

Aus der Klinik für Innere Medizin  
Zentrum für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Thomas M. Gress  
des Fachbereiches Medizin der Philipps Universität Marburg

Parallelisierte und individualisierte funktionelle  
Charakterisierung von ausgewählten Kandidatengenomen im  
Pankreaskarzinom

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades rerum naturalium  
dem Fachbereich der Biologie der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von

**Tatjana Honstein**

aus Workuta

Marburg, November 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am 12. November 2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Philipps-  
Universität Marburg

Dekan: Professor Dr. Helmut Schäfer

Referent:

PD Dr. Malte Buchholz

1. Korreferent:

Dr. Matthias Lauth

Widmung

*Für meine außergewöhnlichen Eltern.*

# Inhaltsverzeichnis

|   |            |
|---|------------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>   | <b>III</b> |
| <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>Summary .....</b>  | <b>VII</b> |
| <b>1. Einleitung .....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 Das Pankreaskarzinom.....   | 1          |
| 1.1.1 Epidemiologie & Ätiologie .....   | 1          |
| 1.1.2 Klassifikation und Pathogenese.....   | 3          |
| 1.1.3 Molekulare Mechanismen .....  | 6          |
| 2.1 Die Hochdurchsatzanalysen.....  | 9          |
| 2.1.1 Molekularbiologische Hochdurchsatzverfahren.....  | 9          |
| 2.1.2 Technik des revers transkribierten <i>Microarrays</i> (Zaiuddin und Sabatini 2001)..... | 11         |
| 2.1.3 Identifikation neuer Kandidaten via <i>Kinome-wide Screening</i> .....                  | 12         |
| 3.1 Die Kandidatengene.....   | 14         |
| 3.1.1 Der Kandidat <i>ADRBK1</i> .....  | 14         |
| 3.1.2 Der Kandidat <i>TTK</i> .....   | 18         |
| 3.2 Zielsetzung .....   | 22         |
| <b>2. Material .....</b>  | <b>23</b>  |
| 2.1 Biologisches Material .....   | 23         |
| 2.1.1 Eukaryotische Zellen .....  | 23         |
| 2.1.2 Prokaryotische Zellen .....   | 23         |
| 2.1.3 Gewebe .....  | 24         |
| 2.1.4 Enzyme .....  | 24         |
| 2.1.5 Antibiotika .....   | 24         |
| 2.1.6 Antikörper.....   | 24         |
| 2.2 Chemikalien .....   | 26         |
| 2.3 Verbrauchsmaterial .....  | 28         |
| 2.4 Medien, Puffer und Rezepturen .....   | 30         |
| 2.5 Kits.....   | 32         |
| 2.6 Geräte.....   | 32         |
| 2.7 Gentechnische Elemente.....   | 34         |
| 2.7.1 Primer & Oligo_dT.....  | 34         |
| 2.7.2 <i>small interfering</i> RNS-Sequenzen.....   | 34         |
| 2.8 Software .....  | 35         |
| <b>3. Methoden.....</b>   | <b>36</b>  |
| 3.1 Zellkultur .....  | 36         |
| 3.1.1 Zellkultivierung .....  | 36         |
| 3.1.2 Zellen auftauen .....   | 36         |
| 3.1.3 Kryokonservierung .....   | 36         |
| 3.1.4 Zellzahlbestimmung .....  | 36         |
| 3.1.5 Mykoplasmentest.....  | 37         |
| 3.1.6 Transfektion mit Lipofectamine® 2000 .....  | 37         |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.7 Transfektion mit siLentFect™.....   | 37        |
| <b>3.2 Funktionelle Analysen .....</b>  | <b>38</b> |
| 3.2.1 Zellviabilitätstest (Mossmann 1983).....  | 38        |
| 3.2.2 Zellproliferations-ELISA (Portsmann und Ternynck 1985).....   | 39        |
| 3.2.3 Softagar-Kolonie-Bildung-Test.....  | 39        |
| 3.2.4 <i>Time Lapse</i> Analyse .....   | 40        |
| <b>3.3 Proteinchemie .....</b>  | <b>40</b> |
| 3.3.1 Proteinernte & Messung.....   | 40        |
| 3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) .....   | 41        |
| 3.3.3 Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....                             | 41        |
| 3.3.4 Protein- & Immunoblot .....   | 41        |
| <b>3.4 Durchflusszytometrie.....</b>  | <b>42</b> |
| 3.4.1 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse .....   | 42        |
| 3.4.2 Durchflusszytometrische Apoptosedetektion .....   | 43        |
| <b>3.5 Molekularbiologische Methoden.....</b>   | <b>43</b> |
| 3.5.1 RNS-Präparation aus Zellen mit peqGOLD Total RNS Kit®.....  | 43        |
| 3.5.2 RNS-Präparation aus Gewebe mit dem <i>QIAzol® Lysis Reagent</i> .....                               | 44        |
| 3.5.3 cDNS-Synthese mittels Omniscript® Reverse Transcription Kit .....                                   | 44        |
| 3.5.4 Isolierung von Plasmid-DNS mit <i>NucleoBond® Xtra Midi &amp; Maxi</i> .....                        | 45        |
| 3.5.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....   | 45        |
| 3.5.6 Herstellung kompetenter Bakterien der <i>E. coli</i> Stämme TOP10, XL1Blue, DH5á .....              | 46        |
| 3.5.7 Transformation kompetenter Bakterien (Kushner, Boyer und Nicosia 1978) .....                        | 46        |
| <b>3.6 Hochdurchsatzverfahren .....</b>   | <b>46</b> |
| 3.6.1 Herstellung der <i>reverse transfection microarrays</i> (Zaiuddin und Sabatini 2001) .....          | 46        |
| 3.6.2 Immunzytologie.....   | 48        |
| <b>3.7 Statistische Anwendungen.....</b>  | <b>49</b> |
| <b>4. Ergebnisse .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4.1 Hochdurchsatzanalysen .....</b>  | <b>51</b> |
| 4.1.1 Serielle Lokalisationsbestimmungen.....   | 51        |
| 4.1.3 Validierung der reversen Transfektion und Untersuchung der PaCa/Net-Gene.....                       | 56        |
| 4.1.4 Bestimmung der Repressionseffekte .....   | 59        |
| 4.1.5 Auswahl der Gene für die Einzelcharakterisierung .....  | 60        |
| <b>4.2 <i>ADRBK1</i>-Einzelgencharakterisierung .....</b>   | <b>62</b> |
| 4.2.1 Expressionsmuster in humanem Gewebe und Modellzelllinien.....                                       | 62        |
| 4.2.2 <i>ADRBK1</i> -Repression .....   | 66        |
| 4.2.3 <i>ADRBK1</i> -Einfluss auf das Zellwachstum & Viabilität.....                                      | 68        |
| 4.2.4 Keine Detektion von <i>ADRBK1</i> -abhängiger Apoptoseinduktion .....                               | 74        |
| 4.2.5 Durchflusszytometrische Identifikation des proliferativen Phänotyps in Pankreaskarzinomzellen ..... | 76        |
| <b>4.3 <i>TTK</i>-Einzelgencharakterisierung .....</b>  | <b>78</b> |
| 4.3.1 Kinom-weites <i>Screening</i> identifiziert <i>TTK</i> als neuen potentiellen Kandidaten.....       | 78        |
| 4.3.2 Spezifische <i>TTK</i> -Expression in humanem Pankreasgewebe .....                                  | 79        |
| 4.3.3 <i>TTK</i> -Repressionskontrolle .....  | 79        |
| 4.3.4 Einfluss von <i>TTK</i> auf die Zellproliferation .....   | 81        |
| 4.3.5 Zellviabilität in Abhängigkeit des <i>TTK</i> -Expressionsniveaus.....                              | 82        |
| 4.3.6 <i>TTK</i> -knockdown-abhängige Apoptoseinduktion in Tumorzelllinien .....                          | 84        |
| 4.3.7 <i>TTK</i> beeinflusst die genomische Stabilität der Tumorzelllinien.....                           | 86        |
| 4.3.6 <i>TTK</i> -Einfluss auf das substratunabhängige Wachstum der Tumorzelllinien .....                 | 87        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.3.7 Zellmotilitätmessung nach <i>TTK-knock down</i> .....                                | 88         |
| <b>5. Diskussion.....</b>  | <b>90</b>  |
| 5.1 Hochdurchsatzanalysen in Form von reverser Transfektion .....                          | 90         |
| 5.2 Der Hochdurchsatzkandidat <i>ADRBK1</i> .....  | 92         |
| 5.3 Onkogenes Potenzial der dualspezifischen Kinase <i>TTK</i> im<br>Pankreaskarzinom..... | 94         |
| <b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>7. Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>103</b> |
| <b>8. Anhang.....</b>  | <b>116</b> |
| <b>9. Danksagung.....</b>  | <b>139</b> |
| <b>10. Angaben der Dissertationsverordnung .....</b>                                       | <b>140</b> |
| 10.1 Verzeichnis akademischer Lehrer .....   | 140        |
| 10.2 Ehrenwörtliche Erklärung.....   | 141        |

