itg $\alpha$ V und FAK in Fibroblasten

Die Proteinkinase AMPK gilt als Sensor des Verhältnisses von ATP/AMP und passt den Metabolismus der Zelle entsprechend des Energiezustandes an. Tumorzellen, die unter Spannung stehen, gleichbedeutend mit einer festen Umgebung, besitzen ein niedrigeres Verhältnis von ATP zu AMP als Zellen in weicher Umgebung [477]. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die ECM den Metabolismus der Zellen beeinflussen kann. Die Gruppe um Park *et al.* untermauert diese Resultate, indem sie zeigten, dass die Reorganisation des Aktinzytoskelett aufgrund erhöhter Festigkeit der ECM zu einer Förderung der Glykolyse der Zellen führt [323]. Sowohl die Steuerung des Energielevels, als auch die Regulation der Glykolyse kann über AMPK erfolgen [167]. Es wurde zudem bereits gezeigt, dass der Mechanotransduktionskomplex um E-Cadherin, einem für Zelladhäsion wichtigen transmembranen Glykoprotein, durch mechanische Stimuli die AMPK-Aktivität über LKB1 erhöhten kann [26]. AMPK kann außerdem in Lungenepithelzellen durch das Ausdehnen während des Atmungsprozesses im Zusammenhang mit Dystroglykan aktiviert werden [47]. Es gibt somit bereits einige

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Gewebehärte, der Mechanotransduktion und dem Zellmetabolismus, speziell im Falle von AMPK. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AMPK-Proteinexpression in Fibroblasten auf weichem Substrat signifikant geringer war als auf hartem (Abb. 11). Es bestand dagegen kein Unterschied in der Transkriptmenge. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der Effekt von unterschiedlichen Härtegraden auf die AMPK-Expression lediglich auf Proteinebene stattfindet, die Transkriptions- und Translationsraten davon jedoch unberührt bleiben.

Einer der bekanntesten Gegenspieler der AMPK ist mTOR, ein Teil der mTORC1- und mTORC2-Komplexe, welche im Gegensatz zu AMPK energieverbrauchende Prozesse fördern [263]. Daher ist es nicht unwahrscheinlich, dass die mTOR-Proteinexpression ebenfalls von der Gewebehärte reguliert wird. Die Proteinmenge von mTOR könnte durch die erhöhte Menge an AMPK unter harten Bedingungen beeinflusst werden. Es wurde bereits gezeigt, dass AMPK mTORC1 durch unterschiedliche Mechanismen regulieren und inhibieren kann [196]. Eine Inhibition ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einem verringerten Proteinlevel. Es ist zudem bekannt, dass mTOR ebenfalls über den Prozess der Mechanotransduktion aktiviert werden kann. Die Gruppe um Lee *et al.* zeigte, dass eine Schockwelle und folglich eine Signalübertragung über Integrine zur Phosphorylierung und somit Aktivierung von mTORC1 führt [241]. Zudem kann die Aktivierung auch über mechanische Stimuli wie etwa das Strecken der Skelettmuskulatur erfolgen [176]. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Menge an mTOR-Protein in Zellen auf 0,2 kPa und 50 kPa Gelen nicht unterschied. Da sich AMPK und mechanische Reize auf die Aktivierung von mTOR auswirken, wurde auch das Level an p-mTOR (Ser2448) überprüft (Abb. E7). Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen weichem und hartem Untergrund zu erkennen. Somit hat die Gewebehärte zwar Einfluss auf AMPK, das mTOR-Protein bleibt jedoch unbeeinflusst.

Park *et al.* beschreiben außerdem, dass ein entscheidendes Enzym der Glykolyse, die Phosphofruktokinase (PFK), auf weichem Substrat weniger stabil und schneller abgebaut wird als auf festem. Dieser Abbau wird durch die E3-Ubiquitinligase TRIM21 initiiert, diese ubiquitiniert das Protein und markiert es für die Degradation. TRIM21 wird auf hartem Untergrund durch die entstehenden Stressfasern inaktiviert und kann somit PFK nicht für den proteasomalen Abbau markieren [323]. Die unterschiedliche Proteinmenge von AMPK auf weicher und harter Gelmatrix könnte ebenfalls durch einen Stabilisierungsmechanismus begründet sein. Die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid, einem Inhibitor der Proteinbiosynthese, zeigte einen schnelleren Abbau

von AMPK auf 0,2 kPa Gelen (Abb. 18). Dieser Abbau war AMPK-spezifisch, da die Abbaurrate von mTOR unverändert war. Der Abbau von Proteinen der Zelle kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen, die bekanntesten sind dabei der Ubiquitin-Proteasom-Abbau und der lysosomale Abbau [80]. Das wahrscheinlichste Szenario ist ein schnellerer Abbau über das Proteasom, ähnlich den Ergebnissen von Park *et al.* Für die Bestätigung dieser Annahme wurden die Fibroblasten mit dem Proteasominhibitor MG132 behandelt (Abb. 18). Die AMPK-Proteinexpression in Zellen auf 0,2 kPa Gelen reichte nach der Behandlung nahezu an das der Zellen auf 50 kPa heran. Es erfolgte somit ein signifikanter Anstieg der Menge an AMPK nach Proteasominhibitor-Behandlung. Die Annahme einer Beteiligung des Proteasoms an der Destabilisierung von AMPK auf weichem Substrat scheint sich damit zu bestätigen. Diese Hypothese konnte in einem weiteren Experiment verstärkt werden. Hierfür wurde ein GFP-Konstrukt, welches dank einer integrierten PEST-Sequenz unmittelbar nach Expression proteasomal abgebaut wird, in Fibroblasten transfiziert. Das Experiment zeigte einen signifikant schnelleren Abbau des GFP-Konstrukts auf weichem Untergrund. Der proteasomale Abbau schien demzufolge auf weichem Untergrund deutlich schneller zu erfolgen. Die Hypothese der Proteasombeteiligung scheint aufgrund der gewonnenen Ergebnisse zwar als sehr wahrscheinlich, für einen endgültigen Beweis müsste jedoch noch eine verstärkte Ubiquitinierung der AMPK auf weichem Substrat bestätigt werden. Die Frage, wie der schnellere Abbau oder die bessere Stabilisierung erfolgt, ist ebenfalls noch ungeklärt. Es könnte hierbei ebenfalls an der Beteiligung einer Ubiquitinligase liegen. Die E3 Ubiquitinligase *cell death-inducing DFFA-like effector a* (CIDEA) ist in der Lage, das AMPK-Protein durch Interaktion mit dessen  $\beta$ -UE zu regulieren. Die Aktivierung von CIDEA führt zu einem Abbau von AMPK in braunem Fettgewebe [342]. Zudem kann AMPK mit der nicht-ATPase-UE des Proteasoms, PSMD11, direkt interagieren und unter anderem den Phosphorylierungsstatus dieser Untereinheit regulieren [294]. Ein möglicher Effekt auf den AMPK-Abbau ist dabei jedoch nicht bekannt. Da der verstärkte Abbau oder die bessere Stabilisierung auf unterschiedlichen Härtegraden nicht ubiquitär auf alle Proteine der Zelle wirkt, scheint eine Beteiligung einer Ubiquitinligase am wahrscheinlichsten. Eine generelle Hochregulierung der Proteasomaktivität würde einen Einfluss auf eine Reihe von Proteinen haben, was im Rahmen dieser Arbeit aber nicht näher untersucht werden konnte.

Um ein genaueres Verständnis der Regulierung der AMPK-Expression bei unterschiedlichen Härtegraden der Unterlage zu erhalten, sollte zunächst der Prozess der Mechanotransduktion genauer analysiert werden. Die Fibroblasten müssen in der Lage sein, die Veränderung der ECM-Zusammensetzung zu erkennen und diese

mechanischen Reize in die Zelle weiterleiten, um so eine Stabilisierung der AMPK zu bewirken. Eine der Hauptstrukturen der Mechanotransduktion sind hierbei die FAs. Diese bestehen aus einer Reihe von Proteinen, von denen die Integrine zu den wichtigsten Komponenten gehören, da sie den extrazellulären Raum mit dem Inneren der Zelle verbinden. Eine Verbindung zwischen AMPK und den Integrinen konnte bereits von einigen Gruppen bewiesen werden: AMPK kann die Aktivität der  $\beta$ 1-UE über eine negative Regulation der Integrin-Bindeproteine Tensin1 und Tensin3 steuern. Eine Inhibition der AMPK führt zu einer erhöhten Expression der Tensine und somit einer verbesserten  $\beta$ 1-Integrinaktivität sowie der Förderung von fibrillären Adhäsionskomplexen und Integrin-abhängigen Prozessen [128, 129]. AMPK ist zudem am Internalisierungsprozess verschiedener Integrine beteiligt, speziell in Verbindung mit der  $\beta$ 1-UE [361]. Eine Beteiligung dieser Integrine an der Regulation der Proteinexpression von AMPK ist daher möglich, wenngleich es kaum Publikationen über einen Effekt der Integrine auf AMPK gibt. Um ein genaueres Bild zu erhalten, welche möglichen Integrin-Untereinheiten beteiligt sein können, wurde auf Plastik Kulturschalen ein siRNA-Screening in Mausfibroblasten durchgeführt (Abb. 19). Dieses Screening ergab nach Knockdown der meisten Untereinheiten keinen signifikanten Effekt auf die AMPK-Proteinexpression mit Ausnahme von Itg $\alpha$ V. Durch den Knockdown dieser Untereinheit war ein deutlicher Abfall der AMPK-Proteinexpression zu erkennen, das AMPK-Transkriptlevel blieb jedoch unverändert. Auch durch Behandlung mit dem Itg $\alpha$ V-Inhibitor CWHM-12 wurde die Menge an AMPK signifikant reduziert (Abb. 20). Die  $\alpha$ V-UE wurde zunächst im Zusammenhang mit der  $\beta$ 3-UE charakterisiert und mit dem Prozess der Angiogenese assoziiert [45]. Es ist in der Lage, ECM-Komponenten wie Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen und Osteopontin zu binden, und ist zudem im Ovarialkarzinom überexprimiert, jedoch nicht im gesunden Ovarialgewebe [436]. Myofibroblasten sind in der Regel die Hauptquelle der ECM-Komponenten während der Wundheilung oder der Entwicklung einer Fibrose [170]. Fibroblasten sind sensitiv für mechanische Stimuli und können diese durch Integrine detektieren und in biochemische Signale umwandeln. Während der Entwicklung einer Fibrose ist vor allem die  $\alpha$ V-UE der Integrine bedeutsam. Die Herunterregulierung dieser Untereinheit inhibiert die Fibrose in unterschiedlichen Organen, wie etwa der Leber, der Lunge oder den Nieren. Von der Gruppe um Henderson *et al.* wurde postuliert, dass TGF $\beta$  durch die Inhibition der  $\alpha$ V-UE in seiner Aktivität gestört wird [165]. Es ist bereits bekannt, dass TGF $\beta$  ein profibrogenes Zytokin ist, welches die Fibrose in vielen Organen reguliert [135]. TGF $\beta$ 1 kann in Fibroblasten die Expression von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrinen hochregulieren, was unter anderem über die Zelladhäsion sowie die Phosphorylierung von FAK und der Src-Kinase erfolgt [329]. TGF $\beta$ 1 reguliert zudem die Expression des Integrins  $\alpha$ V $\beta$ 6, dessen

Herunterregulierung zu einer weniger ausgeprägten Lungenfibrose führt [299]. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sowie bereits existierender Publikationen kann daher eine Verbindung zwischen der Verhärtung des Gewebes, einer Fibrose, und speziell der Expression der  $\alpha$ V-UE der Integrine hergestellt werden. Es ist daher möglich, dass die  $\alpha$ V-UE sowohl einen Einfluss auf die Entstehung der Fibrose als auch auf die damit einhergehende Stabilisierung der AMPK besitzt.

Die Integrine sind Transmembranproteine, die mit den Proteinen der FAs interagieren und somit eine Reihe von mechanosensitiven Signalwegen regulieren. Es kann daher vermutet werden, dass weitere Proteine der FAs an dem Prozess der AMPK-Stabilisierung beteiligt sind. Einer der bekannten und bereits erforschten Integrin-Interaktionsproteine ist FAK. Es ist bekannt, dass FAK durch die Interaktion mit der Integrin- $\beta$ 1-UE die Migration von Fibroblasten während einer Fibrose fördert. Inhibiert man die Kinase, reduziert sich das fibrotische Gewebe, sowie die Akkumulation von Kollagen und Fibronectin. Verschiedene Integrine mit  $\alpha$ V-UE tragen dabei jedoch nur in geringem Maße bei [486]. Die Herunterregulierung der FAK auf Plastikkulturschalen in Mausfibroblasten zeigte einen signifikanten Abfall der AMPK-Proteinmenge (Abb. 21). Die Behandlung mit einem FAK-Inhibitor sowohl auf 50 kPa als auch auf 0,2 kPa Gelen bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 22), da in beiden Fällen eine Destabilisierung von AMPK zu beobachten war. Wurde der Knockdown sowohl von Itg $\alpha$ V als auch von FAK in Fibroblasten auf Hydrogelen durchgeführt, war der Effekt auf die AMPK-Proteinexpression auf weicher und auf harter Gelmatrix zu erkennen (Abb. 23). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Effekt von Itg $\alpha$ V und FAK nicht spezifisch für Zellen auf hartem Untergrund ist, sondern einen ähnlichen Einfluss in Zellen auf weichem Untergrund besitzt. Die beiden Proteine Itg $\alpha$ V und FAK sind demnach unter beiden Bedingungen für die Stabilisierung der AMPK notwendig. Dies könnte möglicherweise an einem Unterschied in der Menge an aktivem FAK und Itg $\alpha$ V liegen. Eine erhöhte Menge an ECM, wie es bei vielen Tumoren der Fall ist, führt zu einer Aktivierung der Integrine, einer Rekrutierung von FAK und dessen aktivierender Phosphorylierung [246, 326]. Die Vermutung liegt nahe, dass es auf festem Substrat, aufgrund des Einflusses mechanischer Stimuli zu einer erhöhten Aktivierung der beiden Proteine kommt und daher auch zu einer erhöhten Stabilisierung der AMPK. Auf weichem Untergrund erfolgt eine schnellere Destabilisierung der AMPK wegen einer geringeren Menge an FAK und Itg $\alpha$ V. Anhand der gewonnenen Daten kann daher postuliert werden, dass sowohl Itg $\alpha$ V als auch FAK eine essentielle Rolle in der Proteinregulation der AMPK spielen. Es ist jedoch noch ungeklärt, ob eine spezifische  $\beta$ -UE in dem Mechanismus beteiligt ist, da

das Screening keinen signifikanten Effekt durch die Herunterregulation der verwendeten  $\beta$ -UE auf die AMPK-Proteinexpression zeigte.

Die unterschiedliche Proteinmenge der AMPK ist durch einen verstärkten Stabilisierungsmechanismus über Itg $\alpha$ V und FAK auf festem Untergrund zu erklären. Es musste jedoch auch festgestellt werden, ob die geringe AMPK-Menge auf weichem Untergrund ausreicht, um die normalen Funktionen zu erfüllen. Zunächst sollte dabei die Reaktion auf Upstream-Signale getestet werden. Dazu wurde der Hh-Signalweg auf unterschiedliche Art induziert. Teperino *et al.* postulieren eine aktivierende Phosphorylierung der AMPK durch die Translokation des SMO in das Primärzilium und den anschließenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Diese Art der AMPK-Aktivierung kann durch zwei unterschiedliche SMO-bindende Substanzen erreicht werden, dem Hh-Aktivator SAG und dem Hh-Inhibitor Cyclopamine [414]. Die Zugabe von SAG und damit die Aktivierung des kanonische Hh-Signalwegs führte sowohl auf 50 kPa als auch auf 0,2 kPa Gelen zu einer signifikanten Erhöhung der p-AMPK Proteinmenge (Abb. 12). Wurde der Hh-Aktivator SAG allerdings in Fibroblasten ohne Primärzilium zugegeben, konnte keine Induktion des Signalwegs stattfinden und es kam somit zu keiner aktivierenden Phosphorylierung der AMPK bei beiden Härtegraden des Untergrunds. Das Primärzilium ist das entscheidende Organell zur Signalweiterleitung und Aktivierung des Signalwegs [21] und die Translokation des SMO in das Zilium ist entscheidend für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige AMPK-Aktivierung. Ein fehlendes Zilium ist daher gleichbedeutend sowohl mit einer Inhibierung des kanonischen Hh-Signalwegs als auch aller SMO-abhängigen Effekte, wie der AMPK-Aktivierung. Eine Behandlung mit Cyclopamine hatte einen ähnlichen Effekt wie SAG, da die Menge an p-AMPK auf 50 kPa und auf 0,2 kPa Gelen anstieg. Cyclopamine gilt als Inhibitor des Hh-Signalwegs, da es an SMO bindet und dessen Aktivität durch eine Konformationsänderung verhindert [166]. SMO ist aber dennoch in der Lage, in das Primärzilium zu relokalisieren und beispielsweise den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  zu initiieren. Cyclopamine kann daher nicht nur als Hh-Inhibitor, sondern auch als AMPK-Aktivator angesehen werden [414]. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass AMPK sowohl auf hartem als auch auf weichem Untergrund noch auf Stimuli reagiert.

Anhand dieser Daten konnte die Reaktion der AMPK auf äußere Stimuli unter beiden Härtegraden bestätigt werden, wichtig ist jedoch auch die Funktionalität des Proteins Downstream. Es gibt dabei zwei unterschiedliche Signalwege, die zur Kontrolle der AMPK-Funktion getestet wurden. Die Kinase kann nicht nur durch den Hh-Signalweg aktiviert werden, sondern diesen auch negativ regulieren. AMPK ist in der Lage, GLI1

durch Phosphorylierung zu destabilisieren [99, 252]. GLI1 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor der kanonischen Hh-Signalkaskade und kann sich in einem positiven Feedback-Loop selbst regulieren [453]. Wird GLI1 destabilisiert, wirkt sich dies auf die Expression der Zielgene und ebenso auf die GLI1-Expression aus. In SHHL2-Zellen auf Hydrogelen wurde der Hh-Signalweg mittels SAG aktiviert und anschließend entweder mit oder ohne den AMPK-Inhibitor Dorsomorphin behandelt. Es wurde deutlich, dass bei beiden Härtegraden die Inaktivierung der AMPK einen positiven Effekt auf die GLI1-Expressionsrate besaß (Abb. 12). Die Kinase war somit in der Lage, den Hh-Signalweg auf weichem und hartem Untergrund zu reprimieren. Die Proteinmenge der AMPK schien demnach keinen Einfluss auf die Funktionalität zu besitzen.

Ein weiteres Substrat der AMPK ist ACC, das bei Nährstoffarmut durch die Kinase phosphoryliert und somit inaktiviert wird [297]. Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung von p-ACC in Fibroblasten auf Hydrogelen konnte gezeigt werden, dass die weiche Umgebung nicht nur zu einer geringeren Menge an AMPK, sondern auch zu einer geringeren Menge an p-ACC führte (Abb. 13). Der Härtegrad und die damit zusammenhängende Verringerung des AMPK-Proteins hatte somit auch Einfluss auf dessen Zielproteine. Dieser Effekt schien jedoch nicht ubiquitär auf alle Substrate der AMPK zuzutreffen, da beispielsweise kein Einfluss auf eine verringerte Inhibierung der GLI1-Expression detektiert wurde. Weitere Funktionen der AMPK, wie etwa die Wirkung auf die Autophagie sollen später noch genauer diskutiert werden.

### **6.3 Das Aktinzytoskelett und mechanosensitive Signalwege haben nur bedingt Einfluss auf die AMPK-Proteinexpression**

Die Fibroblasten besaßen auf weicher und harter Gelmatrix eine unterschiedliche Morphologie, die auf das Aktinzytoskelett zurückzuführen war. Das Aktinzytoskelett selbst bildet unter harten Bedingungen vermehrt Stressfasern aus. Diese bilden ein Netzwerk aus F-Aktin-Bündeln und Myosin-II, die vor allem für Migration, Morphogenese und Adhäsion wichtig sind [306]. Der Auf- und Abbau der Stressfasern steht unter der Kontrolle von mechanischen Stimuli. Es konnte bereits gezeigt werden, dass AMPK, aktiviert über CAMKK2, die Bildung der Stressfasern kontrollieren kann. Wird CAMKK2 inhibiert findet keine aktivierende Phosphorylierung der AMPK statt und es kommt zu weniger ausgeprägten Stressfasern [419, 484]. Eine weitere Verbindung speziell zur Aktivierung von AMPK über Aktin konnte von Vu *et al.* gezeigt werden. Sie fanden heraus, dass eine Zerstörung der F-Aktin-Fasern durch Cytochalasin D speziell in

Muskelzellen die Relokalisation von LKB1 und somit die Aktivierung von AMPK inhibiert [439]. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch das Aktinzytoskelett am Stabilisierungsmechanismus der AMPK beteiligt ist. Um dies zu überprüfen, wurden Fibroblasten mit unterschiedlichen Aktinmodulatoren behandelt. Sowohl der Myosin-II-Inhibitor Blebbistatin, welcher vor allem für die Ausbildung der Stressfasern wichtig ist und Cytochalasin D hatten keinen Effekt auf die AMPK-Proteinexpression (Abb. 15). Dies wurde sowohl auf Plastik Kulturschalen als auch auf den 50 kPa und 0,2 kPa Gelen beobachtet. Es wurde in dem Experiment zwar nicht der Einfluss auf die Aktivierung der AMPK überprüft, jedoch konnte in einem früheren Experiment eine Aktivierung auf den Hydrogelen beider Härtegrade bestätigt werden (Abb. 12A/B). Lediglich die Menge an aktivem AMPK unterschied sich, was auf den Unterschied an Gesamt-AMPK zurückzuführen war. Somit wurde in dieser Arbeit keine Verbindung zwischen der AMPK-Proteinmenge zu dem Aktinzytoskelett nachgewiesen.

Das Aktinzytoskelett selbst schien demnach nicht an der Signalkaskade zur Regulierung der AMPK auf unterschiedlichen Härtegraden beteiligt zu sein, jedoch war ein Effekt von Signalwegen, die durch das Aktinzytoskelett reguliert werden, nicht auszuschließen. Eines der bekanntesten ist dabei der MKL1/SRF-Signalweg. Durch vermehrtes F-Aktin wird der transkriptionelle Koaktivator MKL1 aktiviert und relokalisiert in den Nukleus. Dort interagiert es mit dem Transkriptionsfaktor SRF und es kommt zur Expression von Zielgenen [286]. Einer dieser Zielgene ist  $\alpha$ -SMA, welches einen großen Teil zur Verhärtung der ECM beiträgt [185]. Es entsteht daher ein Feedback-Loop zwischen der Aktinpolymerisierung und dem MKL1/SRF-Signalweg, in dem unter anderem SRF-Zielgene wie  $\alpha$ -SMA oder Rnd3 beteiligt sind [335]. Da das Aktinzytoskelett in Zellen auf hartem Untergrund vermehrt polymerisiert und somit auch den MKL1/SRF-Signalweg aktiviert, ist eine Beteiligung an der Stabilisierung der AMPK möglich. Eine Herunterregulierung sowohl von MKL1 als auch von SRF in Fibroblasten zeigte jedoch keinen Effekt auf das AMPK-Protein (Abb. 17). Es wird somit deutlich, dass der Härtegrad zwar Einfluss auf das Aktinzytoskelett und auch auf Aktin-abhängige Proteine und Signalwege besitzt, es jedoch keine nachweisliche Verbindung zur Stabilisierung der AMPK gibt.