## Zusammenfassung

Das duktales Pankreasadenokarzinom gehört mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von <3% und mittlerer Überlebenszeit von ca. 6 Monaten nach Diagnosestellung zu den tödlichsten Tumorerkrankungen weltweit. Die Vielfalt an Risikofaktoren sowie genetische Heterogenität der Pankreasneoplasien als auch die schlechten Prognosen, die ebenfalls mangelnden Therapieansätze und die hohen Mortalitätsraten zeigen auf, dass die grundlegenden Mechanismen dieser Erkrankung noch nicht ausreichend aufgeklärt sind. Beruhend auf früheren Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte ein Kollektiv von 79 Kandidatengen mit einem spezifischen Expressionsmuster im Pankreastumorgewebe identifiziert werden. Um den Zeit- und Kostenaufwand für die Einzelgenanalyse der 79 Kandidaten zu minimieren, wurde die Methode der reversen Transfektion als eine adäquate Option ausgewählt. Die *reverse transfection microarrays* erlaubten die parallele Untersuchung einer großen Anzahl an Genen, mit der Möglichkeit zur Klärung der physiologischen Genfunktion und weiteren Eigenschaften der Genprodukte. Zusammenfassend ergab sich nach der Validierung eine Auswahl von 11 aus anfänglich 79 Kandidaten zur Einzelgencharakterisierung. Ein selektiertes Kandidatengenes des *reverse transfection screening* ist die im Pankreaskarzinom überexprimierte G-Protein-gekoppelte Kinase-2 (GRK2, a.k.a. ADRBK1). Unsere tiefgehenden Einzelgenanalysen zeigten einen proliferativen und zellzyklusmodulierenden Phänotyp dieses Kandidatengens.