Neben dem Aktinzytoskelett und damit verbundenen Proteinen wie MKL1 sind auch die mechanosensitiven Proteine YAP und TAZ an der Regulation von AMPK beteiligt. Die beiden Proteine relokalisieren nach Aktivierung, z. B. durch erhöhte Zelldichte oder verhärtete ECM in den Nukleus, um dort als Koaktivatoren zusammen mit den TEAD-Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen zu regulieren [106]. Diese Veränderung der Lokalisation konnte auch durch die Detektion von YAP mittels

Immunfluoreszenzfärbung in Fibroblasten auf den Hydrogelen beobachtet werden (Abb. 16). Es war eine vermehrte Akkumulation von YAP im Nukleus der Zellen auf hartem Untergrund zu erkennen. YAP und TAZ sind dafür bekannt, vor allem bei Zellwachstum und Differenzierung eine Rolle zu spielen, jedoch gibt es bereits einige Hinweise auf eine Verbindung zum Zellmetabolismus [227]. Aktives YAP fördert unter anderem die Glykolyse [489], den Glutaminmetabolismus [469] und die mitochondriale Biogenese [302]. Es ist noch keine Regulation der AMPK über YAP und TAZ bekannt, die Regulation erfolgt eher in die andere Richtung: AMPK kann bei Stresssignalen YAP am Ser94 phosphorylieren und damit dessen Interaktion mit den TEAD-Transkriptionsfaktoren inhibieren [291]. AMPK selbst besitzt demnach eine inhibitorische Funktion auf die Koaktivatoren YAP und TAZ. Es konnte jedoch in einigen Publikationen gezeigt werden, dass die Translokation und die Aktivierung von YAP durch mechanische Stimuli über Integrine und FAK induziert wird [181, 234]. Daher ist es möglich, dass der entscheidende Faktor nach der Stimulierung von  $\text{Itg}\alpha\text{V}$  und der Signalweiterleitung über FAK der Koaktivator YAP ist. Durch eine Herunterregulierung von YAP und TAZ in Fibroblasten auf weichem und hartem Untergrund konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine zum Erhalt der AMPK-Proteinmenge notwendig sind. Jedoch wurde dabei auch eine verringerte Proteinmenge des Gegenspielers mTOR detektiert. Es ist bereits bekannt, dass der Hippo-YAP-Signalweg im Zusammenhang mit mTOR die Organgröße reguliert [89]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von YAP über FAK zu einer verstärkten mTOR-Aktivität führt [181]. Demnach wurde eine Interaktion von YAP und mTOR bereits in einigen Publikationen bestätigt. Der untersuchte Mechanismus der Stabilisierung von AMPK über  $\text{Itg}\alpha\text{V}$  und FAK scheint jedoch die mTOR-Proteinexpression nicht zu beeinflussen. Die Herunterregulierungen von YAP oder TAZ hat zwar einen Einfluss auf AMPK, jedoch auch auf mTOR. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Effekt auf AMPK über YAP/TAZ auf andere Art erklärt werden muss, als durch die Regulierung über  $\text{Itg}\alpha\text{V}$ -FAK.

#### **6.4 Ein fester Untergrund rekrutiert AMPK an die fokalen Adhäsionen**

Der Mechanismus der Stabilisierung der AMPK in Zellen auf hartem Substrat funktioniert über die FA, genauer den Integrinen und der FAK. Ob AMPK allerdings direkt mit FAK und/oder dem Integrinkomplex interagiert oder ob weitere Proteine, Proteinkomplexe oder Organellen zwischengeschaltet sind, ist noch ungeklärt. Die Kinase besitzt keine definierte Lokalisation innerhalb der Zelle. Sie ist in der Lage, im Nukleus oder auch an die Membranen verschiedener Organelle rekrutiert zu werden, dabei spielt unter

anderem die Myristoylierung der  $\beta$ -UE eine Rolle [311]. AMPK kann dabei unter anderem mit dem Lysosom, den Mitochondrien, dem Nukleus, dem Endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi assoziiert werden [65]. Es gibt wenige Publikationen, die AMPK mit FAs in Verbindung bringen. Durch Massenspektrometrie des Integrin-Adhäsoms aus Mausfibroblasten konnte neben einer Vielzahl von Proteinen auch AMPK schwach detektiert werden [177]. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass AMPK auch an den FAs lokalisieren kann. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Formierung von Stressfasern nach mechanischen Stimuli unter anderem von CAMKK2 an den FA reguliert wird. Diese Kinase aktiviert AMPK an den FA, welches anschließend über VASP die Polymerisierung von F-Aktin und somit die Bildung von Stressfasern inhibiert [419]. Die FA bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen, darunter auch Paxillin. Paxillin ist ein essentielles Protein der FA, welches unter anderem auch mit FAK oder Src interagieren kann. Die aktivierende Phosphorylierung dieses Proteins wird durch Wachstumsfaktoren oder Integrin-Aktivierung gefördert und führt zur Rekrutierung und Interaktion verschiedenster FA-Proteine [424]. In einem Kollokalisationsexperiment wurde sowohl endogenes p-Paxillin mit einem fluoreszierenden Antikörper sowie Paxillin-mCherry im Zusammenhang mit Prkaa1-GFP mittels Immunfluoreszenzaufnahmen untersucht (Abb. 24). Es war eine deutliche Kollokalisation des FA-Proteins Paxillin sowie Prkaa1 an den Zellmembranen zu erkennen. Behandelte man die Fibroblasten allerdings mit dem Itg $\alpha$ V-Inhibitor CWMH-12, verschwand diese Kollokalisation und das Prkaa1 war im Zytoplasma verteilt. Die Inhibition von Itg $\alpha$ V ist mit einem weichen Untergrund gleichzusetzen, daher wurde die Lokalisation von Prkaa1-GFP in Fibroblasten auf 0,2 kPa und 50 kPa Hydrogelen untersucht. Hierbei konnte ebenfalls eine punktuelle Verteilung auf hartem Untergrund, jedoch eine diffuse zytoplasmatische Verteilung auf weichem Untergrund festgestellt werden (Abb. 25). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AMPK nur in hartem Gewebe an die FAs rekrutiert wird, während auf weichem Substrat eine solche Lokalisation ausbleibt. Ob diese Relokalisierung im Zusammenhang mit der Stabilisierung steht, ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

## **6.5 Der AMPK-Stabilisierungsmechanismus findet auch in PDAC-Stromazellen statt**

Die Stabilisierung von AMPK auf hartem Untergrund über Itg $\alpha$ V und FAK wurde zunächst in Mausfibroblasten untersucht. Die Verhärtung von Geweben ist jedoch typisch für viele Tumorarten, wie auch dem Pankreaskarzinom. Die aktiven Sternzellen sind dabei

verantwortlich für die Sekretion vieler Komponenten des exzessiven Stromas im Pankreaskarzinom. Der Effekt von weichem und hartem Untergrund auf das AMPK-Protein wurde daher zusätzlich in humanen und murinen PSCs sowie in den isolierten CAF Primärzellen untersucht. Es ist bis heute noch nicht vollständig erforscht, ob AMPK eine pro- oder eine antitumorigene Wirkung besitzt. In den Tumorzellen des PDAC kann es unter anderem den Transkriptionsfaktor FOXO3A aktivieren, welcher Anoikis induziert und somit den Tumorwachstum verhindert [303]. Zudem führt eine Aktivierung von AMPK durch Metformin in PDAC zu einer geringeren Produktion von fibrogenischen Zytokinen durch die Tumorzellen sowie zur Inhibition der PSC-Aktivierung [105]. AMPK gilt zudem als negativer Regulator des Warburg-Effekts, welcher vor allem für die Proliferation der Tumorzellen entscheidend ist. Das Protein hat somit einen Einfluss auf die Tumorentwicklung durch Inhibition essentieller, metabolische Signalwege [115]. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie jedoch gezeigt, dass ein Basallevel an AMPK in einer Pankreaskarzinom-Zelllinie nötig ist, um den Nährstoffausgleich zu sichern und somit das Tumorwachstum zu fördern [213]. Eine verstärkte Aktivierung der AMPK konnte zudem im Stroma, speziell von soliden Tumoren, nachgewiesen werden, da hier durch das hypoxische Milieu dennoch der Energiehaushalt der Zelle erhalten werden muss [235]. Nach der Analyse der unterschiedlichen PSC-Zelllinien mittels Western-Blot war zu erkennen, dass ähnlich den Fibroblasten die AMPK-Proteinmenge in PDAC-Stromazellen auf hartem Untergrund erhöht war (Abb. 28). Dieser Effekt spielte sich ebenfalls nur auf Proteinebene, nicht aber auf Transkriptebeine ab. Ein großer Teil der Literatur über die Aktivität von AMPK in den PDAC-Tumorzellen beschreibt eine supprimierende Wirkung [105, 303, 461]. Die Expression und Aktivität von AMPK in den PDAC-Stromazellen ist dagegen seltener beschrieben, so dass es möglich ist, dass AMPK eine duale Rolle in den Tumorzellen und den Stromazellen besitzt.

Der Knockdown der beiden Proteine Itg $\alpha$ V und FAK auf Plastik Kulturschalen führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der AMPK-Proteinmenge, vergleichbar mit dem Effekt in MEFs (Abb. 29). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Stabilisierungsmechanismus auf hartem Untergrund über Itg $\alpha$ V und FAK nicht nur in normalen Mausfibroblasten, sondern auch in den Sternzellen des pankreatischen Tumorstromas stattfindet. In PDAC-Tumorzellen sind FAK und p-FAK verstärkt exprimiert, da sie über Kinase-abhängige und -unabhängige Signalwege das Tumorwachstums, die Zellmotilität [288], die Invasion [380], das Überlebens und den EMT-Prozess [251] regulieren und fördern [404]. Da FAK zudem für das fibrotische und immunsupprimierende Stroma des PDAC essentiell ist, steht eine erhöhte Expression von FAK in direktem Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose [404]. FAK und

p-FAK führen wegen ihrer erhöhten Expression in Krebszellen zu einer verstärkten Produktion von Kollagen im TME [207]. Es konnte daher eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von FAK und der Größe von PDAC beobachtet werden [125]. Es gibt eine Reihe von Publikationen, die den Effekt der FAK-Expression in Krebszellen auf das Tumorwachstum und das Stroma beschreiben. Der Effekt von FAK in den CAFs ist dagegen weniger untersucht. Es besitzt einen Einfluss auf die Förderung der Migration und Metastasierung des Tumors durch CAFs [454]. Jedoch gibt es auch eine aktuelle Publikation von Demircioglu *et al.*, die eine reduzierte Expression von FAK speziell im Tumorstroma mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten assoziieren [96]. Es wird dabei deutlich, dass eine erhöhte Proteinmenge der FAK in CAFs einen negativen Effekt auf die Tumorgenese besitzt, jedoch wird in der Studie nicht auf den Aktivierungszustand des Proteins eingegangen. Es ist daher möglich, dass eine geringe, dabei jedoch aktive Menge an FAK für die Stabilisierung der AMPK in den Stromazellen ausreicht. In den Krebszellen konnte zudem bereits ein Zusammenhang zwischen FAK und AMPK hergestellt werden. Die Aktivität speziell von mitochondrialer AMPK kann über FAK/Src und dem Prozess der Mechanotransduktion erhöht werden [148, 395]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für die Hypothese, dass auch in den Stromazellen eine ähnliche Verbindung zwischen FAK und AMPK besteht. Die Aktivierung von FAK durch die verstärkte ECM und die Integrine führt zu einer Stabilisierung der AMPK in PDAC-CAFs.

Die Integrine sind während der Adhäsion, des Wachstums, der Migration und der Differenzierung von Zellen hochreguliert. Dies sind Prozesse, die auch während der Tumorentwicklung wichtig sind. Im Ovarialkarzinom beispielsweise konnte bereits eine Überexpression der  $\alpha$ V-Integrine nachgewiesen werden [436, 445]. In vielen Karzinomen ist die erhöhte Expression von  $\alpha$ v $\beta$ 6-Integrinen essentiell, da sie unter anderem mit der ECM-Komponente Fibronectin interagieren und außerdem TGF $\beta$ 1 aktivieren, ein Wachstumsfaktor, der entscheidend für die Zusammensetzung und Menge an ECM ist. Diese Überexpression fördert die Tumorentwicklung und führt zu einem aggressiveren Phänotyp [162]. Ein weiteres  $\alpha$ V-Integrin, das  $\alpha$ v $\beta$ 5, ist im PDAC vor allem im Zusammenhang mit dem EGF-Rezeptor und der Src-Kinase entscheidend für die Migration und demnach die Metastasierung [353]. In dieser Arbeit konnte durch die Analyse von Färbungen des Itg $\alpha$ V in PDAC-Gewebeschnitten aus öffentlichen Datenbanken eine verstärkte Expression von Itg $\alpha$ V in ECM-reichen Stromazellen detektiert werden. Dabei wurde eine hohe Menge an Kollagen im Stroma mit einem harten Gewebe gleichgesetzt. Zudem konnte anhand einer Datenbank-Analyse eine Kaplan-Meyer-Kurve erstellt werden, welche eine Korrelation zwischen einer verstärkten

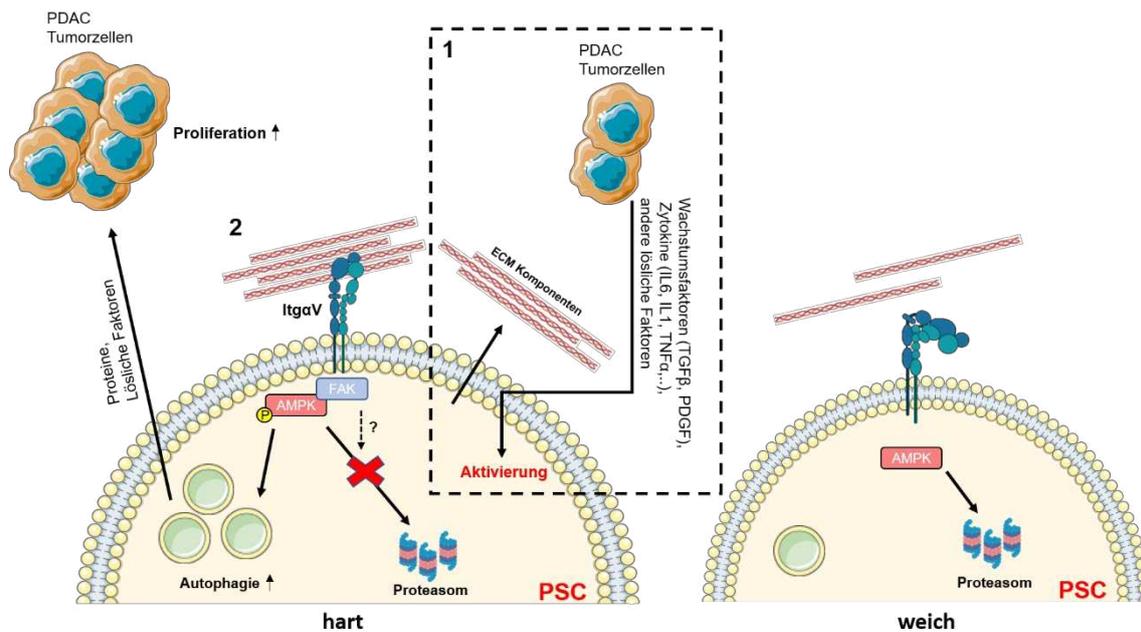
ItgaV-Expression und einer schlechteren Prognose von PDAC herstellte. Dies legt nahe, dass die  $\alpha$ V-UE in verschiedenen Tumorarten entscheidend für die verstärkte ECM-Produktion sowie die damit zusammenhängende Tumorgenese ist. Eine verstärkte Expression von ItgaV in ECM-reichen Regionen kann daher zu einer verstärkten Aktivierung von FAK und somit zu einer Stabilisierung der AMPK im PDAC-Stroma führen. Diese Hypothese konnte durch eine Färbung des AMPK-Substrates p-ACC in humanen PDAC-Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Auch hier besaßen die Stromazellen in kollagenreicheren Geweben eine verstärkte Expression von p-ACC und somit eine verstärkte Aktivierung der AMPK.

Zusammenfassend ist daher anzumerken, dass in verhärtetem PDAC-Stroma die AMPK-Proteinexpression in CAFs erhöht ist. Diese Proteinzunahme erfolgt aufgrund einer verstärkten Expression und Aktivierung des ItgaV durch vermehrte ECM im Stroma und damit zusammenhängend zu einer verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von FAK. Diese beiden Komponenten führen über eine noch nicht vollständig untersuchte Signalkaskade zu einer Stabilisierung der AMPK.

## **6.6 Die erhöhte Autophagierate im kanzerogenen Stroma beeinflusst Tumorzellproliferation und Überleben**

Der Prozess der Autophagie besitzt im PDAC eine duale Rolle. Im Gegensatz zu gesundem pankreatischem Gewebe ist die Autophagierate im PDAC deutlich erhöht [332]. Einige Forschergruppen konnten zeigen, dass die erhöhte Autophagierate die Tumorgenese fördert und in Korrelation mit einer schlechteren Patientenprognose steht [122]. Der Prozess der Autophagie erhöht dabei das Tumorzellwachstum und vermindert die Wirkung einiger Krebstherapien [156, 470]. Dazu gehören Immun-Checkpoint-Inhibitoren, da durch Autophagie MHC-Klasse-I-Moleküle abgebaut werden und somit weniger Angriffsfläche für das Immunsystem und damit verbundene Therapien bietet [465]. Im Gegensatz dazu haben Mukubou *et al.* gezeigt, dass Autophagie die Wirkung von Gemcitabin bei der PDAC-Behandlung erhöht. Durch die Inhibition der Autophagie wurde ein geringerer Krebszelltod detektiert [296]. Es gibt daher sowohl tumorfördernde als auch tumorsupprimierende Effekte der Autophagie im PDAC. Diese Befunde beziehen sich jedoch lediglich auf die Tumorzellen, nicht aber auf das Stroma. Es wurde jedoch bereits festgestellt, dass die Tumorzellen Autophagie in den Stromazellen, speziell den PSCs, fördern können. Dies führt zur Sekretion von Faktoren welche wiederum den Metabolismus der Tumorzellen unterstützen [393]. AMPK gilt als Aktivator

des Autophagie-Prozesses zur Erhaltung des Energielevels der Zelle. Die Verhärtung des Gewebes und damit die erhöhte Menge an AMPK könnte demnach einen Einfluss auf die Autophagierate der PSCs besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein geringeres Level an LC3, einem der bekanntesten Autophagiemarker, in PSCs auf weichem Untergrund detektiert (Abb. 31). Eine Immunfluoreszenzfärbung sowie eine EM-Aufnahme bestätigten eine verstärkte Autophagierate in Zellen auf hartem Untergrund (Abb. 33), da die Autophagosomen dort signifikant größer waren. Die Autophagie der PSCs führt zu einer Sekretion wichtiger Faktoren für Tumorzellen, was wiederum zu einer Förderung des Tumorwachstums führen könnte. Ein Kokultur-Experiment zeigte, dass Tumorzellen ein stärkeres Wachstum auf hartem, aber nicht auf weichem Untergrund besaßen, wenn sie zusammen mit PSCs kultiviert wurden (Abb. 35). Ein Zusammenhang des verbesserten Wachstums mit der Autophagierate der PSCs konnte zudem durch die Inhibition mit Bafilomycin A1 hergestellt werden. Nach der Behandlung mit dem Autophagie-Inhibitor war der wachstumsfördernde Effekt nahezu vollständig aufgehoben und kein Unterschied zwischen hartem und weichem Untergrund detektierbar. Die schematische Darstellung in Abbildung 40 zeigt ein Modell für den Mechanismus der Erfassung einer veränderten Gewebehärte bis zu der daraus resultierenden Förderung des Tumorwachstums. Die Tumorzellen selbst führen zu einer Aktivierung der PSC-Zellen innerhalb des PDAC-Stromas. Diese Aktivierung fördert die exzessive Expression von ECM-Komponenten, wie etwa Kollagen und Fibronectin. Eine folgende Verhärtung des Gewebes wird schließlich von Itg $\alpha$ V detektiert und führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von FAK und weiteren FA-assoziierten Proteinen. Die Kinase AMPK wird nun ebenfalls an die FAs relokalisiert und über einen noch unbekanntem Mechanismus, welcher FAK beinhaltet, stabilisiert. Die erhöhte Menge an AMPK und p-AMPK führt schließlich zu einer erhöhten Autophagierate. Dies endet schließlich in der Sekretion von Proteinen oder anderen Faktoren, die zu einer Modulation des Tumormetabolismus und somit dessen Proliferation führen. Auf weichem Gewebe dagegen wird Itg $\alpha$ V nicht aktiviert, da nur geringe Mengen an ECM vorhanden sind. Es kommt zu keiner Rekrutierung und Stabilisierung der AMPK und somit wird die Kinase proteasomal abgebaut, ohne Auswirkung auf die Autophagierate zu besitzen.



**Abbildung 40: Schematische Darstellung des erhöhten Tumorzellwachstums induziert durch verstärkte Gewebehärte.** Links: PSCs im Stroma werden durch lösliche Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, etc.) der Tumorzellen aktiviert und exprimieren verstärkt ECM-Komponenten (1). Die erhöhte Gewebehärte führt zur Aktivierung von ItgαV, der Rekrutierung von FAK und somit einer Stabilisierung der AMPK. Die Abbaurate von AMPK über das Proteasom verringert sich und die aktive Kinase erhöht die Autophagierate innerhalb der PSC-Zelle. Dies führt zu einer vermehrten Sekretion von Proteinen und löslichen Faktoren, welche die Tumorzellproliferation anregen. Rechts dargestellt sind die PSCs unter weichen Bedingungen. Die Aktivierung des ItgαV über ECM-Komponenten findet kaum statt. Es kommt zu einer geringeren Stabilisierung der AMPK und somit zu deren schnellerem proteasomalen Abbau, was eine Erhöhung der Autophagierate verhindert.

Diese Befunde wurden schließlich mit ItgαV-Knockout-PSCs bestätigt. Ein Fehlen des Integrins inhibierte die Signalkaskade zur Stabilisierung der AMPK und in Kokultur mit Tumorzellen blieb der wachstumsfördernde Effekt aus (Abb. 36). Dieses Ergebnis bestätigte eine Beteiligung des ItgαV und damit der vollständigen Stabilisierungsmaschinerie. Ein Xenograft-Modell zum Vergleich des Tumorwachstums mit Wildtyp-PSCs und den Knockout-PSCs in Mäusen verifiziert noch einmal, dass die Hypothese des verstärkten Tumorwachstums in Ko-Kultur mit Stromazellen auch *in vivo* vorhanden ist (Abb. 37). In den Mäusen konnte ebenfalls ein deutlich schnelleres Tumorwachstum mit Wildtyp-PSCs detektiert werden, während es mit den Knockout-PSCs ausblieb.

Die Gruppe um Sousa *et al.* konnte bereits zeigen, dass PSCs über die Autophagie-Maschinerie Aminosäuren wie etwa Alanin sekretieren. Dies hat einen Einfluss auf den Metabolismus der Tumorzellen [325, 393]. Es wäre möglich, dass die erhöhte Autophagierate über ItgαV-FAK-AMPK in festem Gewebe auch zu einer vermehrten

Ausschüttung von Alanin und daher zu einem verbesserten Tumorwachstum führt. Eine Analyse der Alaninkonzentration in den PSC-Überständen zeigte eine geringfügig erhöhte Alanin-Ausschüttung von Zellen auf harter Unterlage (Abb. 38). Ein Rescue-Assay durch Zugabe von L-Alanin auf weichem Untergrund bestätigte jedoch, dass die Alaninkonzentration keinen Einfluss auf das unterschiedliche Wachstum der Tumorzellen in Kokultur mit PSCs auf den Hydrogelen besaßen. Es schien vielmehr so, dass es sich bei den wachstumsfördernden Substanzen um Proteine handelte, da der fördernde Effekt nach Aufkochen der Überstände und der damit verbundenen Degradation der Proteine vollständig verschwunden war. Worum es sich bei den wachstumsfördernden Proteinen oder Substanzen handelt, die durch Autophagie von den PSCs sekretiert werden, ist daher noch unklar. Alanin scheint jedoch eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die erhöhte Autophagierate in PSCs auf hartem Gewebe zu einem verbesserten Überleben der Zellen führt. Mit Bafilomycin A1 behandelte PSCs auf Hydrogelen starben unter weichen Bedingungen deutlich schneller als unter harten Bedingungen (Abb. 39). Die Signalkaskade über  $\text{Itg}\alpha\text{V}$ -FAK-AMPK die zur erhöhten Autophagie führt, scheint demnach nicht nur den Tumorzellen, sondern auch den Fibroblasten selbst zu einem verbesserten Überleben zu verhelfen. Dieses Experiment gibt erste Hinweise darauf, dass die  $\text{Itg}\alpha\text{V}$ -FAK-AMPK-Kaskade möglicherweise nicht zu einer erhöhten Proliferation, sondern lediglich zu einem verbesserten Überleben führt. Es müssen jedoch noch weitere Experimente zur Validierung dieser Hypothese durchgeführt werden.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Verhärtung des Gewebes während der PDAC-Progression das Wachstum der Tumorzellen fördert. Dies wird durch eine verstärkte Autophagierate der Stromazellen induziert, die daraufhin vermehrt Proteine und lösliche Faktoren sekretieren. Der Prozess der Autophagie kann durch AMPK reguliert werden, welche wiederum wird über die mechanosensitiven Proteine  $\text{Itg}\alpha\text{V}$  und FAK stabilisiert wird. Während dieser Arbeit konnte somit ein wichtiger Aspekt der Tumor-Stroma-Interaktion im PDAC aufgedeckt werden.