Ein zweiter systematischer Ansatz zur Identifikation neuer Kandidatengene umfasste das gesamte humane Kinom. Eine der *Ambion® Silencer® Select kinom-wide* siRNA Bibliothek wurde verwendet, um in vollautomatisiertem Format sowohl in der transformierten Panc1-Zelllinie als auch in nicht-transformierten Hek293-Zellen die Kinasen einzeln herunter zu regulieren und anschließend einen Apoptoseassay durchzuführen. Diese kinomweite Untersuchung identifizierte *TTK* als eine in transformierten Zellen repressionsabhängig apoptoseinduzierende Kinase. Die anfängliche Überprüfung der Expression in humanem Gewebe bestätigte eine signifikante pankreastumorspezifische Dysregulation der *TTK*-Expression. Unsere Resultate der Viabilitätsprüfung, die eine signifikante Reduktion lebender Zellen in Abhängigkeit der *TTK*-Expression in Tumorzelllinien belegen und sowohl via Immunoblotnachweise als auch mittels durchflusszytometrischen Analysen eine Apoptoseinduktion belegen, verdeutlichen eine pro-tumorigene Funktion von *TTK*. Darüber hinaus konnte ebenfalls ein Einfluss auf die genomische Stabilität in Tumorzellen sowie eine signifikante Reduktion des substratunabhängigen Wachstums von Tumorzellen in Abwesenheit der *TTK*-Expression nachgewiesen werden.

## Summary

Pancreatic adenocarcinoma is one of the deadliest cancers with an overall 5-year survival rate of <3% and average survival time of 6 months. The poor patient prognosis illustrates the fact that the basic mechanisms of pancreatic cancer disease are not well understood to date. Based on the data of previously performed high-throughput analyses, 79 candidate genes were identified having a high probability to be of biological relevance or to be suitable as target genes for diagnostic or therapeutic applications and were thus selected for the further characterization. We used the technique of reverse transfection microarrays as an efficient technology to identify tumor-relevant genes and characterize important functional roles with high throughput. 11 out of 79 candidate genes with strong reproducible effects have been identified as promising candidates for the single gene characterization. Among them was the G-Protein Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2, a.k.a. ADRBK1). We verified the high overexpression of ADRBK1 in human pancreatic cancer tissue as compared to chronic pancreatitis and healthy pancreatic tissue. Detailed functional investigation uncovered a proliferative and cell cycle modulating phenotype of this candidate gene.

The second part of the systematic approach for the identification of new promising candidates consisted of a kinome-wide screening using Ambion® Silencer® Select kinome-wide siRNA library. The effects of kinase down regulation in transformed Panc1 and non-transformed Hek293 cells on apoptosis activation were measured via automated apoptosis assays. This analysis identified the dual specificity protein Kinase TTK as a candidate whose repression induced apoptosis specifically in transformed cell lines. Our results show a high rate of overexpression of TTK in humane pancreatic cancer tissue in comparism to inflamed (chronic pancreatitis) and healthy pancreas controls. Further functional analyses based on the down regulation of the TTK revealed strong effects on cell viability and confirmed the apoptotic phenotype (detected via immunoblotting as well as flow cytometry). In addition, we demonstrated the involvement of the kinase in the maintenance of genomic stability. Furthermore, our soft agar clonogenic assays indicates a strong influence of TTK on the anchorage independent tumor cell growth.



# 1. Einleitung

## 1.1 Das Pankreaskarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie & Ätiologie

2007 postulierte die Weltgesundheitsorganisation, dass die Krebserkrankungen den ersten Rang in der Todesursachenliste einnehmen werden. (World Health Organization 2007) Laut des WHO-Reports fordern diese neben den Infektionskrankheiten und den Erkrankungen des Herzkreislaufsystems bereits die meisten Opfer weltweit. Statistisch betrachtet bilden die Pankreaskarzinome nur 3% aller auftretenden Neoplasien, dennoch mit für das Jahr 2012 verzeichneten Mortalitäten von 320.372 Individuen weltweit und 104.463 Individuen in Europa belegen sie Platz 5 auf der Liste der tödlichsten Tumorerkrankungen. (International Agency for research on cancer; WHO; GLOBOCAB 2008) Die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten beträgt <3% und die mittlere Überlebenszeit liegt bei ca. 6 Monaten nach Diagnosestellung. (Bardeesy und DePinho 2002, Lowenfels und Maisonneuve, Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. 2004, Jemal, et al. 2010, Malvezzi, et al. 2013)

Es ist zu bemerken, dass die Inzidenzraten eine sehr heterogene Verteilung aufzeigen. (Lowenfels und Maisonneuve, Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. 2004) Forschungsdaten belegen Unterschiede bezüglich des Habitats, des Geschlechts, des Alters und verweisen auf das Bestehen lebensstil- und kulturbedingter Risikofaktoren. (Lowenfels und Maisonneuve, Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. 2004, Ojajärvi, et al. 2001, Buell und Dunn 1965, Kolonel und Wilkens 2006, Parkin, Boyd und Walker 2010, Ferlay, et al. 2006) Einen am fundiertesten untersuchten Einfluss stellt der Tabakkonsum dar. Aufgrund seiner anatomischen Lage ist das Pankreas im Gegensatz zur Lunge nicht direkt exponiert, hat aber dennoch Kontakt zu karzinogenen Substanzen und deren Abbauprodukten über den Blutkreislauf, die Gallenblase und das Duodenum. Das Risiko eines Nikotinkonsumenten an einem Pankreaskarzinom zu erkranken ist im Vergleich zu Nichtrauchern um das Doppelte erhöht. (Lowenfels und Maisonneuve, Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. 2004, Boyle, et al. 1996, WHO, IARC und Bosman, WHO classification of tumours of the digestive system. 2010)

Ein weiteres wichtiges kulturelles Merkmal mit zahlreichen Risiken stellt die Ernährung dar. Einen besonderen Fokus verdient die Aufnahme von Nitraten und Nitriten tierischen Ursprungs. In Tierstudien zeigten Präkanzerogene, wie die *N*-Nitrosamine, ein hohes karzinogenes Potenzial, das in diversen inneren Organen wie Ösophagus, Magen und Pankreas in Neoplasien resultierte. (Bogovski und Bogovski 1981, Coss, et al. 2004, Pour, et al. 1981) Ein unter anderem

ernährungsbedingter Ursachenträger ist die Adipositas. In Abhängigkeit vom als gesund festgelegten Normwert für den *Body-Mass-Index* von 18-24,9kg/m<sup>2</sup>, konnte ein relatives Risiko von 1,7 bei einem laut der Weltgesundheitsorganisation als adipös definierten BMI von > 30kg/m<sup>2</sup> ermittelt werden. (Calle und Kaaks, Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. 2004, Calle und Thun, Obesity and cancer. 2004, Kahn und Flier 2000, Rigby 1999, Magdalena 2010) Somit ist das Risiko für übergewichtige Individuen an einem Pankreaskarzinom zu erkranken im Vergleich zu normalgewichtigen Vergleichspersonen nahezu verdoppelt.

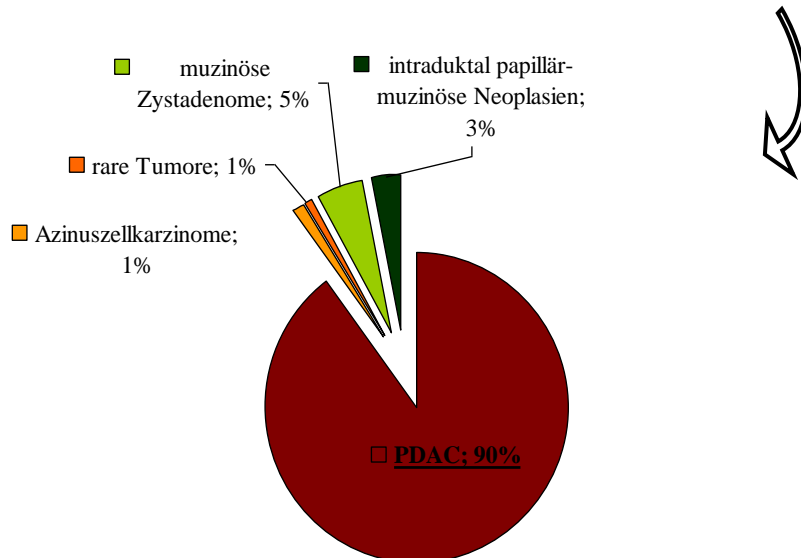
Neben den kulturellen und lebensstillabhängigen Einflüssen konnte eine Reihe hereditärer Syndrome als Risikofaktoren für Pankreaskarzinome identifiziert werden. Am stärksten betroffen sind die Peutz-Jeghers-Syndrom-Patienten. Das Syndrom zeichnet sich durch eine Mutation der Serin-Threonin-Kinase 11 (*STK 11*) aus und birgt für Mutationsträger ein relatives Risiko von 132. (Giardiello, et al. 2000) Das Melanom-Pankreaskarzinom-Syndrom (MPCS), auch als familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM) bezeichnet, geht mit einer onkogenen Keimbahnmutation der Cyclin-abhängigen Kinase 2A (*CDKN2A*) einher. Das relative Risiko dieser Gruppe liegt bei 13-22. (Lynch HT, et al. 2002, Whelan, Bartsch und Goodfellow 1995, Bardeesy und DePinho 2002) Die insbesondere auch für die Entstehung von Brust- und Eierstocktumoren bekannte *BRC A2* Keimbahnmutation beinhaltet ebenfalls ein 5 bis 10-fach erhöhtes Risiko zu erkranken. (Lowenfels und Maisonneuve, Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. 2004, Hahn, et al. 2003, Lal, et al. 2000) Ein weiterer erblich bedingter Faktor ist die hereditäre Pankreatitis, die bereits in früher Kindheit zur Ausprägung kommt. Sie ist beispielsweise durch die Mutation des *PRSSI*-Gens, was zu gesteigerter Aktivierung von Trypsinogen führt, oder des *SPINK1*-Gens, die den Verlust der Proteaseinhibitoraktivität nach sich zieht, verursacht. Beide Genprodukte sind in Prozesse zum Schutz des Pankreas vor Autodigestion involviert. Das relative Risiko für diese Individuen liegt bei 70%. (Bardeesy und DePinho 2002, Howes, et al. 2004, Lowenfels, Maisonneuve und DiMagno, et al. 1997, Le Maréchal, et al. 2004) Ein weniger erforschtes Feld stellt das familiäre Pankreaskarzinom dar. Nach Rieder werden Pankreaskarzinomfälle in die Kategorie des familiär auftretenden Pankreaskarzinoms eingestuft, wenn innerhalb einer Familie 2 oder mehr Verwandte ersten Grades, alternativ 3 oder mehr Verwandte 2ten Grades mit histologisch gesicherten Befunden und einem Patienten unter 50 Jahren, erkrankt sind. Das Risiko für diese Individuen ist um das 18-fache erhöht, wenn ein Verwandter ersten Grades an PDAC erkrankt ist. Es steigt sogar um das 57-fache bei Familien mit 3 oder mehr Pankreaskarzinombetroffenen. (Lal, et al. 2000, Bartsch und Rothmund 1997, Gerdes, et al. 2002) Aktuelle Forschungsergebnisse legen darüber hinaus einen wichtigen Einfluss von Entzündungsvorgängen und Immunzellen auf die Tumorentstehung und -progression nahe. (Rajala