## 6.7 Ausblick und mögliche Therapieansätze

Die möglichen Therapieansätze für PDAC sind vielfältig und variieren wegen der starken Heterogenität und dem Stadium des Tumors. Das Tumorstroma ist dabei eine effektive Barriere gegen Therapeutika, wie etwa Paclitaxel [352]. Es gibt bereits eine Vielzahl von

Behandlungen, die sich speziell gegen das Tumorstroma richten. Ein Beispiel ist PEGPH20, welches sich gegen die Hyaluronsäure der ECM richtet und in Kombination mit FOLFIRINOX in klinischen Studien angewendet wurde, sich jedoch als toxisch erwies [346]. Des Weiteren gibt es ein Therapeutikum, TH-302, welches durch Hypoxie aktiviert wird und sich bereits in Phase II befindet, sowie ein Analog von Vitamin D, welches ebenfalls in klinischen Studien getestet wird und zur Remodellierung des Stromas führt [279]. Der in dieser Arbeit beschriebene Mechanismus, mit dem Tumorwachstum oder das Überleben der Tumorzellen über AMPK durch eine verhärtete ECM gefördert wird, könnte dabei ein wichtiger Ansatzpunkt sein. Die Kinase FAK ist entscheidend für den Schutz vor dem Immunsystem in vielen Tumorarten, da es unter anderem auch an der Bildung der exzessiven Fibrose beteiligt ist [207]. Es gibt bereits FAK-Inhibitoren, wie etwa PF-562,271, die in Mäusen eine Reduktion der PDAC-Tumorgroße und Invasion zur Folge hatten [399]. Zudem gibt es FAK-Inhibitoren, wie VS-4718, die bereits in klinischen Studien getestet wurden [279]. Auch die Inhibition der Autophagie als Resultat des AMPK-Stabilisierungsmechanismus wurde bereits getestet. Autophagieinhibitoren, wie Hydroxychloroquin, zeigen nur eine wenig effektive Behandlungsmöglichkeit von PDAC, da das Tumorwachstum selbst kaum inhibiert wird. Dies kann unter anderem an der dualen Rolle der Autophagie in Tumoren liegen. Die Kombination mit weiteren Inhibitoren, wie etwa des RAF-MEK-ERK-Signalwegs steigert die Wirkung von Hydroxychloroquin deutlich [46]. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wäre ein möglicher Therapieansatz eine Kombination aus Autophagieinhibitor sowie FAK-, Itg $\alpha$ V- oder AMPK-Inhibitor. Da es sich bei AMPK und FAK jedoch um essentielle Proteine handelt, die auch in gesundem Gewebe von entscheidender Bedeutung sind, wäre höchstwahrscheinlich mit starken Nebenwirkungen zu rechnen. Itg $\alpha$ V dagegen wird deutlich verstärkt in Tumoren und fibrotischem Gewebe exprimiert und ist somit das bessere therapeutische Ziel. Es gibt bereits eine Reihe von Integrin-Inhibitoren, welche sich in klinischen Studien befinden, wobei vor allem  $\alpha$ V $\beta$ 1/ $\alpha$ V $\beta$ 6-Inhibitoren von Interesse sind. Es konnte sowohl gezeigt werden, dass sie Fibrosen in Leber und Lunge abschwächen, als auch damit zusammenhängend Einfluss auf den TGF $\beta$ -Signalweg besitzen. Die  $\alpha$ V $\beta$ 1/ $\alpha$ V $\beta$ 6-Inhibitoren IDL-2965 und PLN-74809 befinden sich dabei schon in Phase II der klinischen Studien [90].

Es ist dennoch anzumerken, dass der Mechanismus zur Stabilisierung der AMPK in Zellen auf hartem Gewebe noch nicht vollständig aufgedeckt wurde. Es ist im Moment nicht möglich zu sagen, welche weiteren Proteine oder auch Organelle an der Signalkaskade beteiligt sind. Wie bereits erwähnt, könnte eine Ubiquitinligase von Bedeutung sein oder weitere Teile der FA. Es wurde zwar gezeigt, dass die erhöhte

AMPK-Menge auf hartem Untergrund die Autophagierate sowie die Phosphorylierung des ACC beeinflusst, da AMPK jedoch ein Protein mit vielen Funktionen ist, könnte es noch weitere Effekte in der Zelle geben, die schließlich auch Einfluss auf die Tumorzellen haben könnten. Zudem muss der Einfluss der PSCs und deren erhöhte Autophagierate auf die Tumorzellen noch in größerem Detail überprüft werden. Es ist noch unklar ob die erhöhte Autophagie zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen, zu einem besseren Überleben der PSCs oder beidem führt. Zudem muss analysiert werden, welche Proteine, Signalmoleküle oder Faktoren über die Itg $\alpha$ V-FAK-AMPK-Autophagie-Kaskade von den PSCs für das erhöhte Tumorwachstum sekretiert werden und wie man dieses Wissen für therapeutische Zwecke nutzen kann. Abschließend kann jedoch hervorgehoben werden, dass der in dieser Arbeit erforschte Mechanismus ein besseres Verständnis für die Tumor-Stroma-Interaktion liefert und womöglich nach weiterführenden Untersuchungen als Therapieansatz gegen PDAC verwendet werden kann.

## 7. Referenzen

- [1] **1995.** 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C  $\alpha$  and native bovine protein phosphatase-2A c. *FEBS Letters* 377, 3, 421–425.
- [2] **Abetamann, V., Kern, H. F., and Elsässer, H. P. 1996.** Differential expression of the hyaluronan receptors CD44 and RHAMM in human pancreatic cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2, 9, 1607–1618.
- [3] **Adachi, C., Kakinuma, N., Jo, S. H., Ishii, T., Arai, Y., Arai, S., Kitaguchi, T., Takeda, S., and Inoue, T. 2019.** Sonic hedgehog enhances calcium oscillations in hippocampal astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 294, 44, 16034–16048.
- [4] **Ahmadian, M., Abbott, M. J., Tang, T., Hudak, C. S. S., Kim, Y., Bruss, M., Hellerstein, M. K., Lee, H.-Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Wang, Y., Duncan, R. E., Kang, C., and Sul, H. S. 2011.** Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell metabolism* 13, 6, 739–748.
- [5] **Ahrens, D. von, Bhagat, T. D., Nagrath, D., MAITRA, A., and Verma, A. 2017.** The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Journal of hematology & oncology* 10, 1, 76.
- [6] **Alam, S. G., Zhang, Q., Prasad, N., Li, Y., Chamala, S., Kuchibhotla, R., Kc, B., Aggarwal, V., Shrestha, S., Jones, A. L., Levy, S. E., Roux, K. J., Nickerson, J. A., and Lele, T. P. 2016.** The mammalian LINC complex regulates genome transcriptional responses to substrate rigidity. *Scientific reports* 6, 38063.
- [7] **Allen, B. L., Tenzen, T., and McMahon, A. P. 2007.** The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes & development* 21, 10, 1244–1257.
- [8] **Alvarez, M. A., Freitas, J. P., Mazher Hussain, S., and Glazer, E. S. 2019.** TGF- $\beta$  Inhibitors in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of gastrointestinal cancer* 50, 2, 207–213.
- [9] **Andea, A., Sarkar, F., and Adsay, V. N. 2003.** Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16, 10, 996–1006.
- [10] **Ando, J., Ohtsuka, A., Korenaga, R., Kawamura, T., and Kamiya, A. 1993.** Wall shear stress rather than shear rate regulates cytoplasmic Ca<sup>++</sup> responses to flow in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 190, 3, 716–723.
- [11] **Andreatta, C., Nahreini, P., Hovland, A. R., Kumar, B., Edwards-Prasad, J., and Prasad, K. N. 2001.** Use of short-lived green fluorescent protein for the detection of proteasome inhibition. *BioTechniques* 30, 3, 656–660.
- [12] **Antoniades, I., Stylianou, P., and Skourides, P. A. 2014.** Making the connection: ciliary adhesion complexes anchor basal bodies to the actin cytoskeleton. *Developmental cell* 28, 1, 70–80.

- [13] Apte, M. V., Park, S., Phillips, P. A., Santucci, N., Goldstein, D., Kumar, R. K., Ramm, G. A., Buchler, M., Friess, H., McCarroll, J. A., Keogh, G., Merrett, N., Pirola, R., and Wilson, J. S. 2004. Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells. *Pancreas* 29, 3, 179–187.
- [14] Armstrong, T., Packham, G., Murphy, L. B., Bateman, A. C., Conti, J. A., Fine, D. R., Johnson, C. D., Benyon, R. C., and Iredale, J. P. 2004. Type I collagen promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10, 21, 7427–7437.
- [15] Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N. T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 182, 4, 685–701.
- [16] Bachir, A. I., Zareno, J., Moissoglu, K., Plow, E. F., Gratton, E., and Horwitz, A. R. 2014. Integrin-associated complexes form hierarchically with variable stoichiometry in nascent adhesions. *Current biology : CB*, 1845–1853.
- [17] Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D., and Joyner, A. L. 2002. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development (Cambridge, England)* 129, 20, 4753–4761.
- [18] Bailey, J. M., Mohr, A. M., and Hollingsworth, M. A. 2009. Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* 28, 40, 3513–3525.
- [19] Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A.-M., Gingras, M.-C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J. C., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., Chin, V., Anderson, M. J., Kazakoff, S., Leonard, C., Newell, F., Waddell, N., Wood, S., Xu, Q., Wilson, P. J., Cloonan, N., Kassahn, K. S., Taylor, D., Quek, K., Robertson, A., Pantano, L., Mincarelli, L., Sanchez, L. N., Evers, L., Wu, J., Pinese, M., Cowley, M. J., Jones, M. D., Colvin, E. K., Nagrial, A. M., Humphrey, E. S., Chantrill, L. A., Mawson, A., Humphris, J., Chou, A., Pajic, M., Scarlett, C. J., Pinho, A. V., Giry-Laterriere, M., Rومان, I., Samra, J. S., Kench, J. G., Lovell, J. A., Merrett, N. D., Toon, C. W., Epari, K., Nguyen, N. Q., Barbour, A., Zeps, N., Moran-Jones, K., Jamieson, N. B., Graham, J. S., Duthie, F., Oien, K., Hair, J., Grützmann, R., MAITRA, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Wolfgang, C. L., Morgan, R. A., Lawlor, R. T., Corbo, V., Bassi, C., Rusev, B., Capelli, P., Salvia, R., Tortora, G., Mukhopadhyay, D., Petersen, G. M., Munzy, D. M., Fisher, W. E., Karim, S. A., Eshleman, J. R., Hruban, R. H., Pilarsky, C., Morton, J. P., Sansom, O. J., Scarpa, A., Musgrove, E. A., Bailey, U.-M. H., Hofmann, O., Sutherland, R. L., Wheeler, D. A., Gill, A. J., Gibbs, R. A., Pearson, J. V., Waddell, N., Biankin, A. V., and Grimmond, S. M. 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* 531, 7592, 47–52.
- [20] Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R., and Koike, T. 2005. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 16, 5784–5792.
- [21] Bangs, F. and Anderson, K. V. 2017. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9, 5.

- [22] Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D. J. 2001. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *The EMBO journal* 20, 9, 2214–2223.
- [23] Bar-Peled, L., Schweitzer, L. D., Zoncu, R., and Sabatini, D. M. 2012. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150, 6, 1196–1208.
- [24] Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J. A., Shimizu, M., Takaori, K., Terris, B., Yachida, S., Esposito, I., and Furukawa, T. 2015. A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *The American journal of surgical pathology* 39, 12, 1730–1741.
- [25] Bausch, D., Fritz, S., Bolm, L., Wellner, U. F., Fernandez-Del-Castillo, C., Warshaw, A. L., Thayer, S. P., and Liss, A. S. 2020. Hedgehog signaling promotes angiogenesis directly and indirectly in pancreatic cancer. *Angiogenesis* 23, 3, 479–492.
- [26] Bays, J. L., Campbell, H. K., Heidema, C., Sebbagh, M., and DeMali, K. A. 2017. Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. *Nature cell biology* 19, 6, 724–731.
- [27] Belgacem, Y. H. and Borodinsky, L. N. 2011. Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 11, 4482–4487.
- [28] Ben-Ari, M. and Mondada, F. 2018. *Elements of Robotics. Diseases of the Pancreas*. Springer, Cham (CH).
- [29] Ben-Sahra, I. and Manning, B. D. 2017. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Current opinion in cell biology* 45, 72–82.
- [30] Berchtold, S., Grünwald, B., Krüger, A., Reithmeier, A., Hähl, T., Cheng, T., Feuchtinger, A., Born, D., Erkan, M., Kleeff, J., and Esposito, I. 2015. Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer letters* 356, 2 Pt B, 721–732.
- [31] Bergeron, R., Ren, J. M., Cadman, K. S., Moore, I. K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L. H., Semenkovich, C. F., and Shulman, G. I. 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 281, 6, E1340-6.
- [32] Bernabé-Rubio, M. and Alonso, M. A. 2017. Routes and machinery of primary cilium biogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74, 22, 4077–4095.
- [33] Bershteyn, M., Atwood, S. X., Woo, W.-M., Li, M., and Oro, A. E. 2010. MIM and cortactin antagonism regulates ciliogenesis and hedgehog signaling. *Developmental cell* 19, 2, 270–283.
- [34] Bertero, T., Oldham, W. M., Grasset, E. M., Bourget, I., Boulter, E., Pisano, S., Hofman, P., Bellvert, F., Meneguzzi, G., Bulavin, D. V., Estrach, S., Feral, C. C., Chan, S. Y., Bozec, A., and Gaggioli, C. 2019. Tumor-Stroma Mechanics Coordinate Amino Acid Availability to Sustain Tumor Growth and Malignancy. *Cell metabolism* 29, 1, 124-140.e10.

- [35] **Bhaw-Luximon, A. and Jhurry, D. 2015.** New avenues for improving pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: Selective stroma depletion combined with nano drug delivery. *Cancer letters* 369, 2, 266–273.
- [36] **Biffi, G., Oni, T. E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J., and Tuveson, D. A. 2019.** IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF $\beta$  to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer discovery* 9, 2, 282–301.
- [37] **Bijlsma, M. F., Borensztajn, K. S., Roelink, H., Peppelenbosch, M. P., and Spek, C. A. 2007.** Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cellular signalling* 19, 12, 2596–2604.
- [38] **Bitgood, M. J. and McMahon, A. P. 1995.** Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Developmental biology* 172, 1, 126–138.
- [39] **Bitgood, M. J., Shen, L., and McMahon, A. P. 1996.** Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current biology : CB* 6, 3, 298–304.
- [40] **Blomen, V. A., Májek, P., Jae, L. T., Bigenzahn, J. W., Nieuwenhuis, J., Staring, J., Sacco, R., van Diemen, F. R., Olk, N., Stukalov, A., Marceau, C., Janssen, H., Carette, J. E., Bennett, K. L., Colinge, J., Superti-Furga, G., and Brummelkamp, T. R. 2015.** Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. *Science (New York, N.Y.)* 350, 6264, 1092–1096.
- [41] **Brami-Cherrier, K., Gervasi, N., Arsenieva, D., Walkiewicz, K., Boutterin, M.-C., Ortega, A., Leonard, P. G., Seantier, B., Gasmi, L., Bouceba, T., Kadaré, G., Girault, J.-A., and Arold, S. T. 2014.** FAK dimerization controls its kinase-dependent functions at focal adhesions. *The EMBO journal* 33, 4, 356–370.
- [42] **Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. 2018.** **Global cancer statistics 2018:** GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68, 6, 394–424.
- [43] **Brennan, D., Chen, X., Cheng, L., Mahoney, M., and Riobo, N. A. 2012.** Noncanonical Hedgehog signaling. *Vitamins and hormones* 88, 55–72.
- [44] **Breslow, D. K. and Holland, A. J. 2019.** Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis. *Annual review of biochemistry* 88, 691–724.
- [45] **Brooks, P. C., Clark, R. A., and Cheresh, D. A. 1994.** Requirement of vascular integrin  $\alpha$  v  $\beta$  3 for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 264, 5158, 569–571.
- [46] **Bryant, K. L., Stalneck, C. A., Zeitouni, D., Klomp, J. E., Peng, S., Tikunov, A. P., Gunda, V., Pierobon, M., Waters, A. M., George, S. D., Tomar, G., Papke, B., Hobbs, G. A., Yan, L., Hayes, T. K., Diehl, J. N., Goode, G. D., Chaika, N. V., Wang, Y., Zhang, G.-F., Witkiewicz, A. K., Knudsen, E. S., Petricoin, E. F., Singh, P. K., Macdonald, J. M., Tran, N. L., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Kimmelman, A. C., Cox, A. D., and Der, C. J. 2019.** Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nature medicine* 25, 4, 628–640.

- [47] Budinger, G. R. S., Urich, D., DeBiase, P. J., Chiarella, S. E., Burgess, Z. O., Baker, C. M., Soberanes, S., Mutlu, G. M., and Jones, J. C. R. 2008. Stretch-induced activation of AMP kinase in the lung requires dystroglycan. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 39, 6, 666–672.
- [48] Bultot, L., Guigas, B., Wilamowitz-Moellendorff, A. von, Maisin, L., Vertommen, D., Hussain, N., Beullens, M., Guinovart, J. J., Foretz, M., Viollet, B., Sakamoto, K., Hue, L., and Rider, M. H. 2012. AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *The Biochemical journal* 443, 1, 193–203.
- [49] Burridge, K. and Guilluy, C. 2016. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Experimental cell research* 343, 1, 14–20.
- [50] Busnardo, A. C., DiDio, L. J., Tidrick, R. T., and Thomford, N. R. 1983. History of the pancreas. *The American Journal of Surgery* 146, 5, 539–550.
- [51] Butera, G., Pacchiana, R., Mullappilly, N., Margiotta, M., Bruno, S., Conti, P., Riganti, C., and Donadelli, M. 2018. Mutant p53 prevents GAPDH nuclear translocation in pancreatic cancer cells favoring glycolysis and 2-deoxyglucose sensitivity. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1865, 12, 1914–1923.
- [52] Buttgereit, F. and Brand, M. D. 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *The Biochemical journal* 312 (Pt 1), 163–167.
- [53] Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and Cellular Biology* 15, 2, 954–963.
- [54] Callahan, C. A., Ofstad, T., Horng, L., Wang, J. K., Zhen, H. H., Coulombe, P. A., and Oro, A. E. 2004. MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes & development* 18, 22, 2724–2729.
- [55] Campbell, I. D. and Humphries, M. J. 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, 3.
- [56] Caradu, C., Couffinhal, T., Chapouly, C., Guimbal, S., Hollier, P.-L., Ducasse, E., Bura-Rivière, A., Dubois, M., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. 2018. Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults. *Circulation research* 123, 9, 1053–1065.
- [57] Carling, D., Zammit, V. A., and Hardie, D. 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters* 223, 2, 217–222.
- [58] Carlson, C. A. and Kim, K.-H. 1973. Regulation of Hepatic Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Phosphorylation and Dephosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 248, 1, 378–380.
- [59] Carr, R. M., Duma, N., McCleary-Wheeler, A. L., Almada, L. L., Marks, D. L., Graham, R. P., Smyrk, T. C., Lowe, V., Borad, M. J., Kim, G., Johnson, G. B., Allred, J. B., Yin, J., Lim, V.-S., Bekaii-Saab, T., Ma, W. W., Erlichman, C., Adjei, A. A., and Fernandez-Zapico, M. E. 2020. Targeting of the Hedgehog/GLI and mTOR pathways in advanced pancreatic cancer, a phase 1 trial of Vismodegib and Sirolimus combination. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 20, 6, 1115–1122.

- [60] Caspary, T., Larkins, C. E., and Anderson, K. V. 2007. The graded response to Sonic Hedgehog depends on cilia architecture. *Developmental cell* 12, 5, 767–778.
- [61] Chachisvilis, M., Zhang, Y.-L., and Frangos, J. A. 2006. G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 42, 15463–15468.
- [62] Chan, E. Y. W., Kir, S., and Tooze, S. A. 2007. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *The Journal of biological chemistry* 282, 35, 25464–25474.
- [63] Chan, I. S., Guy, C. D., Chen, Y., Lu, J., Swiderska-Syn, M., Michelotti, G. A., Karaca, G., Xie, G., Krüger, L., Syn, W.-K., Anderson, B. R., Pereira, T. A., Choi, S. S., Baldwin, A. S., and Diehl, A. M. 2012. Paracrine Hedgehog signaling drives metabolic changes in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 72, 24, 6344–6350.
- [64] Chapouly, C., Hollier, P.-L., Guimbal, S., Cornuault, L., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. 2020. Desert Hedgehog-Driven Endothelium Integrity Is Enhanced by Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) but Negatively Regulated by Cdon (Cell Adhesion Molecule-Related/Downregulated by Oncogenes). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 40, 12, e336-e349.
- [65] Chauhan, A. S., Zhuang, L., and Gan, B. 2020. Spatial control of AMPK signaling at subcellular compartments. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 55, 1, 17–32.
- [66] Chavez, J. A., Roach, W. G., Keller, S. R., Lane, W. S., and Lienhard, G. E. 2008. Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 283, 14, 9187–9195.
- [67] Chen, G., Ding, X.-F., Bouamar, H., Pressley, K., and Sun, L.-Z. 2019. Everolimus induces G1 cell cycle arrest through autophagy-mediated protein degradation of cyclin D1 in breast cancer cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 317, 2, C244-C252.
- [68] Chen, H. Y., Kelley, R. A., Li, T., and Swaroop, A. 2020. Primary cilia biogenesis and associated retinal ciliopathies. *Seminars in cell & developmental biology*.
- [69] Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., and Beachy, P. A. 2002. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 22, 14071–14076.
- [70] Chen, M.-H., Li, Y.-J., Kawakami, T., Xu, S.-M., and Chuang, P.-T. 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes & development* 18, 6, 641–659.
- [71] Chen, X., Tukachinsky, H., Huang, C.-H., Jao, C., Chu, Y.-R., Tang, H.-Y., Mueller, B., Schulman, S., Rapoport, T. A., and Salic, A. 2011. Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 192, 5, 825–838.
- [72] Chen, Y., Choi, S. S., Michelotti, G. A., Chan, I. S., Swiderska-Syn, M., Karaca, G. F., Xie, G., Moylan, C. A., Garibaldi, F., Premont, R., Suliman, H. B., Piantadosi, C. A., and Diehl, A. M. 2012. Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism. *Gastroenterology* 143, 5, 1319-1329.e11.

- [73] **Cheng, S. Y. and Bishop, J. M. 2002.** Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8, 5442–5447.
- [74] **Chhoda, A., Lu, L., Clerkin, B. M., Risch, H., and Farrell, J. J. 2019.** Current Approaches to Pancreatic Cancer Screening. *The American Journal of Pathology* 189, 1, 22–35.
- [75] **Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., and Dice, J. F. 1989.** A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science (New York, N.Y.)* 246, 4928, 382–385.
- [76] **Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M. G., and Riobo, N. A. 2010.** Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9, 3, 570–579.
- [77] **Choi, A. M. K., Ryter, S. W., and Levine, B. 2013.** Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine* 368, 7, 651–662.
- [78] **Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., and Horwitz, A. R. 2008.** Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology* 10, 9, 1039–1050.
- [79] **Chuvin, N., Vincent, D. F., Pommier, R. M., Alcaraz, L. B., Gout, J., Caligaris, C., Yacoub, K., Cardot, V., Roger, E., Kaniewski, B., Martel, S., Cintas, C., Goddard-Léon, S., Colombe, A., Valantin, J., Gadot, N., Servoz, E., Morton, J., Goddard, I., Couvelard, A., Rebours, V., Guillermet, J., Sansom, O. J., Treilleux, I., Valcourt, U., Sentis, S., Dubus, P., and Bartholin, L. 2017.** Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates KRASG12D-driven Pancreatic Tumorigenesis. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 4, 2, 263–282.
- [80] **Ciechanover, A. 2005.** Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system, and onto human diseases and drug targeting (Nobel lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 44, 37, 5944–5967.
- [81] **Clement, C. A., Ajbro, K. D., Koefoed, K., Vestergaard, M. L., Veland, I. R., Henriques de Jesus, M. P. R., Pedersen, L. B., Benmerah, A., Andersen, C. Y., Larsen, L. A., and Christensen, S. T. 2013.** TGF- $\beta$  signaling is associated with endocytosis at the pocket region of the primary cilium. *Cell Reports* 3, 6, 1806–1814.
- [82] **Collisson, E. A., Bailey, P., Chang, D. K., and Biankin, A. V. 2019.** Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 16, 4, 207–220.
- [83] **Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., Feiler, H. S., Ko, A. H., Olshen, A. B., Danenberg, K. L., Tempero, M. A., Spellman, P. T., Hanahan, D., and Gray, J. W. 2011.** Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature medicine* 17, 4, 500–503.
- [84] **Coon, B. G., Baeyens, N., Han, J., Budatha, M., Ross, T. D., Fang, J. S., Yun, S., Thomas, J.-L., and Schwartz, M. A. 2015.** Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex. *The Journal of cell biology* 208, 7, 975–986.