und Scherer 2003) Eine internationale Studie zeigte, dass sich das Risiko von Patienten mit langjährig bestehender chronischer Pankreatitis nach 20 Jahren um 4,0% erhöht. Hier ist zu bemerken, dass Alkoholmissbrauch keinen nachweisbaren direkten Einfluss auf das Risiko einen Pankreastumor zu entwickeln hat. Jedoch haben 70-80% der an chronischer Pankreatitis Leidenden eine lange Vorgeschichte mit Alkoholabusus. (Hotamisligil 2002, Rajala und Scherer 2003, WHO, IARC und Bosman, WHO classification of tumours of the digestive system. 2010, Lowenfels und Maisonneuve, Epidemiology and prevention of pancreatic cancer. 2004, Rajala und Scherer 2003, Algül, et al. 2007) Die Stoffwechselstörungen des Pankreas, wie zum Beispiel Diabetes mellitus, bergen ebenfalls Risikopotenziale. Das Risiko für Diabetespatienten erhöht sich mit der Dauer der Erkrankung. Es steigt nach einem Jahr um 30% und nach 10 Jahren sogar um 50%. (Pickartz, Mayerle und Lerch 2007, Silverman, et al. 1999)

### 1.1.2 Klassifikation und Pathogenese

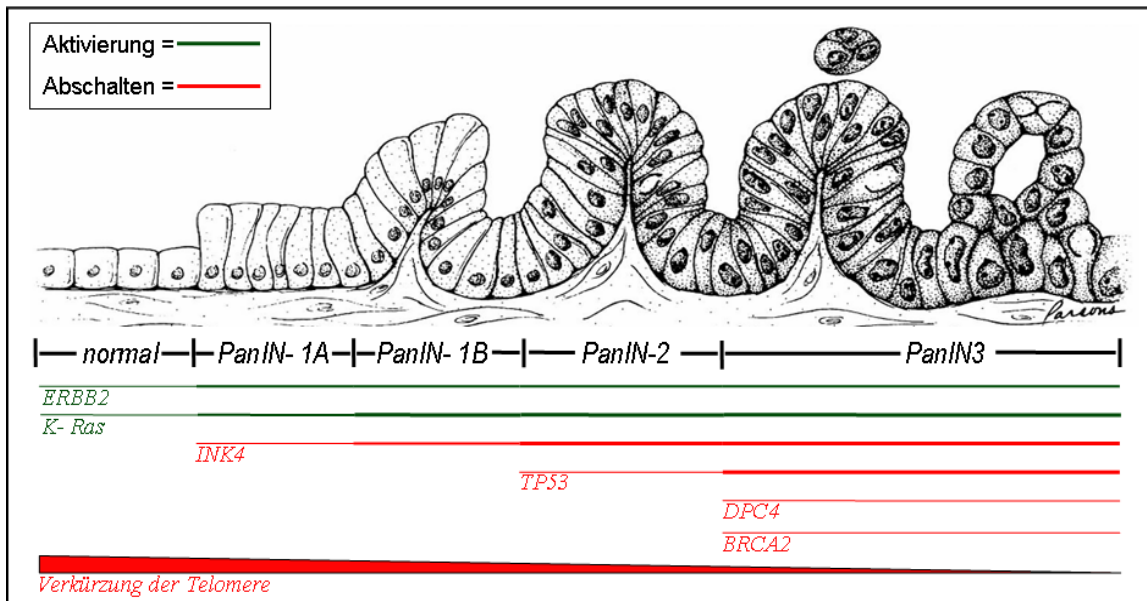
Nach der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation von 2010 werden alle Pankreasneoplasien gemäß ihrem Ursprung in exokrine und neuroendokrine Tumore unterteilt. Die neuroendokrinen Tumore, bezeichnet als PETs (*pancreatic endocrine tumors*) gehören mit einer Häufigkeit von 1-2% zu den eher raren Neoplasien und sind klinisch häufig gut beherrschbar. Die exokrinen Tumore bilden mit 98% die am häufigsten vorkommenden Neoplasien. Während benigne Raumforderungen, wie zum Beispiel Zystadenome, vergleichsweise selten auftreten, bilden duktales Adenokarzinome (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) mit 85-90% die größte Gruppe aller Pankreasneoplasien. Es ist auffällig, dass 60-70% hiervon am Pankreaskopf lokalisiert sind. Zu den restlichen, eher seltenen Gruppen gehören mit 1-2% die Azinuszellenkarzinome, mit >1% rare Tumore wie das Pankreatoblastom, und mit 1-3% intraduktaler papillär-munizöse Neoplasien. (WHO, IARC und Bosman, WHO classification of tumours of the digestive system. 2010, Klimstra, et al. 2010)

| Klassifikation der Pankreaskarzinome |   |                           |                     |                        |                           |
|--------------------------------------|---|---------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|
| PETs 2%                              |   |                           | NETs 98%            |                        |                           |
| benigne Tumore                       | grenzwertig / geringgradig maligne Tumore | hochgradig maligne Tumore | 1-2% benigne Tumore | 8-9% borderline Tumore | <b>90% maligne Tumore</b> |



**Abbildung 1: Klassifikation der Pankreaskarzinome nach dem WHO-Report.** (WHO, IARC und Bosman, WHO classification of tumours of the digestive system. 2010, WHO, Hamilton und Aaltonen, Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. 2000) Die Übersicht zeigt die Aufteilung in exokrine und neuroendokrine Tumore sowie ihre jeweiligen Untergruppen. Das Kreisdiagramm schlüsselt die Kategorie der malignen Tumore mit einem besonderen Augenmerk auf die Prominenz des duktaalen Adenokarzinoms auf.