- [85] Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. R., and Reiter, J. F. 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 7061, 1018–1021.
- [86] Couvelard, A., O'Toole, D., Leek, R., Turley, H., Sauvanet, A., Degott, C., Ruzniewski, P., Belghiti, J., Harris, A. L., Gatter, K., and Pezzella, F. 2005. Expression of hypoxia-inducible factors is correlated with the presence of a fibrotic focus and angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Histopathology* 46, 6, 668–676.
- [87] Cox, T. R. and Erler, J. T. 2011. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Disease models & mechanisms* 4, 2, 165–178.
- [88] Cros, J., Raffenne, J., Couvelard, A., and Poté, N. 2018. Tumor Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 85, 1-2, 64–71.
- [89] Csibi, A. and Blenis, J. 2012. Hippo-YAP and mTOR pathways collaborate to regulate organ size. *Nature cell biology* 14, 12, 1244–1245.
- [90] Cully, M. 2020. Integrin-targeted therapies branch out. *Nature reviews. Drug discovery* 19, 11, 739–741.
- [91] CURTIS, A. S. 1964. THE MECHANISM OF ADHESION OF CELLS TO GLASS. A STUDY BY INTERFERENCE REFLECTION MICROSCOPY. *The Journal of cell biology* 20, 2, 199–215.
- [92] Cybulski, N. and Hall, M. N. 2009. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends in biochemical sciences* 34, 12, 620–627.
- [93] Davoodi, S. H., Malek-Shahabi, T., Malekshahi-Moghadam, A., Shahbazi, R., and Esmaeili, S. 2013. Obesity as an important risk factor for certain types of cancer. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 6, 4, 186–194.
- [94] DeBerardinis, R. J. and Thompson, C. B. 2012. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? *Cell* 148, 6, 1132–1144.
- [95] Demetriades, C., Doumpas, N., and Teleman, A. A. 2014. Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell* 156, 4, 786–799.
- [96] Demircioglu, F., Wang, J., Candido, J., Costa, A. S. H., Casado, P., Luxan Delgado, B. de, Reynolds, L. E., Gomez-Escudero, J., Newport, E., Rajeeve, V., Baker, A.-M., Roy-Luzarraga, M., Graham, T. A., Foster, J., Wang, Y., Campbell, J. J., Singh, R., Zhang, P., Schall, T. J., Balkwill, F. R., Sosabowski, J., Cutillas, P. R., Frezza, C., Sancho, P., and Hodivala-Dilke, K. 2020. Cancer associated fibroblast FAK regulates malignant cell metabolism. *Nature communications* 11, 1, 1290.
- [97] Deshpande, I., Liang, J., Hedeem, D., Roberts, K. J., Zhang, Y., Ha, B., Latorraca, N. R., Faust, B., Dror, R. O., Beachy, P. A., Myers, B. R., and Manglik, A. 2019. Smoothed stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity. *Nature* 571, 7764, 284–288.
- [98] Di Maggio, F., Arumugam, P., Delvecchio, F. R., Batista, S., Lechertier, T., Hodivala-Dilke, K., and Kocher, H. M. 2016. Pancreatic stellate cells regulate blood vessel density in the stroma of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 16, 6, 995–1004.

- [99] Di Magno, L., Basile, A., Coni, S., Manni, S., Sdruscia, G., D'Amico, D., Antonucci, L., Infante, P., Smaele, E. de, Cucchi, D., Ferretti, E., Di Marcotullio, L., Screpanti, I., and Canettieri, G. 2016. The energy sensor AMPK regulates Hedgehog signaling in human cells through a unique Gli1 metabolic checkpoint. *Oncotarget* 7, 8, 9538–9549.
- [100] Discher, D. E., Janmey, P., and Wang, Y.-L. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)* 310, 5751, 1139–1143.
- [101] Dongre, A. and Weinberg, R. A. 2019. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 20, 2, 69–84.
- [102] Dorn, K. V., Hughes, C. E., and Rohatgi, R. 2012. A Smoothed-Evc2 complex transduces the Hedgehog signal at primary cilia. *Developmental cell* 23, 4, 823–835.
- [103] Douguet, D. and Honoré, E. 2019. Mammalian Mechanoelectrical Transduction: Structure and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell* 179, 2, 340–354.
- [104] Drummond, M. L., Li, M., Tarapore, E., Nguyen, T. T. L., Barouni, B. J., Cruz, S., Tan, K. C., Oro, A. E., and Atwood, S. X. 2018. Actin polymerization controls cilia-mediated signaling. *The Journal of cell biology* 217, 9, 3255–3266.
- [105] Duan, W., Chen, K., Jiang, Z., Chen, X., Sun, L., Li, J., Lei, J., Xu, Q., Ma, J., Li, X., Han, L., Wang, Z., Wu, Z., Wang, F., Wu, E., Ma, Q., and Ma, Z. 2017. Desmoplasia suppression by metformin-mediated AMPK activation inhibits pancreatic cancer progression. *Cancer letters* 385, 225–233.
- [106] Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., and Piccolo, S. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 7350, 179–183.
- [107] Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., and Manning, B. D. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular cell* 39, 2, 171–183.
- [108] Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 7, 1417–1430.
- [109] Elbediwy, A. and Thompson, B. J. 2018. Evolution of mechanotransduction via YAP/TAZ in animal epithelia. *Current opinion in cell biology* 51, 117–123.
- [110] Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalska, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepac, X., and Roca-Cusachs, P. 2016. Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature cell biology* 18, 5, 540–548.
- [111] Elyada, E., Bolisetty, M., Laise, P., Flynn, W. F., Courtois, E. T., Burkhart, R. A., Teinor, J. A., Belleau, P., Biffi, G., Lucito, M. S., Sivajothi, S., Armstrong, T. D., Engle, D. D., Yu, K. H., Hao, Y., Wolfgang, C. L., Park, Y., Preall, J., Jaffee, E. M., Califano, A., Robson, P., and Tuveson, D. A. 2019. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. *Cancer discovery* 9, 8, 1102–1123.

- [112] Emsley, J., King, S. L., Bergelson, J. M., and Liddington, R. C. 1997. Crystal structure of the I domain from integrin alpha2beta1. *Journal of Biological Chemistry* 272, 45, 28512–28517.
- [113] Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., and Discher, D. E. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 4, 677–689.
- [114] Ezzati, M., Henley, S. J., Lopez, A. D., and Thun, M. J. 2005. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *International journal of cancer* 116, 6, 963–971.
- [115] Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B. J., Viollet, B., Mamer, O. A., Avizonis, D., DeBerardinis, R. J., Siegel, P. M., and Jones, R. G. 2013. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell metabolism* 17, 1, 113–124.
- [116] FENDRICH, V., ESNI, F., GARAY, M. V. R., FELDMANN, G., HABBE, N., Jensen, J. N., DOR, Y., STOFFERS, D., Jensen, J., LEACH, S. D., and MAITRA, A. 2008. Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology* 135, 2, 621–631.
- [117] Ferreira, M., Fujiwara, H., Morita, K., and Watt, F. M. 2009. An activating beta1 integrin mutation increases the conversion of benign to malignant skin tumors. *Cancer research* 69, 4, 1334–1342.
- [118] Fleming, I., Fisslthaler, B., Dixit, M., and Busse, R. 2005. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *Journal of cell science* 118, Pt 18, 4103–4111.
- [119] Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., and Albelda, S. M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* 16, 3, 183–194.
- [120] Friedland-Little, J. M., Hoffmann, A. D., Ocbina, P. J. R., Peterson, M. A., Bosman, J. D., Chen, Y., Cheng, S. Y., Anderson, K. V., and Moskowitz, I. P. 2011. A novel murine allele of Intraflagellar Transport Protein 172 causes a syndrome including VACTERL-like features with hydrocephalus. *Human molecular genetics* 20, 19, 3725–3737.
- [121] Fritz, S., Küper-Steffen, R., Feilhauer, K., Sommer, C. M., Richter, G. M., Bosse, A., Hennig, R., and Königer, J. 2019. Intraductal tubular papillary neoplasm (ITPN), a novel entity of pancreatic epithelial neoplasms and precursor of cancer: A case report and review of the literature. *International Journal of Surgery Case Reports* 55, 187–191.
- [122] Fujii, S., Mitsunaga, S., Yamazaki, M., Hasebe, T., Ishii, G., Kojima, M., Kinoshita, T., Ueno, T., Esumi, H., and Ochiai, A. 2008. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer science* 99, 9, 1813–1819.
- [123] Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell* 19, 5, 2092–2100.
- [124] Fulmer, D., Toomer, K. A., Glover, J., Guo, L., Moore, K., Moore, R., Stairley, R., Gensemer, C., Abrol, S., Rumph, M. K., Emetu, F., Lipschutz, J. H., McDowell, C., Bian, J., Wang, C., Beck, T., Wessels, A., Renault, M.-A., and Norris, R. A. 2020. Desert hedgehog-primary cilia cross talk shapes mitral valve tissue by organizing smooth muscle actin. *Developmental biology* 463, 1, 26–38.

- [125] Furuyama, K., Doi, R., Mori, T., Toyoda, E., Ito, D., Kami, K., Koizumi, M., Kida, A., Kawaguchi, Y., and Fujimoto, K. 2006. Clinical significance of focal adhesion kinase in resectable pancreatic cancer. *World journal of surgery* 30, 2, 219–226.
- [126] Garcia-Roves, P. M., Osler, M. E., Holmström, M. H., and Zierath, J. R. 2008. Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase gamma3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 283, 51, 35724–35734.
- [127] Geller, L. T., Barzily-Rokni, M., Danino, T., Jonas, O. H., Shental, N., Nejman, D., Gavert, N., Zwang, Y., Cooper, Z. A., Shee, K., Thaïss, C. A., Reuben, A., Livny, J., Avraham, R., Frederick, D. T., Ligorio, M., Chatman, K., Johnston, S. E., Mosher, C. M., Brandis, A., Fuks, G., Gurbatri, C., Gopalakrishnan, V., Kim, M., Hurd, M. W., Katz, M., Fleming, J., MAITRA, A., Smith, D. A., Skalak, M., Bu, J., Michaud, M., Trauger, S. A., Barshack, I., Golan, T., Sandbank, J., Flaherty, K. T., Mandinova, A., Garrett, W. S., Thayer, S. P., Ferrone, C. R., Huttenhower, C., Bhatia, S. N., Gevers, D., Wargo, J. A., Golub, T. R., and Straussman, R. 2017. Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science (New York, N.Y.)* 357, 6356, 1156–1160.
- [128] Georgiadou, M. and Ivaska, J. 2017. Tensins: Bridging AMP-Activated Protein Kinase with Integrin Activation. *Trends in cell biology* 27, 10, 703–711.
- [129] Georgiadou, M., Lilja, J., Jacquemet, G., Guzmán, C., Rafeeva, M., Alibert, C., Yan, Y., Sahgal, P., Lerche, M., Manneville, J.-B., Mäkelä, T. P., and Ivaska, J. 2017. AMPK negatively regulates tensin-dependent integrin activity. *The Journal of cell biology* 216, 4, 1107–1121.
- [130] Gerdes, J. M., Liu, Y., Zaghoul, N. A., Leitch, C. C., Lawson, S. S., Kato, M., Beachy, P. A., Beales, P. L., DeMartino, G. N., Fisher, S., Badano, J. L., and Katsanis, N. 2007. Disruption of the basal body compromises proteasomal function and perturbs intracellular Wnt response. *Nature genetics* 39, 11, 1350–1360.
- [131] Ghaffar, H., Sahin, F., Sanchez-Cepedes, M., Su, G. H., Zahurak, M., Sidransky, D., and Westra, W. H. 2003. LKB1 protein expression in the evolution of glandular neoplasia of the lung. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9, 8, 2998–3003.
- [132] Ghiorzo, P. 2014. Genetic predisposition to pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology* 20, 31, 10778–10789.
- [133] Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R., and Knecht, E. 2012. Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase kinase-β (CaMKK-β). *The Journal of biological chemistry* 287, 46, 38625–38636.
- [134] Givens, C. and Tzima, E. 2016. Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? *Antioxidants & Redox Signaling* 25, 7, 373–388.
- [135] Gleizes, P. E., Munger, J. S., Nunes, I., Harpel, J. G., Mazzieri, R., Noguera, I., and Rifkin, D. B. 1997. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 15, 3, 190–197.
- [136] Gomes, L. R., Menck, C. F. M., and Cuervo, A. M. 2017. Chaperone-mediated autophagy prevents cellular transformation by regulating MYC proteasomal degradation. *Autophagy* 13, 5, 928–940.

- [137] **González, A., Hall, M. N., Lin, S.-C., and Hardie, D. G. 2020.** AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell metabolism* 31, 3, 472–492.
- [138] **Gourgou-Bourgade, S., Bascoul-Mollevi, C., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Boige, V., Bérille, J., and Conroy, T. 2013.** Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 31, 1, 23–29.
- [139] **Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., and Hardie, D. G. 2013.** AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell metabolism* 18, 4, 556–566.
- [140] **Grant, T. J., Hua, K., and Singh, A. 2016.** Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in molecular biology and translational science* 144, 241–275.
- [141] **Graser, S., Stierhof, Y.-D., Lavoie, S. B., Gassner, O. S., Lamla, S., Le Clech, M., and Nigg, E. A. 2007.** Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *The Journal of cell biology* 179, 2, 321–330.
- [142] **Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., and Brunet, A. 2007.** The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 282, 41, 30107–30119.
- [143] **Gu, D. and Xie, J. 2015.** Non-Canonical Hh Signaling in Cancer-Current Understanding and Future Directions. *Cancers* 7, 3, 1684–1698.
- [144] **Guillén-Ponce, C., Blázquez, J., González, I., de-Madaria, E., Montáns, J., and Carrato, A. 2017.** Diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 19, 10, 1205–1216.
- [145] **Guilluy, C., Osborne, L. D., van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., and Burridge, K. 2014.** Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nature cell biology* 16, 4, 376–381.
- [146] **Guo, J., Xie, K., and Zheng, S. 2016.** Molecular Biomarkers of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Their Implications in Early Diagnosis and Therapeutic Intervention of Pancreatic Cancer. *International journal of biological sciences* 12, 3, 292–301.
- [147] **Guo, L., Cui, C., Zhang, K., Wang, J., Wang, Y., Lu, Y., Chen, K., Yuan, J., Xiao, G., Tang, B., Sun, Y., and Wu, C. 2019.** Kindlin-2 links mechano-environment to proline synthesis and tumor growth. *Nature communications* 10, 1, 845.
- [148] **Guo, Y., Steele, H. E., Li, B.-Y., and Na, S. 2020.** Fluid flow-induced activation of subcellular AMPK and its interaction with FAK and Src. *Archives of biochemistry and biophysics* 679, 108208.
- [149] **Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., and Shaw, R. J. 2008.** AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* 30, 2, 214–226.

- [150] Habbig, S., Bartram, M. P., Müller, R. U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J. G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M. C., Reinhardt, H. C., Benzing, T., and Schermer, B. 2011. NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *The Journal of cell biology* 193, 4, 633–642.
- [151] Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., and Bale, A. E. 1996. Mutations of the Human Homolog of Drosophila patched in the Nevroid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell* 85, 6, 841–851.
- [152] Halper, J. and Kjaer, M. 2014. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Advances in experimental medicine and biology* 802, 31–47.
- [153] Han, Y., Xiong, Y., Shi, X., Wu, J., Zhao, Y., and Jiang, J. 2017. Regulation of Gli ciliary localization and Hedgehog signaling by the PY-NLS/karyopherin- $\beta$ 2 nuclear import system. *PLoS Biology* 15, 8, e2002063.
- [154] Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. C., and Sharpe, P. T. 1998. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development (Cambridge, England)* 125, 15, 2803–2811.
- [155] Hardie, D. G. 2011. AMPK and autophagy get connected. *The EMBO journal* 30, 4, 634–635.
- [156] Hashimoto, D., Bläuer, M., Hirota, M., Ikonen, N. H., Sand, J., and Laukkanen, J. 2014. Autophagy is needed for the growth of pancreatic adenocarcinoma and has a cytoprotective effect against anticancer drugs. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 50, 7, 1382–1390.
- [157] Hauck, C. R., Sieg, D. J., Hsia, D. A., Loftus, J. C., Gaarde, W. A., Monia, B. P., and Schlaepfer, D. D. 2001. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer research* 61, 19, 7079–7090.
- [158] Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., and Hardie, D. G. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism* 2, 1, 9–19.
- [159] Hawley, S. A., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Edelman, A. M., Carling, D., and Hardie, D. G. 1995. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 270, 45, 27186–27191.
- [160] Hayakawa, K., Tatsumi, H., and Sokabe, M. 2011. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *The Journal of cell biology* 195, 5, 721–727.
- [161] Haycraft, C. J., Banizs, B., Aydin-Son, Y., Zhang, Q., Michaud, E. J., and Yoder, B. K. 2005. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genetics* 1, 4, e53.

- [162] Hazelbag, S., Kenter, G. G., Gorter, A., Dreef, E. J., Koopman, L. A., Violette, S. M., Weinreb, P. H., and Fleuren, G. J. 2007. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *The Journal of pathology* 212, 3, 316–324.
- [163] He, M., Agbu, S., and Anderson, K. V. 2017. Microtubule Motors Drive Hedgehog Signaling in Primary Cilia. *Trends in cell biology* 27, 2, 110–125.
- [164] Heino, J. and Käpylä, J. 2009. Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Current pharmaceutical design* 15, 12, 1309–1317.
- [165] Henderson, N. C., Arnold, T. D., Katamura, Y., Giacomini, M. M., Rodriguez, J. D., McCarty, J. H., Pellicoro, A., Raschperger, E., Betsholtz, C., Ruminski, P. G., Griggs, D. W., Prinsen, M. J., Maher, J. J., Iredale, J. P., Lacy-Hulbert, A., Adams, R. H., and Sheppard, D. 2013. Targeting of  $\alpha v$  integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nature medicine* 19, 12, 1617–1624.
- [166] Heretsch, P., Tzagkaroulaki, L., and Giannis, A. 2010. Cyclopamine and hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 49, 20, 3418–3427.
- [167] Herzig, S. and Shaw, R. J. 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, 2, 121–135.
- [168] Hilgendorf, K. I., Johnson, C. T., and Jackson, P. K. 2016. The primary cilium as a cellular receiver: organizing ciliary GPCR signaling. *Current opinion in cell biology* 39, 84–92.
- [169] Hinz, B. 2015. The extracellular matrix and transforming growth factor- $\beta$ 1: Tale of a strained relationship. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 47, 54–65.
- [170] Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., Wever, O. de, Mareel, M., and Gabbiani, G. 2012. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American Journal of Pathology* 180, 4, 1340–1355.
- [171] Hirano, H. and Matsuura, Y. 2011. Sensing actin dynamics: structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL. *Biochemical and biophysical research communications* 414, 2, 373–378.
- [172] Hirokawa, N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science (New York, N. Y.)* 279, 5350, 519–526.
- [173] Ho, C. Y., Jaalouk, D. E., Vartiainen, M. K., and Lammerding, J. 2013. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* 497, 7450, 507–511.
- [174] Ho, M., Patel, A., Hanley, C., Murphy, A., McSweeney, T., Zhang, L., McCann, A., OGorman, P., and Bianchi, G. 2019. Exploiting autophagy in multiple myeloma. *JCMT* 2019.
- [175] Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L., and Rider, M. H. 2006. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *The Journal of biological chemistry* 281, 9, 5335–5340.

- [176] Hornberger, T. A., Stuppard, R., Conley, K. E., Fedele, M. J., Fiorotto, M. L., Chin, E. R., and Esser, K. A. 2004. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism. *The Biochemical journal* 380, Pt 3, 795–804.
- [177] Horton, E. R., Byron, A., Askari, J. A., Ng, D. H. J., Millon-Frémillon, A., Robertson, J., Koper, E. J., Paul, N. R., Warwood, S., Knight, D., Humphries, J. D., and Humphries, M. J. 2015. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nature cell biology* 17, 12, 1577–1587.
- [178] Hosein, A. N., Brekken, R. A., and MAITRA, A. 2020. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 17, 8, 487–505.
- [179] Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Longnecker, D. S., Lüttges, J., and Offerhaus, G. J. 2001. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology* 25, 5, 579–586.
- [180] Hu, A. and Song, B.-L. 2019. The interplay of Patched, Smoothed and cholesterol in Hedgehog signaling. *Current opinion in cell biology* 61, 31–38.
- [181] Hu, J. K.-H., Du, W., Shelton, S. J., Oldham, M. C., DiPersio, C. M., and Klein, O. D. 2017. An FAK-YAP-mTOR Signaling Axis Regulates Stem Cell-Based Tissue Renewal in Mice. *Cell stem cell* 21, 1, 91-106.e6.
- [182] Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T., and Nelson, W. J. 2010. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science (New York, N.Y.)* 329, 5990, 436–439.
- [183] Hu, Q. and Nelson, W. J. 2011. Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 68, 6, 313–324.
- [184] Huang, H., Zhang, Y., Gallegos, V., Sorrelle, N., Zaid, M. M., Toombs, J., Du, W., Wright, S., Hagopian, M., Wang, Z., Hosein, A. N., Sathe, A. A., Xing, C., Koay, E. J., Driscoll, K. E., and Brekken, R. A. 2019. Targeting TGF $\beta$ 2-mutant tumors exposes vulnerabilities to stromal TGF $\beta$  blockade in pancreatic cancer. *EMBO molecular medicine* 11, 11, e10515.
- [185] Huang, X., Yang, N., Fiore, V. F., Barker, T. H., Sun, Y., Morris, S. W., Ding, Q., Thannickal, V. J., and Zhou, Y. 2012. Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47, 3, 340–348.
- [186] Huangfu, D., Liu, A., Rakean, A. S., Murcia, N. S., Niswander, L., and Anderson, K. V. 2003. Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426, 6962, 83–87.
- [187] Hudson, E. R., Pan, D. A., James, J., Lucocq, J. M., Hawley, S. A., Green, K. A., Baba, O., Terashima, T., and Hardie, D. 2003. A Novel Domain in AMP-Activated Protein Kinase Causes Glycogen Storage Bodies Similar to Those Seen in Hereditary Cardiac Arrhythmias. *Current biology : CB* 13, 10, 861–866.

- [188] Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., and Witters, L. A. 2005. The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of biological chemistry* 280, 32, 29060–29066.
- [189] Hwang, R. F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K. D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D. B., and Logsdon, C. D. 2008. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer research* 68, 3, 918–926.
- [190] Hynes, R. O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 1, 11–25.
- [191] Hynes, R. O. 2002. Integrins. *Cell* 110, 6, 673–687.
- [192] Hytönen, V. P. and Wehrle-Haller, B. 2016. Mechanosensing in cell-matrix adhesions - Converting tension into chemical signals. *Experimental cell research* 343, 1, 35–41.
- [193] Iida, N., Dzutsev, A., Stewart, C. A., Smith, L., Bouladoux, N., Weingarten, R. A., Molina, D. A., Salcedo, R., Back, T., Cramer, S., Dai, R.-M., Kiu, H., Cardone, M., Naik, S., Patri, A. K., Wang, E., Marincola, F. M., Frank, K. M., Belkaid, Y., Trinchieri, G., and Goldszmid, R. S. 2013. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science (New York, N.Y.)* 342, 6161, 967–970.
- [194] Infante, P., Alfonsi, R., Ingallina, C., Quaglio, D., Ghirga, F., D'Acquarica, I., Bernardi, F., Di Magno, L., Canettieri, G., Screpanti, I., Gulino, A., Botta, B., Mori, M., and Di Marcotullio, L. 2016. Inhibition of Hedgehog-dependent tumors and cancer stem cells by a newly identified naturally occurring chemotype. *Cell death & disease* 7, 9, e2376.
- [195] Ingham, P. W. and McMahon, A. P. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development* 15, 23, 3059–3087.
- [196] Inoki, K., Kim, J., and Guan, K.-L. 2012. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, 381–400.
- [197] Inoki, K., Li, Y., Xu, T., and Guan, K.-L. 2003. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* 17, 15, 1829–1834.
- [198] 2017. Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer cell* 32, 2, 185-203.e13.
- [199] Ishikawa, H. and Marshall, W. F. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 4, 222–234.
- [200] Iskratsch, T., Wolfenson, H., and Sheetz, M. P. 2014. Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 12, 825–833.
- [201] Itakura, E. and Mizushima, N. 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 6, 764–776.
- [202] Izzard, C. S. and Lochner, L. R. 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *Journal of cell science* 21, 1, 129–159.