Ein morphologisches Progressionsmodell für die Onkogenese vom duktaalen Adenokarzinom basierend auf histologischen Untersuchungen und im Einklang mit molekularbiologischen Erkenntnissen der letzten 10 Jahre wurde von H.R. Hruban vorgestellt, zusammengefasst in der Abbildung 2. Dieses Modell geht von nichtinvasiven epithelialen Tumorvorläuferläsionen aus, welche im Pankreasductus auftreten und als pankreatische intraepitheliale Neoplasien, abgekürzt PanIN, bezeichnet werden. (Hulst 1905) Zusätzlich zu pankreatisch intraepithelialen Neoplasien, die Vorläufer für invasive Adenokarzinome bilden, sind zwei weitere Vorläuferläsionen, wie die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) als auch die muzinös-zystische Neoplasie (MCN), die zu den raren zystischen Pankreastumoren führen, bekannt. (Zamboni, et al. 2013, Hruban, et al. 2007) Speziell die PanINs sind gekennzeichnet durch zytologische und architektonische Atypien und werden je nach Grad der Veränderung in 3 unterschiedliche Stadien unterteilt.



**Abbildung 2: Progressionsmodell für das duktales Adenomkarzinom nach Hruban.** (Hruban, Wlentz und Kern 2000) Dargestellt sind einzelne Stufen der intraepithelialen Neoplasien inklusive ihrer morphologischen sowie genetisch fortschreitenden Veränderungen. Die Abbildung wurde aus dem *American Journal of Pathology* von Ralph H. Hruban übernommen. (Hruban, Wlentz und Kern 2000)

Das PanIN-1A-Stadium beinhaltet flache Läsionen mit <5 mm Durchmesser, hochzylindrischen Zellen mit basalen, rundovalen Kernen. Es sind keine Atypien vorhanden. Das Stadium PanIN-1B ist bis auf mikropapilläre, pseudostratifizierte Architektur identisch mit dem ersten Stadium. Die Struktur des PanIN-2 Stadiums bleibt bei meist flacher oder papillärer Architektur. Es sind geringe zytologischen Dysplasien, zum Beispiel den Verlust der Polarität, die Vergrößerung der Nuklei und Hyperchromatismus, zu erkennen. Das letzte Vorläuferstadium, PanIN-3, ist gekennzeichnet durch papilläre oder mikropapilläre, aber nicht mehr flache Architektur, mit siebförmigen Strukturausbildungen, sowie Freisetzung von Epithelzellclustern ins Lumen von Gangstrukturen und luminalen Nekrosen. Weitere zytologische Charakteristika sind starke Präsenz von Makronukleoli, atypischer Mitoseverlauf, becherförmigen Zellstrukturen und Polaritätsverlust. (Zamboni, et al. 2013, Hruban, et al. 2007, Koorstra, et al. 2008) Die PanIN-Stadien 1A bis 2 kommen auch im gesunden Pankreas in einer geringeren Anzahl vor. Es wurde bei einer Untersuchung von 234 Pankreata 82% der Läsionen in Zusammenhang mit invasiven Tumoren, 60% mit chronischen Pankreatitis und 16% in gesunden Patienten ermittelt. (Tanaka, et al. 2006) Das Auftreten der PanIN-3 ist ausschließlich mit invasiven Karzinomen assoziiert. (Yamaguchi, et al. 2000) So wie pankreatisch intraepithelialen Neoplasien, können auch die raren papillär-muzinöse sowie muzinös-zystische Neoplasie in verschiedene Stadien unterteilt werden und im duktales Adenomkarzinom, aber auch in prognostisch günstigeren benignen Formen resultieren. Die intraduktalen papillär-muzinöse Neoplasien des Pankreas sind nichtinvasiv, schleimproduzierend, papillär und eher selten flach. Sie

haben ihren Ursprung meist im Hauptgang oder in den sekundären Gängen und eine Größe von >1cm Durchmesser, die eine Vielzahl von Zelltypen und eine Reihe von Atypien einschließt. (Tanaka, et al. 2006, Yamaguchi, et al. 2000, Eguchi, et al. 2006, Hrubá, Wlantz und Kern 2000) Die muzinöszystischen Neoplasien sind ebenfalls schleimproduzierend, wesentlich größer als die PanINs und kommen fast ausschließlich bei Frauen in den Wechseljahren vor. Besonders bezeichnend sind gewebliche Charakteristika, die normalerweise in den Ovarien vorzufinden sind. Sie haben im Gegensatz zu den anderen zwei Formen keine Verbindung zum duktalem System. (Tanaka, et al. 2006, Yamaguchi, et al. 2000)

Neben der genetischen Heterogenität der Pankreasneoplasien wird die verlässliche Diagnose und folglich auch die zielgerichtete Therapie von Pankreasneoplasien durch anfänglich relativ unspezifische Symptomatik der Erkrankung erschwert. Der Verlauf ist anfänglich symptomatisch stumm. Mit fortschreitendem Grad und der Ausweitung auf benachbarte Organe ergeben sich eher allgemeine Symptome wie Abdominal- und Rückenschmerzen, Störung der Verdauung, Ikterus aufgrund der Verengung des Gallengangs und Gewichtsverlust. Auch die Entstehung von Diabetes kann das Krankheitsbild prägen. Durch das späte Auftreten der Symptome und dadurch verzögerte Diagnosestellung ist eine kurative Behandlung meist nicht mehr Erfolg versprechend, so dass nur die Möglichkeit zur palliativen Therapie bleibt. Ca. 10% der Patienten sprechen positiv auf die Chemotherapie mit 5-Fluoruracil oder Gemcitabin an, wohingegen die Radiotherapie insbesondere als Monotherapie weitgehend ineffektiv ist. In 10-20% der Fälle ist eine chirurgische Entfernung des Tumors möglich. Vorausgesetzt, dass hier eine R0-Resektion (Entfernung des Tumors vollständig im Gesunden) gelingt, bietet diese Behandlungsmöglichkeit die beste Prognose für den Behandelten. (Alexakis, et al. 2004, Cascinu, et al. 2010, Chua und Cunningham 2005, Wilentz, Geradts, et al. 1998)

### 1.1.3 Molekulare Mechanismen

Den morphologischen Veränderungen des Pankreasgewebes im Verlauf der Entstehung und Progression von präneoplastischen Läsionen können multiple genetische Ereignisse zugeordnet werden. Die wichtigste Veränderung ist die aktivierende Punktmutation des *KRAS* Protoonkogens, die bereits in 36% der PanIN-1A, in 87% der PanIN2/3 und >90% der Adenokarzinome nachweisbar ist. (Almoguera, et al. 1988, Dong, et al. 2000, Hruban, van Mansfeld, et al. 1993, Lohr, et al. 2005) Die Notwendigkeit der *KRAS* Mutation für den Tumorprogress konnte in einem transgenen Mausmodell nachgewiesen werden. (Hingorani, et al. 2003) Die Versuchstiere zeigen ein breites Spektrum an PanIN-Läsionen, die zum duktalem Adenokarzinom führen können. (Hruban, Adsay, et al., Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus

report and recommendations. 2006) Die Aktivierung der Onkogene der Ras-Familie hat große Auswirkung auf zelluläre Prozesse wie zum Beispiel die Proliferation über die MAPK- und Akt-Signalwege, das Überleben der Zellen und die Tumorinvasivität. (Klimstra und Longnecker 1994) Eine weitere, sehr früh auftretende Veränderung betrifft die Überexpression von Her2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2, ERBB2*), einem Mitglied der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR). (Day, et al. 1996) Es wird ein Zusammenhang zwischen K-Ras und dessen Beteiligung an dem autokrinen EGF-Signaltransduktionsweg vermutet. (Watanabe, et al. 1996, Korc, et al. 1992) Forschungsarbeiten belegen, dass die Stimulation des Phosphoinositid-3-(PI3)-Kinase-Signaltransduktionsweges anhand des EGFR über die autokrine Schleife für die Transformation diverser Zelllinien durch K-Ras notwendig ist. (Sibilia, et al. 2000, Watanabe, et al. 1996) In vitro- und Tierexperimente belegen mittels einer Antikörperblockade der EGF-Signalkaskade eine Wachstumshemmung der Tumorzellen. (Overholser, et al. 2000, Watanabe, et al. 1996, Wagner, et al. 1996)

Des Weiteren zeigte eine Untersuchung von 60 Pankreata mit insgesamt 451 diagnostizierten PanIN-Läsionen, dass 9% der gesunden Gänge, 16% der Patienten mit PanIN-1A, 32% PanIN-1B, 56% PanIN-2 und 80% PanIN-3 Läsionen eine Überexpression des CDK-Inhibitors 1, bekannt als p21 (WAF1/CIP1), aufweisen. So wird angenommen, dass dieses sehr früh stattfindende Ereignis die Konsequenz der Her2/neu Überexpression oder die Folge erhöhter K-Ras-Aktivität ist, wobei die funktionelle Rolle dieses Proteins in der Progression und Entwicklung der PanINs unklar ist. (Biankin, et al. 2001) Zusätzlich kommt es in frühen PanIN-Stadien zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *CDKN2A/INK4A* durch Mutation, Gendeletionen oder Promotorhypermethylierung, was auch in 80-95% der Adenokarzinome nachgewiesen werden kann. (Rozenblum, et al. 1997) Das Produkt dieses Gens ist das zellzyklusregulierende Protein p16, das durch seine starke Bindung an CDK4 und CDK6 den Übergang des Zellzyklus von der G1- in die S-Phase blockieren kann. Der Verlust dieses Tumorsuppressors bewirkt unkontrolliertes Zellwachstum. Zudem belegen diverse Studien eine Beteiligung von *INK4A* an zellulärer Antwort auf DNS-Schäden in vivo, was einen Zusammenhang von p16-Defizienz mit der Chemoresistenz von Tumoren nahelegt. Wiederum andere Forschungsarbeiten zeigen, dass das Fehlen von p16 mit einem erhöhten Level an aktiviertem K-Ras einhergeht. (Rozenblum, et al. 1997, Wagner, et al. 1996, Fisher, et al. 2001, Schmitt, et al. 2002, Lal, et al. 2000)

Ein anderer sehr prominenter Tumorsuppressor ist *TP53*, dessen Mutationen in den DNS-bindenden Domänen in späten PanIN-Stadien mit eindeutigen Zeichen von Dysplasien und in über 50% der Adenokarzinome nachgewiesen werden können. (Dong, et al. 2000, Rozenblum, et al. 1997) Da p53 innerhalb der Zelle diverse Funktionen wie die Initiation der Apoptose, Beteiligung am G2/M-Arrest

und G1/S-Zellzyklus-Kontrollpunkten inne hält, ist die Konsequenz des Verlustes der Funktion dieses wichtigen Tumorsuppressors der Ausfall kritischer Kontrollpunkte, unkontrollierte Zellteilung sowie die Blockade der Apoptoseinduktion. (Wang, et al. 2001, Garkavtsev, et al. 2001, Stiewe 2007, Maitra, et al. 2003, Moore, et al. 2001)