- [203] Jacobs, E. J., Chanock, S. J., Fuchs, C. S., Lacroix, A., McWilliams, R. R., Steplowski, E., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Arslan, A. A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Gross, M., Helzlsouer, K., Petersen, G., Zheng, W., Agalliu, I., Allen, N. E., Amundadottir, L., Boutron-Ruault, M.-C., Buring, J. E., Canzian, F., Clipp, S., Dorransoro, M., Gaziano, J. M., Giovannucci, E. L., Hankinson, S. E., Hartge, P., Hoover, R. N., Hunter, D. J., Jacobs, K. B., Jenab, M., Kraft, P., Kooperberg, C., Lynch, S. M., Sund, M., Mendelsohn, J. B., Mouw, T., Newton, C. C., Overvad, K., Palli, D., Peeters, P. H. M., Rajkovic, A., Shu, X.-O., Thomas, G., Tobias, G. S., Trichopoulos, D., Virtamo, J., Wactawski-Wende, J., Wolpin, B. M., Yu, K., and Zeleniuch-Jacquotte, A. 2010. Family history of cancer and risk of pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *International journal of cancer* 127, 6, 1421–1428.
- [204] Jahed, Z. and Mofrad, M. R. 2019. The nucleus feels the force, LINCed in or not! *Current opinion in cell biology* 58, 114–119.
- [205] Jain, R. K. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)* 307, 5706, 58–62.
- [206] Jenne, D. E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Müller, O., Back, W., and Zimmer, M. 1998. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nature genetics* 18, 1, 38–43.
- [207] Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B. L., Zhu, Y., Herndon, J. M., Meyer, M. A., Nywening, T. M., Hawkins, W. G., Shapiro, I. M., Weaver, D. T., Pachter, J. A., Wang-Gillam, A., and DeNardo, D. G. 2016. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nature medicine* 22, 8, 851–860.
- [208] Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M. J., and Thompson, C. B. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell* 18, 3, 283–293.
- [209] Kabacaoglu, D., Ciecieski, K. J., Ruess, D. A., and Algül, H. 2018. Immune Checkpoint Inhibition for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current Limitations and Future Options. *Frontiers in immunology* 9, 1878.
- [210] Kamphorst, J. J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S. R., Lu, W., Grabocka, E., Vander Heiden, M. G., Miller, G., Drebin, J. A., Bar-Sagi, D., Thompson, C. B., and Rabinowitz, J. D. 2015. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer research* 75, 3, 544–553.
- [211] Kang, M. R., Kim, M. S., Oh, J. E., Kim, Y. R., Song, S. Y., Kim, S. S., Ahn, C. H., Yoo, N. J., and Lee, S. H. 2009. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *The Journal of pathology* 217, 5, 702–706.
- [212] Karanasios, E., Walker, S. A., Okkenhaug, H., Manifava, M., Hummel, E., Zimmermann, H., Ahmed, Q., Domart, M.-C., Collinson, L., and Ktistakis, N. T. 2016. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nature communications* 7, 12420.
- [213] Kato, K., Ogura, T., Kishimoto, A., Minegishi, Y., Nakajima, N., Miyazaki, M., and Esumi, H. 2002. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene* 21, 39, 6082–6090.

- [214] Keith, C. T. and Schreiber, S. L. 1995. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, N.Y.)* 270, 5233, 50–51.
- [215] Kikuta, K., Masamune, A., Watanabe, T., Ariga, H., Itoh, H., Hamada, S., Satoh, K., Egawa, S., Unno, M., and Shimosegawa, T. 2010. Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 403, 3-4, 380–384.
- [216] Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., and Guan, K.-L. 2013. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* 152, 1-2, 290–303.
- [217] Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 2, 132–141.
- [218] Kim, J., Lee, J. E., Heynen-Genel, S., Suyama, E., Ono, K., Lee, K., Ideker, T., Aza-Blanc, P., and Gleeson, J. G. 2010. Functional genomic screen for modulators of ciliogenesis and cilium length. *Nature* 464, 7291, 1048–1051.
- [219] Kim, N.-G. and Gumbiner, B. M. 2015. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *Journal of Cell Biology* 210, 3, 503–515.
- [220] Kim, W., Seok Kang, Y., Soo Kim, J., Shin, N.-Y., Hanks, S. K., and Song, W. K. 2008. The integrin-coupled signaling adaptor p130Cas suppresses Smad3 function in transforming growth factor-beta signaling. *Molecular biology of the cell* 19, 5, 2135–2146.
- [221] Kise, Y., Morinaka, A., Teglund, S., and Miki, H. 2009. Sufu recruits GSK3beta for efficient processing of Gli3. *Biochemical and biophysical research communications* 387, 3, 569–574.
- [222] Klöppel, G. and Lüttges, J. 2004. The pathology of ductal-type pancreatic carcinomas and pancreatic intraepithelial neoplasia: insights for clinicians. *Current gastroenterology reports* 6, 2, 111–118.
- [223] Ko, H. W., Norman, R. X., Tran, J., Fuller, K. P., Fukuda, M., and Eggenchwiler, J. T. 2010. Broad-minded links cell cycle-related kinase to cilia assembly and hedgehog signal transduction. *Developmental cell* 18, 2, 237–247.
- [224] Kobayashi, T., Kim, S., Lin, Y.-C., Inoue, T., and Dynlacht, B. D. 2014. The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *The Journal of cell biology* 204, 2, 215–229.
- [225] Kolega, J. 1986. Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture. *The Journal of cell biology* 102, 4, 1400–1411.
- [226] Köninger, J., Giese, T., Di Mola, F. F., Wente, M. N., Esposito, I., Bachem, M. G., Giese, N. A., Büchler, M. W., and Friess, H. 2004. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 3, 943–949.
- [227] Koo, J. H. and Guan, K.-L. 2018. Interplay between YAP/TAZ and Metabolism. *Cell metabolism* 28, 2, 196–206.
- [228] Koong, A. C., Mehta, V. K., Le, Q. T., Fisher, G. A., Terris, D. J., Brown, J., Bastidas, A. J., and Vierra, M. 2000. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics\*Physics* 48, 4, 919–922.

- [229] Koppel, A. C., Kiss, A., Hindes, A., Burns, C. J., Marmer, B. L., Goldberg, G., Blumenberg, M., and Efimova, T. 2014. Delayed skin wound repair in proline-rich protein tyrosine kinase 2 knockout mice. *American journal of physiology. Cell physiology* 306, 10, C899-909.
- [230] Kowatsch, C., Woolley, R. E., Kinnebrew, M., Rohatgi, R., and Siebold, C. 2019. Structures of vertebrate Patched and Smoothed reveal intimate links between cholesterol and Hedgehog signalling. *Current opinion in structural biology* 57, 204–214.
- [231] Kowolik, C. M., Lin, M., Xie, J., Overman, L. E., and Horne, D. A. 2019. Attenuation of hedgehog/GLI signaling by NT1721 extends survival in pancreatic cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38, 1, 431.
- [232] Krech, R. L. and Walsh, D. 1991. Symptoms of pancreatic cancer. *Journal of pain and symptom management* 6, 6, 360–367.
- [233] Kurahara, H., Shinchi, H., Mataka, Y., Maemura, K., Noma, H., Kubo, F., Sakoda, M., Ueno, S., Natsugoe, S., and Takao, S. 2011. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *The Journal of surgical research* 167, 2, e211-9.
- [234] Lachowski, D., Cortes, E., Robinson, B., Rice, A., Rombouts, K., and Del Río Hernández, A. E. 2018. FAK controls the mechanical activation of YAP, a transcriptional regulator required for durotaxis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32, 2, 1099–1107.
- [235] Laderoute, K. R., Amin, K., Calaoagan, J. M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., and Viollet, B. 2006. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Molecular and Cellular Biology* 26, 14, 5336–5347.
- [236] Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 3, 178–196.
- [237] LATTA, H., MAUNSBACH, A. B., and MADDEN, S. C. 1961. Cilia in different segments of the rat nephron. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 11, 248–252.
- [238] Law, H. C.-H., Lagundžin, D., Clement, E. J., Qiao, F., Wagner, Z. S., Krieger, K. L., Costanzo-Garvey, D., Caffrey, T. C., Grem, J. L., DiMaio, D. J., Grandgenett, P. M., Cook, L. M., Fisher, K. W., Yu, F., Hollingsworth, M. A., and Woods, N. T. 2020. The Proteomic Landscape of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Liver Metastases Identifies Molecular Subtypes and Associations with Clinical Response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 26, 5, 1065–1076.
- [239] Lawson, C., Lim, S.-T., Uryu, S., Chen, X. L., Calderwood, D. A., and Schlaepfer, D. D. 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *The Journal of cell biology* 196, 2, 223–232.
- [240] Le, H., Kleinerman, R., Lerman, O. Z., Brown, D., Galiano, R., Gurtner, G. C., Warren, S. M., Levine, J. P., and Saadeh, P. B. 2008. Hedgehog signaling is essential for normal wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16, 6, 768–773.
- [241] Lee, F.-Y., Zhen, Y.-Y., Yuen, C.-M., Fan, R., Chen, Y.-T., Sheu, J.-J., Chen, Y.-L., Wang, C.-J., Sun, C.-K., and Yip, H.-K. 2017. The mTOR-FAK mechanotransduction signaling axis for focal adhesion maturation and cell proliferation. *American Journal of Translational Research* 9, 4, 1603–1617.

- [242] Lee, J. J., Ekker, S. C., Kessler, D. P. von, Porter, J. A., Sun, B. I., and Beachy, P. A. 1994. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 266, 5190, 1528–1537.
- [243] Lee, J.-O., Bankston, L. A., and Robert C Liddington, M. A. a. 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3, 12, 1333–1340.
- [244] Leight, J. L., Wozniak, M. A., Chen, S., Lynch, M. L., and Chen, C. S. 2012. Matrix rigidity regulates a switch between TGF- $\beta$ 1-induced apoptosis and epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* 23, 5, 781–791.
- [245] Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F. T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L., and Weaver, V. M. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 5, 891–906.
- [246] Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., Fong, S. F. T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D. L., and Weaver, V. M. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 5, 891–906.
- [247] Levin, M., Johnson, R. L., Sterna, C. D., Kuehn, M., and Tabin, C. 1995. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell* 82, 5, 803–814.
- [248] Li, J., Hou, B., Tumova, S., Muraki, K., Bruns, A., Ludlow, M. J., Sedo, A., Hyman, A. J., McKeown, L., Young, R. S., Yuldasheva, N. Y., Majeed, Y., Wilson, L. A., Rode, B., Bailey, M. A., Kim, H. R., Fu, Z., Carter, D. A., Bilton, J., Imrie, H., Ajuh, P., Dear, T. N., Cubbon, R. M., Kearney, M. T., Prasad, R. K., Evans, P. C., Ainscough, J. F., and Beech, D. J. 2014. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature* 515, 7526, 279–282.
- [249] Li, J.-T., Wang, Y.-P., Yin, M., and Lei, Q.-Y. 2019. Metabolism remodeling in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell stress* 3, 12, 361–368.
- [250] Li, W., Li, J., and Bao, J. 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 7, 1125–1136.
- [251] Li, X.-Y., Zhou, X., Rowe, R. G., Hu, Y., Schlaepfer, D. D., Ilić, D., Dressler, G., Park, A., Guan, J.-L., and Weiss, S. J. 2011. Snail1 controls epithelial-mesenchymal lineage commitment in focal adhesion kinase-null embryonic cells. *The Journal of cell biology* 195, 5, 729–738.
- [252] Li, Y.-H., Luo, J., Mosley, Y.-Y. C., Hedrick, V. E., Paul, L. N., Chang, J., Zhang, G., Wang, Y.-K., Banko, M. R., Brunet, A., Kuang, S., Wu, J.-L., Chang, C.-J., Scott, M. P., and Yang, J.-Y. 2015. AMP-Activated Protein Kinase Directly Phosphorylates and Destabilizes Hedgehog Pathway Transcription Factor GLI1 in Medulloblastoma. *Cell Reports* 12, 4, 599–609.
- [253] Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 6762, 672–676.
- [254] Lim, J. P. and Gleeson, P. A. 2011. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology* 89, 8, 836–843.

- [255] Lim, S.-T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T.-T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S. J., Schlaepfer, D. D., and Ilic, D. 2008. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Molecular cell* 29, 1, 9–22.
- [256] Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A. M., Goldstein, L. S. B., Somlo, S., and Igarashi, P. 2003. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9, 5286–5291.
- [257] Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R., and Spiegelman, B. M. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 6899, 797–801.
- [258] Ling, N. X. Y., Kaczmarek, A., Hoque, A., Davie, E., Ngoei, K. R. W., Morrison, K. R., Smiles, W. J., Forte, G. M., Wang, T., Lie, S., Dite, T. A., Langendorf, C. G., Scott, J. W., Oakhill, J. S., and Petersen, J. 2020. mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nature metabolism* 2, 1, 41–49.
- [259] Litingtung, Y. and Chiang, C. 2000. Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nature neuroscience* 3, 10, 979–985.
- [260] Liu, F., Mih, J. D., Shea, B. S., Kho, A. T., Sharif, A. S., Tager, A. M., and Tschumperlin, D. J. 2010. Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *The Journal of cell biology* 190, 4, 693–706.
- [261] Liu, J., Zeng, H., and Liu, A. 2015. The loss of Hh responsiveness by a non-ciliary Gli2 variant. *Development (Cambridge, England)* 142, 9, 1651–1660.
- [262] Liu, X., Xu, J., Zhang, B., Liu, J., Liang, C., Meng, Q., Hua, J., Yu, X., and Shi, S. 2019. The reciprocal regulation between host tissue and immune cells in pancreatic ductal adenocarcinoma: new insights and therapeutic implications. *Molecular cancer* 18, 1, 184.
- [263] Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M. N. 2002. Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular cell* 10, 3, 457–468.
- [264] Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology : CB* 15, 8, 702–713.
- [265] Longo, V., Brunetti, O., Gnoni, A., Cascinu, S., Gasparini, G., Lorusso, V., Ribatti, D., and Silvestris, N. 2016. Angiogenesis in pancreatic ductal adenocarcinoma: A controversial issue. *Oncotarget* 7, 36, 58649–58658.
- [266] Lunardi, S., Muschel, R. J., and Brunner, T. B. 2014. The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer letters* 343, 2, 147–155.
- [267] Maftouh, M., Avan, A., Sciarrillo, R., Granchi, C., Leon, L. G., Rani, R., Funel, N., Smid, K., Honeywell, R., Boggi, U., Minutolo, F., Peters, G. J., and Giovannetti, E. 2014. Synergistic interaction of novel lactate dehydrogenase inhibitors with gemcitabine against pancreatic cancer cells in hypoxia. *British journal of cancer* 110, 1, 172–182.

- [268] Maniotis, A. J., Chen, C. S., and Ingber, D. E. 1997. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3, 849–854.
- [269] Manuel, E. R., Chen, J., D'Apuzzo, M., Lampa, M. G., Kaltcheva, T. I., Thompson, C. B., Ludwig, T., Chung, V., and Diamond, D. J. 2015. Salmonella-Based Therapy Targeting Indoleamine 2,3-Dioxygenase Coupled with Enzymatic Depletion of Tumor Hyaluronan Induces Complete Regression of Aggressive Pancreatic Tumors. *Cancer immunology research* 3, 9, 1096–1107.
- [270] Marigo, V., Roberts, D. J., Lee, S. M., Tsukurov, O., Levi, T., Gastier, J. M., Epstein, D. J., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., and Seidman, C. E. 1995. Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28, 1, 44–51.
- [271] Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 453–461.
- [272] Mastronardi, F. G., Dimitroulakos, J., Kamel-Reid, S., and Manoukian, A. S. 2000. Co-localization of patched and activated sonic hedgehog to lysosomes in neurons. *Neuroreport* 11, 3, 581–585.
- [273] Matisse, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A., and Joyner, A. L. 1998. Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development (Cambridge, England)* 125, 15, 2759–2770.
- [274] Matthaei, H., Schulick, R. D., Hruban, R. H., and MAITRA, A. 2011. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8, 3, 141–150.
- [275] Matz-Soja, M., Aleithe, S., Marbach, E., Böttger, J., Arnold, K., Schmidt-Heck, W., Kratzsch, J., and Gebhardt, R. 2014. Hepatic Hedgehog signaling contributes to the regulation of IGF1 and IGFBP1 serum levels. *Cell Communication and Signaling : CCS* 12, 11.
- [276] McCleary-Wheeler, A. L., Carr, R. M., Palmer, S. R., Smyrk, T. C., Allred, J. B., Almada, L. L., Tolosa, E. J., Lamberti, M. J., Marks, D. L., Borad, M. J., Molina, J. R., Qi, Y., Lingle, W. L., Grothey, A., Pitot, H. C., Jatoi, A., Northfelt, D. W., Bryce, A. H., McWilliams, R. R., Okuno, S. H., Haluska, P., Kim, G. P., Colon-Otero, G., Lowe, V. J., Callstrom, M. R., Ma, W. W., Bekaii-Saab, T., Hung, M.-C., Erlichman, C., and Fernandez-Zapico, M. E. 2020. Phase 1 trial of Vismodegib and Erlotinib combination in metastatic pancreatic cancer. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 20, 1, 101–109.
- [277] McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F. P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M. H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., and Dikic, I. 2015. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular cell* 57, 1, 39–54.
- [278] Meijer, W. H., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., and Kiel, J. A. K. W. 2007. ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* 3, 2, 106–116.

- [279] **Melstrom, L. G., Salazar, M. D., and Diamond, D. J. 2017.** The pancreatic cancer microenvironment: A true double agent. *Journal of surgical oncology* 116, 1, 7–15.
- [280] **Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.-L. 2016.** Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & development* 30, 1, 1–17.
- [281] **Metallo, C. M. and Vander Heiden, M. G. 2013.** Understanding metabolic regulation and its influence on cell physiology. *Molecular cell* 49, 3, 388–398.
- [282] **Meves, A., Geiger, T., Zanivan, S., DiGiovanni, J., Mann, M., and Fässler, R. 2011.** Beta1 integrin cytoplasmic tyrosines promote skin tumorigenesis independent of their phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 37, 15213–15218.
- [283] **Mihaylova, M. M., Vasquez, D. S., Ravnskjaer, K., Denechaud, P.-D., Yu, R. T., Alvarez, J. G., Downes, M., Evans, R. M., Montminy, M., and Shaw, R. J. 2011.** Class Ila histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145, 4, 607–621.
- [284] **Milenkovic, L., Scott, M. P., and Rohatgi, R. 2009.** Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *The Journal of cell biology* 187, 3, 365–374.
- [285] **Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., and Treisman, R. 2003.** Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell* 113, 3, 329–342.
- [286] **Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., and Treisman, R. 2003.** Actin Dynamics Control SRF Activity by Regulation of Its Coactivator MAL. *Cell* 113, 3, 329–342.
- [287] **Mirvis, M., Stearns, T., and James Nelson, W. 2018.** Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal* 475, 14, 2329–2353.
- [288] **Mitra, S. K., Hanson, D. A., and Schlaepfer, D. D. 2005.** Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 1, 56–68.
- [289] **Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., and Klionsky, D. J. 2008.** Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 7182, 1069–1075.
- [290] **Mizutani, Y., Kobayashi, H., Iida, T., Asai, N., Masamune, A., Hara, A., Esaki, N., Ushida, K., Mii, S., Shiraki, Y., Ando, K., Weng, L., Ishihara, S., Ponik, S. M., Conklin, M. W., Haga, H., Nagasaka, A., Miyata, T., Matsuyama, M., Kobayashi, T., Fujii, T., Yamada, S., Yamaguchi, J., Wang, T., Woods, S. L., Worthley, D., Shimamura, T., Fujishiro, M., Hirooka, Y., Enomoto, A., and Takahashi, M. 2019.** Meflin-Positive Cancer-Associated Fibroblasts Inhibit Pancreatic Carcinogenesis. *Cancer research* 79, 20, 5367–5381.
- [291] **Mo, J.-S., Meng, Z., Kim, Y. C., Park, H. W., Hansen, C. G., Kim, S., Lim, D.-S., and Guan, K.-L. 2015.** Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nature cell biology* 17, 4, 500–510.
- [292] **Moffitt, R. A., Marayati, R., Flate, E. L., Volmar, K. E., Loeza, S. G. H., Hoadley, K. A., Rashid, N. U., Williams, L. A., Eaton, S. C., Chung, A. H., Smyla, J. K., Anderson, J. M., Kim, H. J., Bentrem, D. J., Talamonti, M. S., Iacobuzio-Donahue, C. A., Hollingsworth, M. A., and Yeh, J. J. 2015.** Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature genetics* 47, 10, 1168–1178.

- [293] Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., Saunier, S., Spassky, N., Bastin, P., and Benmerah, A. 2010. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *Journal of cell science* 123, Pt 10, 1785–1795.
- [294] Moreno, D., Viana, R., and Sanz, P. 2009. Two-hybrid analysis identifies PSMD11, a non-ATPase subunit of the proteasome, as a novel interaction partner of AMP-activated protein kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology* 41, 12, 2431–2439.
- [295] Morton, J. P., Mongeau, M. E., Klimstra, D. S., Morris, J. P., Lee, Y. C., Kawaguchi, Y., Wright, C. V. E., Hebrok, M., and Lewis, B. C. 2007. Sonic hedgehog acts at multiple stages during pancreatic tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12, 5103–5108.
- [296] Mukubou, H., Tsujimura, T., Sasaki, R., and Ku, Y. 2010. The role of autophagy in the treatment of pancreatic cancer with gemcitabine and ionizing radiation. *International journal of oncology* 37, 4, 821–828.
- [297] Munday, M. R., Campbell, D. G., Carling, D., and Hardie, D. G. 1988. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry* 175, 2, 331–338.
- [298] Mungai, P. T., Waypa, G. B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M. K., and Schumacker, P. T. 2011. Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Molecular and Cellular Biology* 31, 17, 3531–3545.
- [299] Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., and Sheppard, D. 1999. A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin  $\alpha\beta 6$  Binds and Activates Latent TGF  $\beta 1$ . *Cell* 96, 3, 319–328.
- [300] Murtaugh, L. C. and Keefe, M. D. 2015. Regeneration and repair of the exocrine pancreas. *Annual review of physiology* 77, 229–249.
- [301] N Kalimuthu, S., Wilson, G. W., Grant, R. C., Seto, M., O’Kane, G., Vajpeyi, R., Notta, F., Gallinger, S., and Chetty, R. 2020. Morphological classification of pancreatic ductal adenocarcinoma that predicts molecular subtypes and correlates with clinical outcome. *Gut* 69, 2, 317–328.
- [302] Nagaraj, R., Gururaja-Rao, S., Jones, K. T., Slattery, M., Negre, N., Braas, D., Christofk, H., White, K. P., Mann, R., and Banerjee, U. 2012. Control of mitochondrial structure and function by the Yorkie/YAP oncogenic pathway. *Genes & development* 26, 18, 2027–2037.
- [303] Nagarajan, A., Dogra, S. K., Sun, L., Gandotra, N., Ho, T., Cai, G., Cline, G., Kumar, P., Cowles, R. A., and Wajapeyee, N. 2017. Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport. *Molecular cell* 67, 4, 685-701.e6.
- [304] Nakamura, T., Aikawa, T., Iwamoto-Enomoto, M., Iwamoto, M., Higuchi, Y., Maurizio, P., Kinto, N., Yamaguchi, A., Noji, S., Kurisu, K., and Matsuya, T. 1997. Induction of Osteogenic Differentiation by Hedgehog Proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 237, 2, 465–469.

- [305] Nauli, S. M., Kawanabe, Y., Kaminski, J. J., Pearce, W. J., Ingber, D. E., and Zhou, J. 2008. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation* 117, 9, 1161–1171.
- [306] Naumanen, P., Lappalainen, P., and Hotulainen, P. 2008. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of microscopy* 231, 3, 446–454.
- [307] New, M., van Acker, T., Long, J. S., Sakamaki, J.-I., Ryan, K. M., and Tooze, S. A. 2017. Molecular Pathways Controlling Autophagy in Pancreatic Cancer. *Frontiers in oncology* 7, 28.
- [308] Nguyen, A. V., Nyberg, K. D., Scott, M. B., Welsh, A. M., Nguyen, A. H., Wu, N., Hohlbauch, S. V., Geisse, N. A., Gibb, E. A., Robertson, A. G., Donahue, T. R., and Rowat, A. C. 2016. Stiffness of pancreatic cancer cells is associated with increased invasive potential. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 8, 12, 1232–1245.
- [309] Ni, H.-M., Bockus, A., Wozniak, A. L., Jones, K., Weinman, S., Yin, X.-M., and Ding, W.-X. 2011. Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* 7, 2, 188–204.
- [310] Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 5785, 795–801.
- [311] Oakhill, J. S., Chen, Z.-P., Scott, J. W., Steel, R., Castelli, L. A., Ling, N., Macaulay, S. L., and Kemp, B. E. 2010.  $\beta$ -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 45, 19237–19241.
- [312] Öhlund, D., Handly-Santana, A., Biffi, G., Elyada, E., Almeida, A. S., Ponz-Sarvisé, M., Corbo, V., Oni, T. E., Hearn, S. A., Lee, E. J., Chio, I. I. C., Hwang, C.-I., Tiriác, H., Baker, L. A., Engle, D. D., Feig, C., Kultti, A., Egeblad, M., Fearon, D. T., Crawford, J. M., Clevers, H., Park, Y., and Tuveson, D. A. 2017. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of experimental medicine* 214, 3, 579–596.
- [313] Ojajärvi, I. A., Partanen, T. J., Ahlbom, A., Boffetta, P., Hakulinen, T., Jourenkova, N., Kauppinen, T. P., Kogevinas, M., Porta, M., Vainio, H. U., Weiderpass, E., and Wesseling, C. H. 2000. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine* 57, 5, 316–324.
- [314] O’Kane, G. M., Grünwald, B. T., Jang, G.-H., Masoomian, M., Picardo, S., Grant, R. C., Denroche, R. E., Zhang, A., Wang, Y., Lam, B., Krzyzanowski, P. M., Lungu, I. M., Bartlett, J. M. S., Peralta, M., Vyas, F., Khokha, R., Biagi, J., Chadwick, D., Ramotar, S., Hutchinson, S., Dodd, A., Wilson, J. M., Notta, F., Zogopoulos, G., Gallinger, S., Knox, J. J., and Fischer, S. E. 2020. GATA6 Expression Distinguishes Classical and Basal-like Subtypes in Advanced Pancreatic Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 26, 18, 4901–4910.
- [315] Orr, A. W., Sanders, J. M., Bevard, M., Coleman, E., Sarembock, I. J., and Schwartz, M. A. 2005. The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *The Journal of cell biology* 169, 1, 191–202.
- [316] Osawa, M., Masuda, M., Kusano, K., and Fujiwara, K. 2002. Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *The Journal of cell biology* 158, 4, 773–785.

- [317] Pan, Y., Bai, C. B., Joyner, A. L., and Wang, B. 2006. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Molecular and Cellular Biology* 26, 9, 3365–3377.
- [318] Pan, Y. and Wang, B. 2007. A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *The Journal of biological chemistry* 282, 15, 10846–10852.
- [319] Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., and Eaton, S. 2005. Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wntless signalling. *Nature* 435, 7038, 58–65.
- [320] Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. 2017. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18, 12, 758–770.
- [321] Pang, Y., Holmes, M. V., Chen, Z., and Kartsonaki, C. 2019. A review of lifestyle, metabolic risk factors, and blood-based biomarkers for early diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology* 34, 2, 330–345.
- [322] Parekh, A., Ruppender, N. S., Branch, K. M., Sewell-Loftin, M. K., Lin, J., Boyer, P. D., Candiello, J. E., Merryman, W. D., Guelcher, S. A., and Weaver, A. M. 2011. Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophysical journal* 100, 3, 573–582.
- [323] Park, J. S., Burckhardt, C. J., Lazcano, R., Solis, L. M., Isogai, T., Li, L., Chen, C. S., Gao, B., Minna, J. D., Bachoo, R., DeBerardinis, R. J., and Danuser, G. 2020. Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture. *Nature* 578, 7796, 621–626.
- [324] Park, J.-M., Jung, C. H., Seo, M., Otto, N. M., Grunwald, D., Kim, K. H., Moriarty, B., Kim, Y.-M., Starker, C., Nho, R. S., Voytas, D., and Kim, D.-H. 2016. The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy* 12, 3, 547–564.
- [325] Parker, S. J., Amendola, C. R., Hollinshead, K. E. R., Yu, Q., Yamamoto, K., Encarnación-Rosado, J., Rose, R. E., LaRue, M. M., Sohn, A. S. W., Biancur, D. E., Paulo, J. A., Gygi, S. P., Jones, D. R., Wang, H., Philips, M. R., Bar-Sagi, D., Mancias, J. D., and Kimmelman, A. C. 2020. Selective Alanine Transporter Utilization Creates a Targetable Metabolic Niche in Pancreatic Cancer. *Cancer discovery* 10, 7, 1018–1037.
- [326] Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. A., Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. A., and Weaver, V. M. 2005. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell* 8, 3, 241–254.
- [327] Patel, N. R., Bole, M., Chen, C., Hardin, C. C., Kho, A. T., Mih, J., Deng, L., Butler, J., Tschumperlin, D., Fredberg, J. J., Krishnan, R., and Koziel, H. 2012. Cell elasticity determines macrophage function. *PloS one* 7, 9, e41024.
- [328] Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Castello-Cros, R., Flomenberg, N., Witkiewicz, A. K., Frank, P. G., Casimiro, M. C., Wang, C., Fortina, P., Addya, S., Pestell, R. G., Martinez-Outschoorn, U. E., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. 2009. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8, 23, 3984–4001.

- [329] Pechkovsky, D. V., Scaffidi, A. K., Hackett, T. L., Ballard, J., Shaheen, F., Thompson, P. J., Thannickal, V. J., and Knight, D. A. 2008. Transforming growth factor beta1 induces alphavbeta3 integrin expression in human lung fibroblasts via a beta3 integrin-, c-Src-, and p38 MAPK-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 283, 19, 12898–12908.
- [330] Peng, T., Frank, D. B., Kadzik, R. S., Morley, M. P., Rathi, K. S., Wang, T., Zhou, S., Cheng, L., Lu, M. M., and Morrissey, E. E. 2015. Hedgehog actively maintains adult lung quiescence and regulates repair and regeneration. *Nature* 526, 7574, 578–582.
- [331] Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A., and Galdes, A. 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *The Journal of biological chemistry* 273, 22, 14037–14045.
- [332] Perera, R. M., Stoykova, S., Nicolay, B. N., Ross, K. N., Fitamant, J., Boukhali, M., Lengrand, J., Deshpande, V., Selig, M. K., Ferrone, C. R., Settleman, J., Stephanopoulos, G., Dyson, N. J., Zoncu, R., Ramaswamy, S., Haas, W., and Bardeesy, N. 2015. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* 524, 7565, 361–365.
- [333] Phillips, P. A., Yang, L., Shulkes, A., Vonlaufen, A., Poljak, A., Bustamante, S., Warren, A., Xu, Z., Guilhaus, M., Pirola, R., Apte, M. V., and Wilson, J. S. 2010. Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 40, 17397–17402.
- [334] Pickup, M. W., Mouw, J. K., and Weaver, V. M. 2014. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports* 15, 12, 1243–1253.
- [335] Piquet, L., Robbe, T., Neaud, V., Basbous, S., Rosciglione, S., Saltel, F., and Moreau, V. 2018. Rnd3/RhoE expression is regulated by G-actin through MKL1-SRF signaling pathway. *Experimental cell research* 370, 2, 227–236.
- [336] Plantefaber, L. C. and Hynes, R. O. 1989. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell* 56, 2, 281–290.
- [337] Praetorius, H. A. and Spring, K. R. 2001. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *The Journal of membrane biology* 184, 1, 71–79.
- [338] Puente, C., Hendrickson, R. C., and Jiang, X. 2016. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *The Journal of biological chemistry* 291, 11, 6026–6035.
- [339] Puleo, F., Nicolle, R., Blum, Y., Cros, J., Marisa, L., Demetter, P., Quertinmont, E., Svrcek, M., Elarouci, N., Iovanna, J., Franchimont, D., Verset, L., Galdon, M. G., Devière, J., Reyniès, A. de, Laurent-Puig, P., van Laethem, J.-L., Bachet, J.-B., and Maréchal, R. 2018. Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* 155, 6, 1999–2013.e3.
- [340] Pushalkar, S., Hundeyin, M., Daley, D., Zambirinis, C. P., Kurz, E., Mishra, A., Mohan, N., Aykut, B., Usyk, M., Torres, L. E., Werba, G., Zhang, K., Guo, Y., Li, Q., Akkad, N., Lall, S., Wadowski, B., Gutierrez, J., Kochen Rossi, J. A., Herzog, J. W., Diskin, B., Torres-Hernandez, A., Leinwand, J., Wang, W., Taunk, P. S., Savadkar, S., Janal, M., Saxena, A., Li, X., Cohen, D., Sartor, R. B., Saxena, D., and Miller, G. 2018. The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer discovery* 8, 4, 403–416.

- [341] Pylayeva, Y., Gillen, K. M., Gerald, W., Beggs, H. E., Reichardt, L. F., and Giancotti, F. G. 2009. Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 2, 252–266.
- [342] Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J. Z., Wu, J., Zhou, H.-M., and Li, P. 2008. Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *The EMBO journal* 27, 11, 1537–1548.
- [343] Raab, M., Swift, J., Dingal, P. C. D. P., Shah, P., Shin, J.-W., and Discher, D. E. 2012. Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *The Journal of cell biology* 199, 4, 669–683.
- [344] Racoosin, E. L. and Swanson, J. A. 1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *The Journal of cell biology* 121, 5, 1011–1020.
- [345] Rahman, F., Cotterchio, M., Cleary, S. P., and Gallinger, S. 2015. Association between alcohol consumption and pancreatic cancer risk: a case-control study. *PloS one* 10, 4, e0124489.
- [346] Ramanathan, R. K., McDonough, S. L., Philip, P. A., Hingorani, S. R., Lacy, J., Kortmansky, J. S., Thumar, J., Chiorean, E. G., Shields, A. F., Behl, D., Mehan, P. T., Gaur, R., Seery, T., Guthrie, K. A., and Hochster, H. S. 2019. Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 37, 13, 1062–1069.
- [347] Ravanan, P., Srikumar, I. F., and Talwar, P. 2017. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life sciences* 188, 53–67.
- [348] Rawla, P., Sunkara, T., and Gaduputi, V. 2019. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology* 10, 1, 10–27.
- [349] Recouvreux, M. V. and Commisso, C. 2017. Macropinocytosis: A Metabolic Adaptation to Nutrient Stress in Cancer. *Frontiers in Endocrinology* 8, 261.
- [350] Reifenberger, J., Wolter, M., Knobbe, C. B., Köhler, B., Schönicke, A., Scharwächter, C., Kumar, K., Blaschke, B., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. 2005. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology* 152, 1, 43–51.
- [351] Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., Dekleva, E. N., Saunders, T., Becerra, C. P., Tattersall, I. W., Westphalen, C. B., Kitajewski, J., Fernandez-Barrena, M. G., Fernandez-Zapico, M. E., Iacobuzio-Donahue, C., Olive, K. P., and Stanger, B. Z. 2014. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell* 25, 6, 735–747.
- [352] Rice, A. J., Cortes, E., Lachowski, D., Cheung, B. C. H., Karim, S. A., Morton, J. P., and Del Río Hernández, A. 2017. Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* 6, 7, e352.
- [353] Ricono, J. M., Huang, M., Barnes, L. A., Lau, S. K., Weis, S. M., Schlaepfer, D. D., Hanks, S. K., and Cheresch, D. A. 2009. Specific cross-talk between epidermal growth factor receptor and integrin alphavbeta5 promotes carcinoma cell invasion and metastasis. *Cancer research* 69, 4, 1383–1391.

- [354] Rieder, C. L., Jensen, C. G., and Jensen, L. C. 1979. The resorption of primary cilia during mitosis in a vertebrate (PtK1) cell line. *Journal of Ultrastructure Research* 68, 2, 173–185.
- [355] Riquelme, E., Zhang, Y., Zhang, L., Montiel, M., Zoltan, M., Dong, W., Quesada, P., Sahin, I., Chandra, V., San Lucas, A., Scheet, P., Xu, H., Hanash, S. M., Feng, L., Burks, J. K., Do, K.-A., Peterson, C. B., Nejman, D., Tzeng, C.-W. D., Kim, M. P., Sears, C. L., Ajami, N., Petrosino, J., Wood, L. D., MAITRA, A., Straussman, R., Katz, M., White, J. R., Jenq, R., Wargo, J., and McAllister, F. 2019. Tumor Microbiome Diversity and Composition Influence Pancreatic Cancer Outcomes. *Cell* 178, 4, 795–806.e12.
- [356] Risch, H. A., Yu, H., Lu, L., and Kidd, M. S. 2010. ABO blood group, Helicobacter pylori seropositivity, and risk of pancreatic cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute* 102, 7, 502–505.
- [357] Roberts, B., Casillas, C., Alfaro, A. C., Jägers, C., and Roelink, H. 2016. Patched1 and Patched2 inhibit Smoothed non-cell autonomously. *eLife* 5.
- [358] Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., and Dodd, J. 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 4, 761–775.
- [359] Romani, P., Brian, I., Santinon, G., Pocaterra, A., Audano, M., Pedretti, S., Mathieu, S., Forcato, M., Biccato, S., Manneville, J.-B., Mitro, N., and Dupont, S. 2019. Extracellular matrix mechanical cues regulate lipid metabolism through Lipin-1 and SREBP. *Nature cell biology* 21, 3, 338–347.
- [360] Romani, P., Valcarcel-Jimenez, L., Frezza, C., and Dupont, S. 2021. Crosstalk between mechanotransduction and metabolism. *Nature reviews. Molecular cell biology* 22, 1, 22–38.
- [361] Ross, E., Ata, R., Thavarajah, T., Medvedev, S., Bowden, P., Marshall, J. G., and Antonescu, C. N. 2015. AMP-Activated Protein Kinase Regulates the Cell Surface Proteome and Integrin Membrane Traffic. *PLoS one* 10, 5, e0128013.
- [362] Ross, F. A., MacKintosh, C., and Hardie, D. G. 2016. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS journal* 283, 16, 2987–3001.
- [363] Rutherford, C., Speirs, C., Williams, J. J. L., Ewart, M.-A., Mancini, S. J., Hawley, S. A., Delles, C., Viollet, B., Costa-Pereira, A. P., Baillie, G. S., Salt, I. P., and Palmer, T. M. 2016. Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. *Science signaling* 9, 453, ra109.
- [364] Sahai, E., Astsaturov, I., Cukierman, E., DeNardo, D. G., Egeblad, M., Evans, R. M., Fearon, D., Greten, F. R., Hingorani, S. R., Hunter, T., Hynes, R. O., Jain, R. K., Janowitz, T., Jorgensen, C., Kimmelman, A. C., Kolonin, M. G., Maki, R. G., Powers, R. S., Puré, E., Ramirez, D. C., Scherz-Shouval, R., Sherman, M. H., Stewart, S., Tlsty, T. D., Tuveson, D. A., Watt, F. M., Weaver, V., Weeraratna, A. T., and Werb, Z. 2020. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature reviews. Cancer* 20, 3, 174–186.
- [365] Sasaki, N., Kurisu, J., and Kengaku, M. 2010. Sonic hedgehog signaling regulates actin cytoskeleton via Tiam1-Rac1 cascade during spine formation. *Molecular and cellular neurosciences* 45, 4, 335–344.

- [366] **Satir, P. and Christensen, S. T. 2007.** Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology* 69, 377–400.
- [367] **Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M. P. 2006.** Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 5, 1015–1026.
- [368] **Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D., and Parsons, J. T. 1995.** Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* 130, 5, 1181–1187.
- [369] **Schmidt, K. N., Kuhns, S., Neuner, A., Hub, B., Zentgraf, H., and Pereira, G. 2012.** Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *The Journal of cell biology* 199, 7, 1083–1101.
- [370] **Schneider, L., Clement, C. A., Teilmann, S. C., Pazour, G. J., Hoffmann, E. K., Satir, P., and Christensen, S. T. 2005.** PDGFRalpha signaling is regulated through the primary cilium in fibroblasts. *Current Biology* 15, 20, 1861–1866.
- [371] **Schober, M., Jesenofsky, R., Faissner, R., Weidenauer, C., Haggmann, W., Michl, P., Heuchel, R. L., Haas, S. L., and Löhr, J.-M. 2014.** Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers* 6, 4, 2137–2154.
- [372] **Schrader, J., Gordon-Walker, T. T., Aucott, R. L., van Deemter, M., Quaas, A., Walsh, S., Benten, D., Forbes, S. J., Wells, R. G., and Iredale, J. P. 2011.** Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 53, 4, 1192–1205.
- [373] **Schwartz, M. A. 2010.** Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, 12, a005066.
- [374] **Serrels, B., Serrels, A., Brunton, V. G., Holt, M., McLean, G. W., Gray, C. H., Jones, G. E., and Frame, M. C. 2007.** Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nature cell biology*, 1046–1056.
- [375] **Seufferlein, T. and Ettrich, T. J. 2019.** Treatment of pancreatic cancer-neoadjuvant treatment in resectable pancreatic cancer (PDAC). *Translational Gastroenterology and Hepatology* 4, 21.
- [376] **Sharma, N., Kosan, Z. A., Stallworth, J. E., Berbari, N. F., and Yoder, B. K. 2011.** Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Molecular biology of the cell* 22, 6, 806–816.
- [377] **Shaw, R. J., Lamia, K. A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., Depinho, R. A., Montminy, M., and Cantley, L. C. 2005.** The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science (New York, N.Y.)* 310, 5754, 1642–1646.
- [378] **Shi, Y., Gao, W., Lytle, N. K., Huang, P., Yuan, X., Dann, A. M., Ridinger-Saison, M., DelGiorno, K. E., Antal, C. E., Liang, G., Atkins, A. R., Erikson, G., Sun, H., Meisenhelder, J., Terenziani, E., Woo, G., Fang, L., Santisakultarm, T. P., Manor, U., Xu, R., Becerra, C. R., Borazanci, E., Hoff, D. D. von, Grandgenett, P. M., Hollingsworth, M. A., Leblanc, M., Umetsu, S. E., Collisson, E. A., Scadeng, M., Lowy, A. M., Donahue, T. R., Reya, T., Downes, M., Evans, R. M., Wahl, G. M., Pawson, T., Tian, R., and Hunter, T. 2019.** Targeting LIF-mediated paracrine interaction for pancreatic cancer therapy and monitoring. *Nature* 569, 7754, 131–135.

- [379] Shi, Y., Liu, Y., Gao, F., Liu, Y., Tao, S., Li, Y., Glaser, K. J., Ehman, R. L., and Guo, Q. 2018. Pancreatic Stiffness Quantified with MR Elastography: Relationship to Postoperative Pancreatic Fistula after Pancreaticoenteric Anastomosis. *Radiology* 288, 2, 476–484.
- [380] Shibue, T., Brooks, M. W., Inan, M. F., Reinhardt, F., and Weinberg, R. A. 2012. The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer discovery* 2, 8, 706–721.
- [381] Shima, T., Kirisako, H., and Nakatogawa, H. 2019. COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *The Journal of cell biology* 218, 5, 1503–1510.
- [382] Shintani, T. and Klionsky, D. J. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science (New York, N.Y.)* 306, 5698, 990–995.
- [383] Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. 2020. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians* 70, 1, 7–30.
- [384] Signor, D., Wedaman, K. P., Orozco, J. T., Dwyer, N. D., Bargmann, C. I., Rose, L. S., and Scholey, J. M. 1999. Role of a class DHC1b dynein in retrograde transport of IFT motors and IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology* 147, 3, 519–530.
- [385] Singh, R. R. and O'Reilly, E. M. 2020. New Treatment Strategies for Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Drugs* 80, 7, 647–669.
- [386] Sipos, B., Frank, S., Gress, T., Hahn, S., and Klöppel, G. 2009. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]* 9, 1-2, 45–54.
- [387] Skoda, A. M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., and Serman, L. 2018. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian journal of basic medical sciences* 18, 1, 8–20.
- [388] Smith, L. R., Cho, S., and Discher, D. E. 2018. Stem Cell Differentiation is Regulated by Extracellular Matrix Mechanics. *Physiology* 33, 1, 16–25.
- [389] Son, J., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R. M., Ferrone, C. R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., Kang, Y., Fleming, J. B., Bardeesy, N., Asara, J. M., Haigis, M. C., Depinho, R. A., Cantley, L. C., and Kimmelman, A. C. 2013. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496, 7443, 101–105.
- [390] Sood, A. K., Coffin, J. E., Schneider, G. B., Fletcher, M. S., DeYoung, B. R., Gruman, L. M., Gershenson, D. M., Schaller, M. D., and Hendrix, M. J. 2004. Biological Significance of Focal Adhesion Kinase in Ovarian Cancer. *The American Journal of Pathology* 165, 4, 1087–1095.
- [391] SOROKIN, S. 1962. Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells. *The Journal of cell biology* 15, 363–377.
- [392] Sotthibundhu, A., McDonagh, K., Kriegsheim, A. von, Garcia-Munoz, A., Klawiter, A., Thompson, K., Chauhan, K. D., Krawczyk, J., McLnerney, V., Dockery, P., Devine, M. J., Kunath, T., Barry, F., O'Brien, T., and Shen, S. 2016. Rapamycin regulates autophagy and cell adhesion in induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 7, 1, 166.

- [393] Sousa, C. M., Biancur, D. E., Wang, X., Halbrook, C. J., Sherman, M. H., Zhang, L., Kremer, D., Hwang, R. F., Witkiewicz, A. K., Ying, H., Asara, J. M., Evans, R. M., Cantley, L. C., Lyssiotis, C. A., and Kimmelman, A. C. 2016. Pancreatic stellate cells support tumour metabolism through autophagic alanine secretion. *Nature* 536, 7617, 479–483.
- [394] Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B. J., Teh, T., House, C. M., Fernandez, C. S., Cox, T., Witters, L. A., and Kemp, B. E. 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry* 271, 2, 611–614.
- [395] Steele, H. E., Guo, Y., Li, B.-Y., and Na, S. 2019. Mechanotransduction of mitochondrial AMPK and its distinct role in flow-induced breast cancer cell migration. *Biochemical and biophysical research communications* 514, 2, 524–529.
- [396] Steele, N. G., Biffi, G., Kemp, S. B., Zhang, Y., Drouillard, D., Syu, L., Hao, Y., Oni, T. E., Brosnan, E., Elyada, E., Doshi, A., Hansma, C., Espinoza, C., Abbas, A., The, S., Irizarry-Negron, V., Halbrook, C. J., Franks, N. E., Hoffman, M. T., Brown, K., Carpenter, E. S., Nwosu, Z. C., Johnson, C., Lima, F., Anderson, M. A., Park, Y., Crawford, H. C., Lyssiotis, C. A., Frankel, T. L., Rao, A., Bednar, F., Dlugosz, A. A., Preall, J. B., Tuveson, D. A., Allen, B. L., and Di Pasca Magliano, M. 2021. Inhibition of Hedgehog Signaling Alters Fibroblast Composition in Pancreatic Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 27, 7, 2023–2037.
- [397] St-Jacques, B., Dassule, H. R., Karavanova, I., Botchkarev, V. A., Li, J., Danielian, P. S., McMahon, J. A., Lewis, P. M., Paus, R., and McMahon, A. P. 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Current Biology* 8, 19, 1058–1069.
- [398] St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., and McMahon, A. P. 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & development* 13, 16, 2072–2086.
- [399] Stokes, J. B., Adair, S. J., Slack-Davis, J. K., Walters, D. M., Tilghman, R. W., Hershey, E. D., Lowrey, B., Thomas, K. S., Bouton, A. H., Hwang, R. F., Stelow, E. B., Parsons, J. T., and Bauer, T. W. 2011. Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. *Molecular cancer therapeutics* 10, 11, 2135–2145.
- [400] Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., Sauvage, F. de, and Rosenthal, A. 1996. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 6605, 129–134.
- [401] Stow, J. L., Hung, Y., and Wall, A. A. 2020. Macropinocytosis: Insights from immunology and cancer. *Current opinion in cell biology* 65, 131–140.
- [402] Straface, G., Aprahamian, T., Flex, A., Gaetani, E., Biscetti, F., Smith, R. C., Pecorini, G., Pola, E., Angelini, F., Stigliano, E., Castellot, J. J., Losordo, D. W., and Pola, R. 2009. Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 8B, 2424–2435.
- [403] Suh, J. M., Gao, X., McKay, J., McKay, R., Salo, Z., and Graff, J. M. 2006. Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. *Cell metabolism* 3, 1, 25–34.
- [404] Sulzmaier, F. J., Jean, C., and Schlaepfer, D. D. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature reviews. Cancer* 14, 9, 598–610.

- [405] Sun, Z., Guo, S. S., and Fässler, R. 2016. Integrin-mediated mechanotransduction. *The Journal of cell biology* 215, 4, 445–456.
- [406] Sundararaman, A., Amirtham, U., and Rangarajan, A. 2016. Calcium-Oxidant Signaling Network Regulates AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Activation upon Matrix Deprivation. *The Journal of biological chemistry* 291, 28, 14410–14429.
- [407] Swaminathan, V. and Waterman, C. M. 2016. The molecular clutch model for mechanotransduction evolves. *Nature cell biology* 18, 5, 459–461.
- [408] Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M. M., Serfass, J. M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., Wills, C. A., Atkinson, J. M., Chen, H., Abraham, T., and Wang, H.-G. 2018. An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nature communications* 9, 1, 2855.
- [409] Tanida, I., Sou, Y., Ezaki, J., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., and Kominami, E. 2004. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *The Journal of biological chemistry* 279, 35, 36268–36276.
- [410] Teglund, S. and Toftgård, R. 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et biophysica acta* 1805, 2, 181–208.
- [411] Tempé, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.-F., and Concordet, J.-P. 2006. Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP. *Molecular and Cellular Biology* 26, 11, 4316–4326.
- [412] Tenzen, T., Allen, B. L., Cole, F., Kang, J.-S., Krauss, R. S., and McMahon, A. P. 2006. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Developmental cell* 10, 5, 647–656.
- [413] Teperino, R., Aberger, F., Esterbauer, H., Riobo, N., and Pospisilik, J. A. 2014. Canonical and non-canonical Hedgehog signalling and the control of metabolism. *Seminars in cell & developmental biology* 33, 81–92.
- [414] Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S. L., Loipetzberger, A., Connor, T., Jaeger, C., Kammerer, B., Winter, L., Wiche, G., Dalgaard, K., Selvaraj, M., Gaster, M., Lee-Young, R. S., Febbraio, M. A., Knauf, C., Cani, P. D., Aberger, F., Penninger, J. M., Pospisilik, J. A., and Esterbauer, H. 2012. Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell* 151, 2, 414–426.
- [415] Thayer, S. P., Di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Fernández-del Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L., and Hebrok, M. 2003. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 6960, 851–856.
- [416] Théron, P. P. 2012. Release and transportation of Hedgehog molecules. *Current opinion in cell biology* 24, 2, 173–180.
- [417] Thomas, M. K., Rastalsky, N., Lee, J. H., and Habener, J. F. 2000. Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49, 12, 2039–2047.

- [418] Thornton, C., Snowden, M. A., and Carling, D. 1998. Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry* 273, 20, 12443–12450.
- [419] Tojkander, S., Ciuba, K., and Lappalainen, P. 2018. CaMKK2 Regulates Mechanosensitive Assembly of Contractile Actin Stress Fibers. *Cell Reports* 24, 1, 11–19.
- [420] Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., Ehse, S., Krause, F., Chan, D. C., Alexander, C., Bauer, C., Youle, R., Langer, T., and Martinou, J.-C. 2009. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO journal* 28, 11, 1589–1600.
- [421] Torres, C. and Grippo, P. J. 2018. Pancreatic cancer subtypes: a roadmap for precision medicine. *Annals of medicine* 50, 4, 277–287.
- [422] Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Losón, O. C., Hellberg, K., Young, N. P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D. C., and Shaw, R. J. 2016. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science (New York, N.Y.)* 351, 6270, 275–281.
- [423] Tsao, C.-C. and Gorovsky, M. A. 2008. Tetrahymena IFT122A is not essential for cilia assembly but plays a role in returning IFT proteins from the ciliary tip to the cell body. *Journal of cell science* 121, Pt 4, 428–436.
- [424] Turner, C. E. 1998. Molecules in focus Paxillin. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 9, 955–959.
- [425] Turner, C. E., Glenney, J. R., and Burridge, K. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology* 111, 3, 1059–1068.
- [426] Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., and Schwartz, M. A. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437, 7057, 426–431.
- [427] van den Brink, G. R. 2007. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiological reviews* 87, 4, 1343–1375.
- [428] van der Heiden, K., Hierck, B. P., Krams, R., Crom, R. de, Cheng, C., Baiker, M., Pourquie, M. J. B. M., Alkemade, F. E., DeRuiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A. C., and Poelmann, R. E. 2008. Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 196, 2, 542–550.
- [429] van Roessel, S., Kasumova, G. G., Verheij, J., Najarian, R. M., Maggino, L., Pastena, M. de, Malleo, G., Marchegiani, G., Salvia, R., Ng, S. C., Geus, S. W. de, Lof, S., Giovinazzo, F., van Dam, J. L., Kent, T. S., Busch, O. R., van Eijck, C. H., Koerkamp, B. G., Abu Hilal, M., Bassi, C., Tseng, J. F., and Besselink, M. G. 2018. International Validation of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging System in Patients With Resected Pancreatic Cancer. *JAMA surgery* 153, 12, e183617.
- [430] Vaquero, E. C., Edderkaoui, M., Nam, K. J., Gukovsky, I., Pandol, S. J., and Gukovskaya, A. S. 2003. Extracellular matrix proteins protect pancreatic cancer cells from death via mitochondrial and nonmitochondrial pathways. *Gastroenterology* 125, 4, 1188–1202.

- [431] Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larijani, B., and Treisman, R. 2007. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science (New York, N.Y.)* 316, 5832, 1749–1752.
- [432] Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y., and DePamphilis, M. L. 2001. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes & development* 15, 10, 1229–1241.
- [433] Veenstra, V. L., Damhofer, H., Waasdorp, C., Steins, A., Kocher, H. M., Medema, J. P., van Laarhoven, H. W., and Bijlsma, M. F. 2017. Stromal SPOCK1 supports invasive pancreatic cancer growth. *Molecular oncology* 11, 8, 1050–1064.
- [434] Veenstra, V. L., Garcia-Garijo, A., van Laarhoven, H. W., and Bijlsma, M. F. 2018. Extracellular Influences: Molecular Subclasses and the Microenvironment in Pancreatic Cancer. *Cancers* 10, 2.
- [435] Versaevel, M., Grevesse, T., and Gabriele, S. 2012. Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nature communications* 3, 671.
- [436] Villegas-Pineda, J. C., Garibay-Cerdenares, O. L., Hernández-Ramírez, V. I., Gallardo-Rincón, D., Cantú de León, D., Pérez-Montiel-Gómez, M. D., and Talamás-Rohana, P. 2015. Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer. *Pathology, research and practice* 211, 12, 973–981.
- [437] Vlahakis, A. and Debnath, J. 2017. The Interconnections between Autophagy and Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Journal of molecular biology* 429, 4, 515–530.
- [438] Vokes, S. A., Ji, H., McCuine, S., Tenzen, T., Giles, S., Zhong, S., Longabaugh, W. J. R., Davidson, E. H., Wong, W. H., and McMahon, A. P. 2007. Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development* 134, 10, 1977–1989.
- [439] Vu, V., Bui, P., Eguchi, M., Xu, A., and Sweeney, G. 2013. Globular adiponectin induces LKB1/AMPK-dependent glucose uptake via actin cytoskeleton remodeling. *Journal of molecular endocrinology* 51, 1, 155–165.
- [440] WAITE, M. and WAKIL, S. J. 1962. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XII. Acetyl coenzyme A carboxylase. *The Journal of biological chemistry* 237, 2750–2757.
- [441] Wake, K. 1974. Development of vitamin A-rich lipid droplets in multivesicular bodies of rat liver stellate cells. *The Journal of cell biology* 63, 2 Pt 1, 683–691.
- [442] WAKIL, S. J., Stoops, J. K., and Joshi, V. C. 1983. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annual review of biochemistry* 52, 537–579.
- [443] Wang, B., Fallon, J. F., and Beachy, P. A. 2000. Hedgehog-Regulated Processing of Gli3 Produces an Anterior/Posterior Repressor Gradient in the Developing Vertebrate Limb. *Cell* 100, 4, 423–434.
- [444] Wang, L. and Dynlacht, B. D. 2018. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development (Cambridge, England)* 145, 18.
- [445] Wang, Y., Liu, J., Lin, B., Wang, C., Li, Q., Liu, S., Yan, L., Zhang, S., and Iwamori, M. 2011. Study on the expression and clinical significances of lewis y antigen and integrin  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  in epithelial ovarian tumors. *International journal of molecular sciences* 12, 6, 3409–3421.

- [446] Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology* 8, 6, 519–530.
- [447] Weerasekara, V. K., Panek, D. J., Broadbent, D. G., Mortenson, J. B., Mathis, A. D., Logan, G. N., Prince, J. T., Thomson, D. M., Thompson, J. W., and Andersen, J. L. 2014. Metabolic-stress-induced rearrangement of the 14-3-3 $\zeta$  interactome promotes autophagy via a ULK1- and AMPK-regulated 14-3-3 $\zeta$  interaction with phosphorylated Atg9. *Molecular and Cellular Biology* 34, 24, 4379–4388.
- [448] Wei, M.-Y., Shi, S., Liang, C., Meng, Q.-C., Hua, J., Zhang, Y.-Y., Liu, J., Zhang, B., Xu, J., and Yu, X.-J. 2019. The microbiota and microbiome in pancreatic cancer: more influential than expected. *Molecular cancer* 18, 1, 97.
- [449] Wingo, S. N., Gallardo, T. D., Akbay, E. A., Liang, M.-C., Contreras, C. M., Boren, T., Shimamura, T., Miller, D. S., Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Kwiatkowski, D. J., Schorge, J. O., Wong, K.-K., and Castrillon, D. H. 2009. Somatic LKB1 mutations promote cervical cancer progression. *PLoS one* 4, 4, e5137.
- [450] Winograd-Katz, S. E., Fässler, R., Geiger, B., and Legate, K. R. 2014. The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 4, 273–288.
- [451] Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G. D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology : CB* 13, 22, 2004–2008.
- [452] Woods, D., Cherwinski, H., Venetsanakos, E., Bhat, A., Gysin, S., Humbert, M., Bray, P. F., Saylor, V. L., and McMahon, M. 2001. Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* 21, 9, 3192–3205.
- [453] Wu, F., Zhang, Y., Sun, B., McMahon, A. P., and Wang, Y. 2017. Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy. *Cell chemical biology* 24, 3, 252–280.
- [454] Wu, H.-J., Hao, M., Yeo, S. K., and Guan, J.-L. 2020. FAK signaling in cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell migration and metastasis by exosomal miRNAs-mediated intercellular communication. *Oncogene* 39, 12, 2539–2549.
- [455] Wu, N., Zheng, B., Shaywitz, A., Dagon, Y., Tower, C., Bellinger, G., Shen, C.-H., Wen, J., Asara, J., McGraw, T. E., Kahn, B. B., and Cantley, L. C. 2013. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular cell* 49, 6, 1167–1175.
- [456] Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F. C., Leone, P., Jing, C., Walker, P. A., Haire, L., Eccleston, J. F., Davis, C. T., Martin, S. R., Carling, D., and Gamblin, S. J. 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449, 7161, 496–500.
- [457] Xiao, T., Takagi, J., Coller, B. S., Wang, J.-H., and Springer, T. A. 2004. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 7013, 59–67.
- [458] Xiao, X., Tang, J.-J., Peng, C., Wang, Y., Fu, L., Qiu, Z.-P., Xiong, Y., Yang, L.-F., Cui, H.-W., He, X.-L., Yin, L., Qi, W., Wong, C. C. L., Zhao, Y., Li, B.-L., Qiu, W.-W., and Song, B.-L. 2017. Cholesterol Modification of Smoothed Is Required for Hedgehog Signaling. *Molecular cell* 66, 1, 154-162.e10.

- [459] Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., and Arnaout, M. A. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science (New York, N.Y.)* 294, 5541, 339–345.
- [460] Xu, Q., Liu, X., Zheng, X., Yao, Y., Wang, M., and Liu, Q. 2014. The transcriptional activity of Gli1 is negatively regulated by AMPK through Hedgehog partial agonism in hepatocellular carcinoma. *International journal of molecular medicine* 34, 3, 733–741.
- [461] Xu, Q., Wu, N., Li, X., Guo, C., Li, C., Jiang, B., Wang, H., and Shi, D. 2019. Inhibition of PTP1B blocks pancreatic cancer progression by targeting the PKM2/AMPK/mTOC1 pathway. *Cell death & disease* 10, 12, 874.
- [462] Xu, Z., Pothula, S. P., Wilson, J. S., and Apte, M. V. 2014. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World journal of gastroenterology* 20, 32, 11216–11229.
- [463] Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R. H., Eshleman, J. R., Nowak, M. A., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Iacobuzio-Donahue, C. A. 2010. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467, 7319, 1114–1117.
- [464] Yadav, D. and Lowenfels, A. B. 2013. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144, 6, 1252–1261.
- [465] Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D. E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A. S. W., Mukhopadhyay, S., Lin, E. Y., Parker, S. J., Banh, R. S., Paulo, J. A., Wen, K. W., Debnath, J., Kim, G. E., Mancias, J. D., Fearon, D. T., Perera, R. M., and Kimmelman, A. C. 2020. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 581, 7806, 100–105.
- [466] Yamao, K., Yanagisawa, A., Takahashi, K., Kimura, W., Doi, R., Fukushima, N., Ohike, N., Shimizu, M., Hatori, T., Nobukawa, B., Hifumi, M., Kobayashi, Y., Tobita, K., Tanno, S., Sugiyama, M., Miyasaka, Y., Nakagohri, T., Yamaguchi, T., Hanada, K., Abe, H., Tada, M., Fujita, N., and Tanaka, M. 2011. Clinicopathological features and prognosis of mucinous cystic neoplasm with ovarian-type stroma: a multi-institutional study of the Japan pancreas society. *Pancreas* 40, 1, 67–71.
- [467] Yan, X. and Zhu, X. 2013. Branched F-actin as a negative regulator of cilia formation. *Experimental cell research* 319, 2, 147–151.
- [468] Yan, Y., Zhou, X. E., Xu, H. E., and Melcher, K. 2018. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *International journal of molecular sciences* 19, 11.
- [469] Yang, C.-S., Stampouloglou, E., Kingston, N. M., Zhang, L., Monti, S., and Varelas, X. 2018. Glutamine-utilizing transaminases are a metabolic vulnerability of TAZ/YAP-activated cancer cells. *EMBO Reports* 19, 6.
- [470] Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., and Kimmelman, A. C. 2011. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development* 25, 7, 717–729.
- [471] Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J. C., Rubin, L. L., and Sauvage, F. J. de. 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* 455, 7211, 406–410.

- [472] Yeyati, P. L., Schiller, R., Mali, G., Kasioulis, I., Kawamura, A., Adams, I. R., Playfoot, C., Gilbert, N., van Heyningen, V., Wills, J., Kriegsheim, A. von, Finch, A., Sakai, J., Schofield, C. J., Jackson, I. J., and Mill, P. 2017. KDM3A coordinates actin dynamics with intraflagellar transport to regulate cilia stability. *The Journal of cell biology* 216, 4, 999–1013.
- [473] Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., MAITRA, A., and Depinho, R. A. 2016. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* 30, 4, 355–385.
- [474] Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., Chang, J., Hezel, A. F., Perry, S. R., Hu, J., Gan, B., Xiao, Y., Asara, J. M., Weissleder, R., Wang, Y. A., Chin, L., Cantley, L. C., and Depinho, R. A. 2012. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149, 3, 656–670.
- [475] Yoshioka, T., Otero, J., Chen, Y., Kim, Y.-M., Koutcher, J. A., Satagopan, J., Reuter, V., Carver, B., Stanchina, E. de, Enomoto, K., Greenberg, N. M., Scardino, P. T., Scher, H. I., Sawyers, C. L., and Giancotti, F. G. 2013.  $\beta$ 4 Integrin signaling induces expansion of prostate tumor progenitors. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 2, 682–699.
- [476] Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., and Weidong, C. 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *European journal of pharmacology* 877, 173090.
- [477] Zanutelli, M. R., Goldblatt, Z. E., Miller, J. P., Bordeleau, F., Li, J., VanderBurgh, J. A., Lampi, M. C., King, M. R., and Reinhart-King, C. A. 2018. Regulation of ATP utilization during metastatic cell migration by collagen architecture. *Molecular biology of the cell* 29, 1, 1–9.
- [478] Zhang, D., Wang, W., Sun, X., Xu, D., Wang, C., Zhang, Q., Wang, H., Luo, W., Chen, Y., Chen, H., and Liu, Z. 2016. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy* 12, 9, 1447–1459.
- [479] Zhang, Q., Lou, Y., Zhang, J., Fu, Q., Wei, T., Sun, X., Chen, Q., Yang, J., Bai, X., and Liang, T. 2017. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  promotes tumor progression and has crosstalk with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in pancreatic cancer. *Molecular cancer* 16, 1, 119.
- [480] Zhang, R., Huang, S. Y., Ka-Wai Li, K., Li, Y.-H., Hsu, W.-H., Zhang, G. J., Chang, C.-J., and Yang, J.-Y. 2017. Dual degradation signals destruct GLI1: AMPK inhibits GLI1 through  $\beta$ -TrCP-mediated proteasome degradation. *Oncotarget* 8, 30, 49869–49881.
- [481] Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., and Guan, K.-L. 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development* 21, 21, 2747–2761.
- [482] Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J. D., Wang, C.-Y., Chinnaiyan, A. M., Lai, Z.-C., and Guan, K.-L. 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & development* 22, 14, 1962–1971.

- [483] Zhao, H., Yang, L., Baddour, J., Achreja, A., Bernard, V., Moss, T., Marini, J. C., Tudawe, T., Seviour, E. G., San Lucas, F. A., Alvarez, H., Gupta, S., Maiti, S. N., Cooper, L., Peehl, D., Ram, P. T., MAITRA, A., and Nagrath, D. 2016. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *eLife* 5, e10250.
- [484] Zhao, S., Shi, X., Zhang, Y., Wen, Z., Cai, J., Gao, W., Xu, J., Zheng, Y., Ji, B., Cui, Y., Shi, K., Liu, Y., Li, H., and Jiu, Y. 2020. Myosin-18B Promotes Mechanosensitive CaMKK2-AMPK-VASP Regulation of Contractile Actin Stress Fibers. *iScience* 23, 4, 100975.
- [485] Zhao, X., Gao, S., Ren, H., Sun, W., Zhang, H., Sun, J., Yang, S., and Hao, J. 2014. Hypoxia-inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin-bundling protein fascin. *Cancer research* 74, 9, 2455–2464.
- [486] Zhao, X.-K., Cheng, Y., Liang Cheng, M., Yu, L., Mu, M., Li, H., Liu, Y., Zhang, B., Yao, Y., Guo, H., Wang, R., and Zhang, Q. 2016. Focal Adhesion Kinase Regulates Fibroblast Migration via Integrin beta-1 and Plays a Central Role in Fibrosis. *Scientific reports* 6, 19276.
- [487] Zhao, Y., Wang, Q., Qiu, G., Zhou, S., Jing, Z., Wang, J., Wang, W., Cao, J., Han, K., Cheng, Q., Shen, B., Chen, Y., Zhang, W. J., Ma, Y., and Zhang, J. 2015. RACK1 Promotes Autophagy by Enhancing the Atg14L-Beclin 1-Vps34-Vps15 Complex Formation upon Phosphorylation by AMPK. *Cell Reports* 13, 7, 1407–1417.
- [488] Zheng, J., Guinter, M. A., Merchant, A. T., Wirth, M. D., Zhang, J., Stolzenberg-Solomon, R. Z., and Steck, S. E. 2017. Dietary patterns and risk of pancreatic cancer: a systematic review. *Nutrition Reviews* 75, 11, 883–908.
- [489] Zheng, X., Han, H., Liu, G.-P., Ma, Y.-X., Pan, R.-L., Sang, L.-J., Li, R.-H., Yang, L.-J., Marks, J. R., Wang, W., and Lin, A. 2017. LncRNA wires up Hippo and Hedgehog signaling to reprogramme glucose metabolism. *The EMBO journal* 36, 22, 3325–3335.

## 8. Verzeichnisse

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Die genetischen Veränderungen während der Entwicklung von PanINs zu PDAC.....	5
<b>Abbildung 2:</b> Die Struktur der AMP-Kinase .....	17
<b>Abbildung 3:</b> Die unterschiedlichen Varianten der Autophagie .....	23
<b>Abbildung 4:</b> Der Aufbau von fokalen Adhäsionen .....	26
<b>Abbildung 5:</b> Die Aktivierung des kanonischen Hh-Signalwegs.....	34
<b>Abbildung 6:</b> Der Aufbau eines Western-Blot .....	69
<b>Abbildung 7:</b> Die Veränderung der Fibroblasten-Morphologie durch die Untergrundhärte .....	74
<b>Abbildung 8:</b> Der geringe Einfluss der Untergrundhärte auf den Hh-Signalweg.....	76
<b>Abbildung 9:</b> Der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf den Hh-Signalweg .....	78
<b>Abbildung 10:</b> Längere Primärzilien in Zellen auf hartem Untergrund.....	79
<b>Abbildung 11:</b> Eine erhöhte AMPK-Proteinexpression in Mausfibroblasten auf hartem Untergrund.....	80
<b>Abbildung 12:</b> Die Funktionalität des AMPK-Proteins in Fibroblasten auf weichem oder hartem Untergrund.....	83
<b>Abbildung 13:</b> Der Einfluss der Untergrundhärte auf die p-ACC-Proteinexpression ..	84
<b>Abbildung 14:</b> Der Einfluss des Primärziliums auf die Proteinmenge von AMPK und mTOR.....	85
<b>Abbildung 15:</b> Der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Proteinmenge von AMPK oder mTOR.....	86
<b>Abbildung 16:</b> Der Einfluss von YAP/TAZ auf die Proteinexpression von AMPK und mTOR.....	88
<b>Abbildung 17:</b> Der Einfluss von MKL1 auf die AMPK-Proteinmenge .....	89
<b>Abbildung 18:</b> Die Stabilisierung des AMPK-Proteins in Zellen auf hartem Untergrund .....	90
<b>Abbildung 19:</b> Die Stabilisierung der AMPK über Itg $\alpha$ V .....	92
<b>Abbildung 20:</b> Die Reduktion der AMPK-Proteinexpression in Mausfibroblasten durch einen Itg $\alpha$ V-Inhibitor.....	94
<b>Abbildung 21:</b> Die Stabilisierung von AMPK über FAK.....	95
<b>Abbildung 22:</b> Die Reduktion der AMPK-Proteinmenge in Mausfibroblasten durch einen FAK-Inhibitor .....	96
<b>Abbildung 23:</b> Die Stabilisierung der AMPK über Itg $\alpha$ V und FAK in Zellen auf weicher und auf harter Gelmatrix .....	97

**Abbildung 24:** Die Kolokalisation von Prkaa1-GFP und p-Paxillin/Paxillin ..... 99

**Abbildung 25:** Die Lokalisation von Prkaa1-GFP in punktaktigen Strukturen unter harten Bedingungen ..... 100

**Abbildung 26:** Der Hh-Signalweg in der isolierten Primärzelllinie mCAF1 ..... 101

**Abbildung 27:** Die Veränderung der PSC-Morphologie durch die Untergrundhärte . 103

**Abbildung 28:** Eine erhöhte AMPK-Proteinexpression in PSCs auf hartem Untergrund ..... 104

**Abbildung 29:** Die Stabilisierung von AMPK über ItgaV und FAK in PSCs ..... 105

**Abbildung 30:** Die Korrelation zwischen der erhöhten ItgaV-Proteinmenge in stromareicher Umgebung und der PDAC-Mortalitätsrate ..... 106

**Abbildung 31:** Eine erhöhte LC3-Proteinexpression in PSCs auf hartem Untergrund ..... 108

**Abbildung 32:** Test der Immunfluoreszenzfärbung von LC3 und Definition eines Cutoffs ..... 109

**Abbildung 33:** Die Verstärkung der Autophagierate in Zellen auf festem Untergrund ..... 110

**Abbildung 34:** Die Förderung des Tumorwachstums durch PSCs ..... 112

**Abbildung 35:** Die Förderung des Tumorwachstums durch erhöhte Autophagie in PSCs ..... 113

**Abbildung 36:** Der Einfluss des mPSC4-*ItgaV*-Knockout-(KO)-Klon auf das Tumorzellwachstum ..... 114

**Abbildung 37:** Ein erhöhtes Tumorwachstum *in vivo* über die *ItgaV*-Signalkaskade in PSCs ..... 115

**Abbildung 38:** Der Einfluss von Alanin auf das Wachstum der Tumorzellen in Ko-Kultur mit PSCs ..... 117

**Abbildung 39:** Der Einfluss der Untergrundhärte auf das Überleben von PSC ..... 118

**Abbildung 40:** Schematische Darstellung des erhöhtem Tumorzellwachstums induziert durch verstärkte Gewebehärte..... 135

## 8.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Inhibitoren und weitere Substanzen.....	44
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Plasmide.....	49
<b>Tabelle 3:</b> Standard Zelllinien.....	50
<b>Tabelle 4:</b> Stabile Zelllinien.....	50
<b>Tabelle 5:</b> Primerliste für Sequenzierung und Klonierung.....	50
<b>Tabelle 6:</b> Primerliste für RT-qPCR.....	51
<b>Tabelle 7:</b> siRNA-Liste.....	52
<b>Tabelle 8:</b> Primärantikörper.....	55
<b>Tabelle 9:</b> Sekundärantikörper.....	56

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

#### Präfixe

k	Kilo-	$10^3$
c	Centi-	$10^{-2}$
m	Milli-	$10^{-3}$
$\mu$	Mikro-	$10^{-6}$
n	Nano-	$10^{-9}$
%	Prozent (pro 100)	
°C	Grad Celsius	
A	Ampere	
Da	Dalton	
g	Gramm	
h	Stunde	
l	Liter	
m	Meter	
M	mol/l	
min	Minute	
mol	Mol	
rpm	<i>revolutions per minute</i>	
s	Sekunde	
U	Unit	
V	Volt	
v/v	<i>volume per volume</i>	
W	Watt	
w/v	<i>weight per volume</i>	
xg	Erdbeschleunigung, $9,81 \text{ ms}^{-2}$	

#### Aminosäuren

Ala	Alanin	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E

Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Sonstige Abkürzungen

4EBP	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein</i>
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ACLY	<i>ATP-citrate synthase</i>
AcTub	acetyliertes Tubulin
ADEX	<i>abberantly differnetiated endocrine exocrine</i>
ADM	<i>acinar-to-ductal metaplasia</i>
AF	Alexa Fluor
AID	<i>autoinhibitory domain</i>
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
AMP	<i>adenosine monophosphate</i>
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP	alkalischer Phosphatase
apCAF	<i>antigen-presenting CAF</i>
ApE	<i>a plasmid editor</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arl13B	<i>ADP-ribosylation factor-like protein 13B</i>
ARP	<i>actin related protein</i>
AS	Aminosäure
as	<i>antisense</i>
ATCC	American Type Culture Collection

ATG	<i>autophagy-related</i>
ATGL	<i>adipose triglyceride lipase</i>
ATP	<i>adenosin triphosphate</i>
AU	Australien
AVIL	Advillin
Baf. A1	Bafilomycin A1
BC	<i>bent closed</i>
BE	Belgien
BOC	<i>brother of CDO</i>
bp	Basenpaar
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BROMI	<i>broad-minded</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium 2+
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAF	<i>cancer associated fibroblast</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CAMKK	<i>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
cAMP	<i>cyclic AMP</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CBM	<i>carbohydrate binding module</i>
CBS	<i>cystathionine β-synthetase</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDO	<i>CAM-related/downregulated by oncogenes</i>
CEP164	<i>centrosomal protein 164</i>
Cfl	Cofilin
CIDEA	<i>cell death-inducing DFFA-like effector a</i>
CK1	<i>casein kinase 1</i>
Cl	Chlorid
CLS	<i>ciliary localization sequences</i>
CLS	Cell Lines Services
CMA	<i>chaperone-mediated autophagy</i>
CO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
CoA	<i>coenzyme A</i>

Con	<i>control</i>
COPII	<i>coat protein complex II</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CST	Cell Signaling Technology
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Deutschland
DFFA	<i>DNA fragmentation factor subunit alpha</i>
DHH	<i>desert hedgehog</i>
DLG5	<i>discs large homolog 5</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DRP1	<i>dynamamin-related protein 1</i>
ds	<i>double stranded</i>
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>extended closed</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
EM	Transmissionselektronenmikroskop
EMT	<i>epithelial–mesenchymal transition</i>
EO	<i>extended opened</i>
ER	endoplastmatisches Retikulum
ERBB	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i>
et al.	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum) oder et alia (Neutrum)
etc.	<i>et cetera</i>
EV	extrazelluläre Vesikel
EVC	<i>Ellis-van Creveld syndrome protein</i>
FA	fokale Adäsionen
FAK	fokale Adhäsionskinase

---

FCS	fötales Kälberserum
FIP200	<i>focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD</i>
FOLFIRINOX	Fluorouracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin
For	<i>forward</i>
FOXO	<i>forkhead-box-protein O</i>
G1	Gap-1
GAS1	<i>growth arrest-specific 1</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
GLI	<i>glioma-associated oncogene homolog</i>
GLUD1	<i>glutamate dehydrogenase 1</i>
GLUT	<i>glucose transporter</i>
GNAS	<i>guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating activity</i>
GOT1	<i>aspartate aminotransferase</i>
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
GPR161	<i>G-protein coupled receptor 161</i>
G-protein	<i>guanine nucleotide-binding protein</i>
GSK3 $\beta$	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GSN	Gelsolin
GTP	<i>guanosine-5'-triphosphate</i>
GYS	<i>glycogen synthase</i>
h	<i>human</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCl	Salzsäure
HDAC5	<i>histon-deacetylase 5</i>
HF	<i>high fidelity</i>
Hh	<i>hedgehog</i>
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HMG	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl
HMGCR	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase</i>
HOPS	<i>homotypic fusion and protein sorting</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>hepatic stellate cell</i>
HSP70	<i>heat shock protein 70</i>
Hygro	Hygromycin

---

i.d.R.	in der Regel
iCAF	<i>inflammatory CAF</i>
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFT	Intraflagellar transport
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IHH	<i>indian hedgehog</i>
IL	Interleukin
Ilk	<i>integrin linked kinase</i>
IPMN	<i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i>
Itg	Integrin
ITGAV	Integrin $\alpha V$
ITPN	<i>intraductal tubular papillary neoplasm</i>
JAK	<i>janus kinase</i>
JP	Japan
KIF	<i>kinesin-like protein</i>
KIF3A	<i>kinesin family member 3A</i>
KO	Knockout
KPC	K-ras LSL.G12D/+; Trp53R172H/+; Pdx-1-Cre
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
LAMP2A	<i>lysosome-associated membrane protein 2A</i>
LATS1/2	<i>large tumor suppressor kinase 1/2</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC3	<i>light chain 3</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LED	<i>light-emitting diode</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LINK	<i>linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
LKB1	<i>liver kinase B1</i>
Luc	Luciferase
M	Metastasen
m	<i>mouse</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCN	<i>mucinous cystic neoplasm</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Mdm2	<i>murine double minute-2</i>

MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MEK1/2	<i>MAP kinase/ERK kinase</i>
MFF	<i>mitochondrial fission factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIDAS	<i>ligand-binding metal ion-dependent adhesion site</i>
MIM	<i>missing in metastasis</i>
MKL1	<i>megakaryoblastic leukemia 1</i>
mLST8	<i>mammalian lethal with Sec13 protein 8</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MRI	Magnetresonanztomographie
MST1/2	<i>macrophage stimulating 1/2</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
myCAF	<i>myofibroblast-like CAF</i>
N	Lymphknoten
NA	<i>nascent adhesions</i>
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NL	Niederlande
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NRF-1	<i>nuclear respiratory factor-1</i>
p	phospho
P/S	Penicillin-Streptomycin
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIN	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PAS	<i>pre-autophagosomal structure</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDE4	Phosphodiesterase 4
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PEI	Polyethylenimin
PEST	Prolin, Gluamat, Serin und Threonin
PFK	Phosphofruktokinase
PFKFB3	<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase 3</i>
Pfn	Profilin

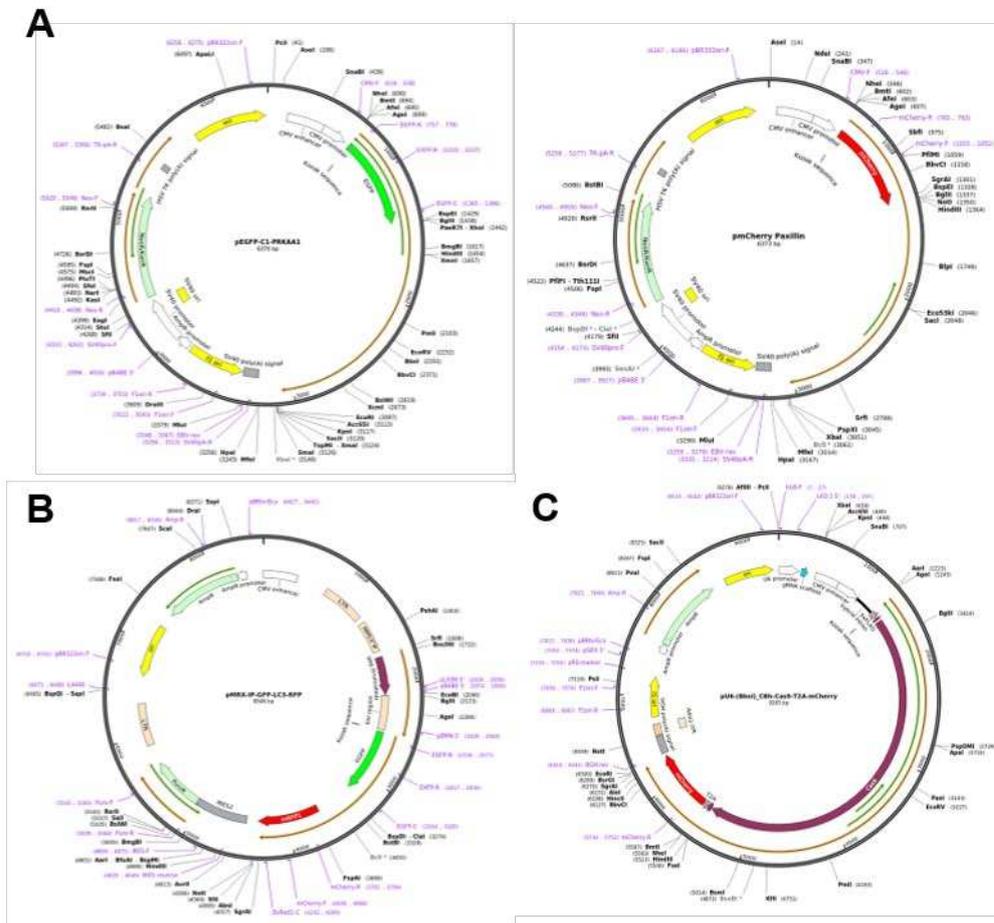
PGC1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator 1<math>\alpha</math></i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
PI(3)P	<i>class III phosphatidylinositol 3-phosphate</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIKK	<i>phosphatidylinositol kinase-related kinase</i>
PKA	<i>protein kinase A</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
PLEKHM1	<i>pleckstrin homology domain containing protein family member 1</i>
PRKAA	<i>protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha</i>
PSC	<i>pancreatic stellate cell</i>
PTCH	Patched
Ptk2	<i>protein tyrosine kinase 2</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAB	<i>Ras-associated binding</i>
RAC1	<i>Rac family small GTPase 1</i>
RACK1	<i>receptor of activated protein C kinase 1</i>
RAG	<i>recombination-activating genes</i>
RAPTOR	<i>regulatory protein associated with mTOR</i>
rel.	relativ
RFP	<i>red fluorescence protein</i>
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan mediated motility</i>
RHEB	<i>RAS homolog enriched in brain</i>
RICTOR	<i>rapamycin insensitive companion of mTOR</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rnd3	<i>Rho family GTPase 3</i>
ROCK	<i>Rho-associated coiled-coil kinase</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction</i>
s	<i>sense</i>
S6K1	<i>ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
SAG	Smoothened Agonist
SANT	Smoothened Antagonist
SD	Standardabweichung
SDF	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>

SGK	<i>serum/glucocorticoid-regulated kinase</i>
SHH	<i>sonic Hedgehog</i>
SHHL2	<i>sonic hedgehog light 2</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIRT1	Sirtuin-1
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SMO	Smoothened
SOC	<i>super optimal broth</i>
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SPOCK1	<i>SPARC/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SUFU	<i>suppressor of fused homolog</i>
T	Tumor
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i>
TAN	<i>tumor-associated neutrophils</i>
TAZ	<i>transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEAD	TEA Domäne
TEF	<i>transcription enhancer factor</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIAM1	<i>T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1</i>
TIL	<i>tumour-infiltrated lymphocytes</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
Treg	regulatorische T-Zellen
TRK	Tropomyosin receptor kinase
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
UE	Untereinheit
UK	Vereinigtes Königreich
ULK	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
v. Chr	vor Christus

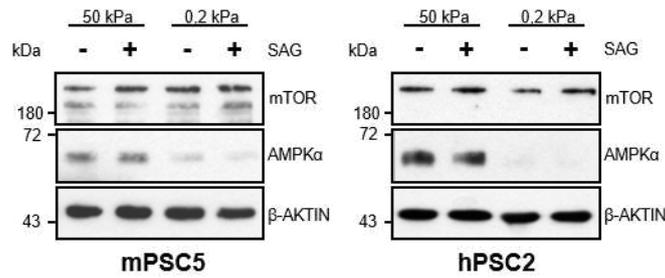
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
YAP	<i>yes-associated protein 1</i>
$\alpha$	alpha
$\alpha$ -Domäne	<i><math>\alpha</math> inserted Domäne</i>
$\beta$	beta
$\beta$ -TrCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
$\gamma$	gamma
$\kappa$	kappa

# 9. Anhang

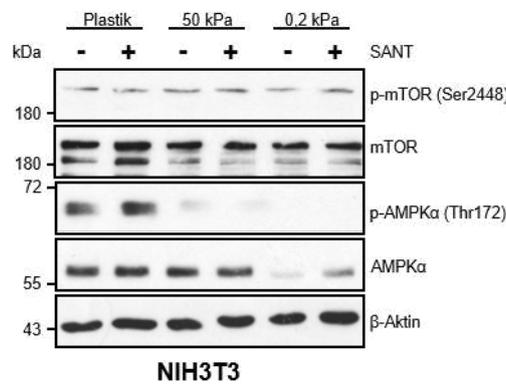
## 9.1 Ergänzende Abbildungen



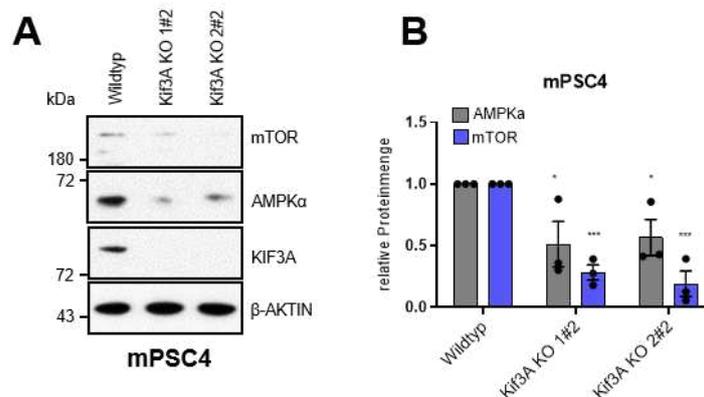
**Abbildung E1: Plasmidkarten.** (A) Gezeigt ist die schematische Darstellung der Plasmide Prkaa1-GFP und mCherry-Paxillin für die Immunfluoreszenzfärbung in NIH3T3-Fibroblasten. (B) Gezeigt ist die schematische Darstellung des Plasmids GFP-LC3 für die Immunfluoreszenzfärbung in NIH3T3-Fibroblasten. (C) Gezeigt ist die schematische Darstellung des Plasmids pU6-Cas9 für den ItgαV-Knockout in mPSC4 Zellen.



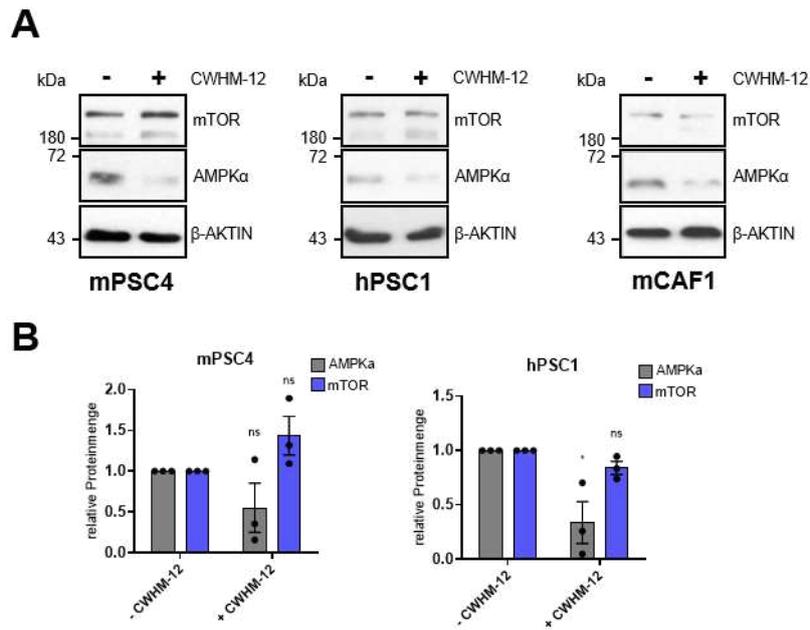
**Abbildung E2: Der Einfluss der Untergrundhärte auf die AMPK-Proteinmenge in PSCs.** PSCs wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät und 48 h in 0,5 % FCS DMEM kultiviert. Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der AMPK- und mTOR-Proteinmenge in mPSC5 und hPSC2 durchgeführt,  $\beta$ -AKTIN diene als Ladekontrolle.



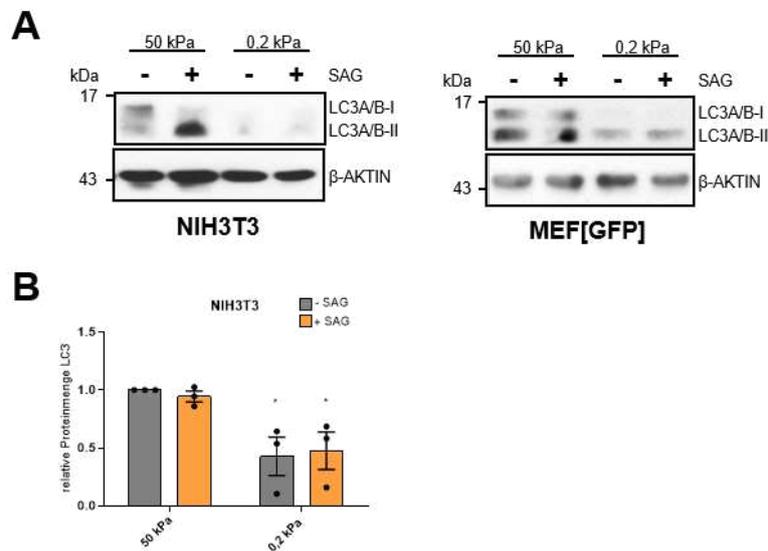
**Abbildung E3: Der Einfluss von SANT auf die Aktivierung der AMPK.** NIH3T3-Fibroblasten wurden auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix ausgesät und für 48 h mit SANT (0,2  $\mu$ M) in 0,5 % FCS DMEM kultiviert. Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von p-AMPK (Thr172) und p-mTOR (Ser2448) durchgeführt,  $\beta$ -AKTIN diene als Ladekontrolle.



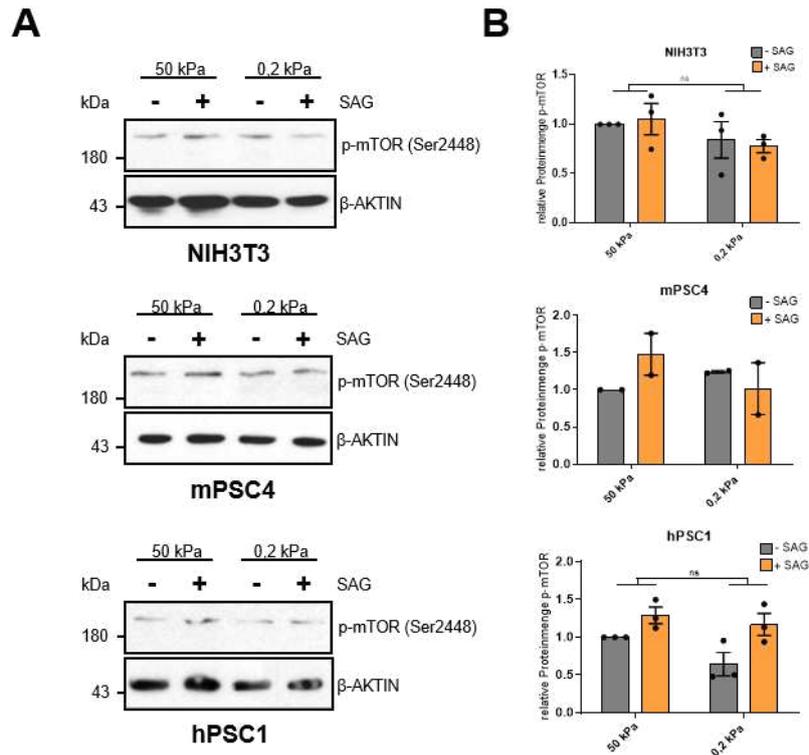
**Abbildung E4: Der Einfluss des Primärziliums auf AMPK und mTOR in PSCs.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion der AMPK- und mTOR-Proteinexpression in Wildtyp-mPSC4 und Kif3A-Knockout-Klonen, kultiviert für 48 h in 0,5 % FCS DMEM, durchgeführt,  $\beta$ -AKTIN diene als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.



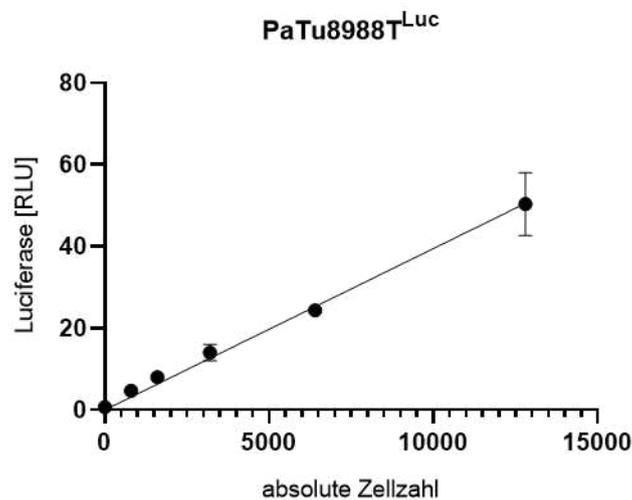
**Abbildung E5: Die Reduktion der AMPK-Proteinexpression durch den ItgαV-Inhibitor CWHM-12 in PSC und primären Pankreasfibroblasten.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von AMPK und mTOR in mPSC4, hPSC1 und mCAF1 nach 16 h Behandlung mit CWHM-12 (0,5 µM) durchgeführt, β-AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD.



**Abbildung E6: Erhöhte LC3-Proteinexpression in Fibroblasten auf festem Untergrund.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von LC3 in NIH3T3 und MEF[GFP] ausgesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix und behandelt mit SAG (100 nM) für 48 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeführt, β-AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten ± SD.



**Abbildung E7: Der Einfluss des Härtegrads auf die p-mTOR-Proteinexpression.** (A) Es wurde ein Western-Blot zur Detektion von p-mTOR (Ser2448) in NIH3T3, mPSC4 und hPSC1 ausgesät auf weicher (0,2 kPa) und harter (50 kPa) Gelmatrix und behandelt mit SAG (100 nM) für 48 h in 0,5 % FCS DMEM durchgeföhrt,  $\beta$ -AKTIN diente als Ladekontrolle. (B) Dargestellt ist der Mittelwert der Quantifizierung von n = 3 (NIH3T3, hPSC1) und n = 2 (mPSC4) unabhängigen, wie in (A) gezeigten Experimenten  $\pm$  SD.



**Abbildung E8: Der lineare Anstieg der Menge an Luciferase im Verhältnis zur PaTu8988T<sup>Luc</sup>-Zellzahl.** Zur Kontrolle der generierten PaTu8988T<sup>Luc</sup>-Zelllinie wurden Luciferase-Assays zur Messung des Verhältnisses der Luciferase zur absoluten Zellzahl durchgeföhrt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD einer Durchföhrtung des Experiments gemessen als Triplikat.

## **9.2 Lebenslauf**

Die Seite 195 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

### **9.3 Verzeichnis der akademischen Lehre**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Erlangen:

Backert, Biesinger-Zwosta, Böckmann, Brandstätter, Brettreich, Burkovski, Busch, Dietrich, Drewello, Feigenspan, Gramberg, Herzog, Hofmann, Jäck, Kießling, Klebl, Klingler, Koch, Kost, Kreimer, Lamm, Lebert, Nimmerjahn, Nitschke, Richard, Rübsam, Schambony, Schmidl, Schoppmeier, Schubert, Slany, Sonnewald, Stadler, Sutter, Tegtmeyer, Thoma-Kress, Winkler, Winterpacht

## 9.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und mich bei all den Menschen zu bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Matthias Lauth, welcher mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Er hat mir nicht nur ein sehr spannendes Promotionsthema überlassen, sondern mich jeden Tag vor neue und interessante Herausforderungen gestellt. Ich habe in den letzten Jahren vieles gelernt und bin sehr dankbar für die intensive Betreuung und Unterstützung in dieser Zeit. Nicht nur die anregenden Diskussionen werden mir in Erinnerung bleiben, sondern auch die motivierenden Gespräche, welche mir geholfen haben bis zum Ende durchzuhalten.

Anschließend möchte ich mich auch noch bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken: Dr. Rajeev Singh, Anke Koeniger, Dr. Ilya Galperin, Maximillian Nischak, Pascale Happel, Dagmar Leder, Avanee Ketkar, Sami Matrood und Dr. Anna Brichkina. Ihr habt mir nicht nur durch fachspezifische Diskussionen und Hilfestellungen bei der Etablierung neuer Methoden geholfen, sondern auch dafür gesorgt, dass selbst die stressigsten Tage noch mit einem Lächeln beendet werden konnten. Unsere Philosophie: „Selbst wenn du viele Rückschläge einstecken musst, irgendwann bleibt dir nichts anders übrig als einfach zu lachen.“ werde ich auf jeden Fall beibehalten. Des Weiteren möchte ich auch noch dem gesamten 3.Stock des ZTI meinen Dank aussprechen. Ohne eure Unterstützung und Hilfsbereitschaft hätte ich viele Probleme vermutlich nicht lösen können. Es war beruhigend zu wissen, dass man auf den Fluren immer ein offenes Ohr finden würde.

Ein sehr großer Dank gilt natürlich auch meiner Familie, meinen Geschwistern und meinen Eltern. Sie waren eine große Hilfe und Unterstützung in den letzten drei Jahren und haben mir einen Ausgleich zu dem stressigen Laboralltag gegeben. Auch während der Zeit des Schreibens haben sie mir geholfen nicht aufzugeben, sondern die Promotion erfolgreich abzuschließen.

### 9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Pankreatische Sternzellen induzieren Tumorzellwachstum in verhärtetem Gewebe über AMPK im Institut für Tumor- und Immunbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Matthias Lauth ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen eingereicht:

Hupfer, A. *et al.*, 2021. Matrix stiffness drives stromal autophagy and promotes formation of a pro-tumorigenic niche. (submitted)

**Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin/Doktorand**

---

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

**Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent**

---