Eine Deletion oder Mutation von *DPC4*, dem Smad4 kodierenden Gen, liegt in 55% der duktaalen Adenokarzinome vor, und 33% der PanIN-3-Läsionen weisen den Verlust von Smad4-Expression auf. (Rozenblum, et al. 1997) Smad4 ist ein Teil der TGF- $\beta$  Signalkaskade, bei deren Aktivierung es seine Lokalisation in den Zellkern wechselt und die Genexpression für die Zellteilung wichtiger Gene reguliert. (Heldin, Miyazono und ten Dijke 1997) Des Weiteren interagiert Smad4 mit intrazellulären TGF- $\beta$  und Aktivin-nachgeschalteten Signalkaskaden. Die Abnahme von Smad4 geht mit der Hochregulation der Retinoblastomsignalkaskade einher, was zur unkontrollierten Progression des Zellzyklus' von der G1- in die S-Phase führt und somit wie auch der Verlust von p16 und p53 in unkontrolliertem Zellwachstum und dem Verlust der proapoptotischen Signale mündet. (Schutte, et al. 1996, Massagué, Blain und Lo 2000, Wilentz, Geradts, et al. 1998, Bardeesy und DePinho 2002)

Weitere Mechanismen, die zur Genominstabilität im Pankreasgewebe beitragen, haben ihren Ursprung in der Deregulation der Gene *hMLH1* und *hMSH2*, die für Reparaturproteine kodieren, die Gendeletionen, Insertionen und andere Fehler nach der DNS-Replikation beseitigen. Durch Mutationen oder Promotorhypermethylierung kann eines dieser Gene abgeschaltet werden, was zur Akkumulation der Mutationen innerhalb repetitiver DNS-Sequenzen führt. Diese Veränderungen bezeichnet man als Mikrosatelliteninstabilität (MSI). 4% der Pankreasneoplasien haben solche MSI, was zusätzlich mit geringer Differenzierung der Tumore und fehlendem Nachweis für *TP53* und *K-Ras* Mutationen einhergeht. (Goggins, et al. 1998, Yamamoto, et al. 2001, Wilentz, Su, et al. 2000) Zytogenetische Studien zeigten, dass die Telomerdynamik ein weiterer Faktor für die genomische Instabilität sein kann. Die Verkürzung der Telomersequenzen in sehr frühen Phasen der Pankreasneoplasien führt zu anormaler Fusion der kritisch verkürzten Chromosomen. (Van Heek, et al. 2002) Im Rahmen der Zellteilung können die Kinetochore solcher dizentrischer Chromosomen zu entgegen gesetzten Spindelpolen gezogen werden wodurch sich so genannte Anaphase-Brücken ausbilden. (Engelhardt, et al. 2000, Maser und A 2002, Mateuca, et al. 2006) Dies führt zu Chromosomenbrüchen, die unter anderem mit weiteren geschädigten oder verkürzten Chromosomenenden reagieren, was eine Reorganisation des Genoms herbeiführt. Solche Chromosomenlängenanomalien sind sehr frühe Ereignisse, die in 90% der PanIN-Stadien nachweisbar sind. (Van Heek, et al. 2002)



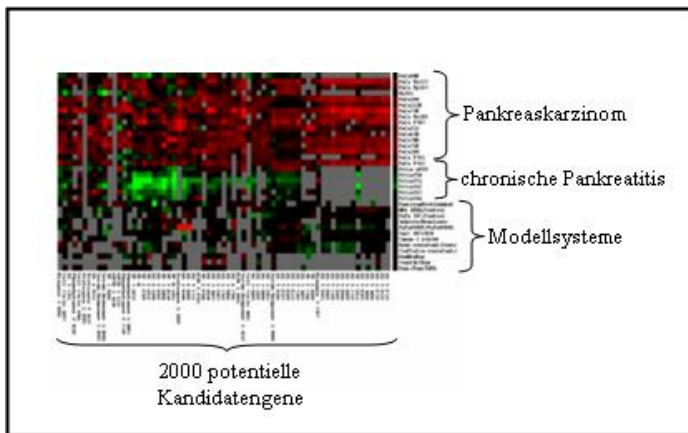
Neben den genannten genomischen Aberrationen bildet die Epigenetik ein besonders junges und noch wenig erforschtes Arbeitsfeld. Dabei wurde in unterschiedlichen Tumoren eine Hypermethylierung diverser Gene, die an der Tumorsuppression oder der Aktivierung notwendiger Signalwege beteiligt sind, nachgewiesen. (Baylin und Herman 2000) Mikrodisektionsstudien der frühen PanIN-Stadien zeigen, dass über 70% eine abnormale Promotormethylierung aufweisen. (Sato, et al. 2008)

## 2.1 Die Hochdurchsatzanalysen

### 2.1.1 Molekularbiologische Hochdurchsatzverfahren

Die Vielfalt an Risikofaktoren sowie genetische Heterogenität der Pankreasneoplasien als auch die schlechten Prognosen, die ebenfalls mangelnden Therapieansätze und die hohen Mortalitätsraten zeigen auf, dass die grundlegenden Mechanismen dieser Erkrankung noch nicht ausreichend aufgeklärt sind. Die Analyse einzelner Gene und der Signalkaskaden ist zeitaufwändig, kostspielig und wenig effizient. Somit bieten Hochdurchsatzanalysen eine vertretbare Alternative. Im Herbst 1990 wurde das international Humangenomprojekt, HGP, mit dem Ziel, das vollständige menschliche Genom zu entschlüsseln, gegründet. 2001 wurde die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms veröffentlicht. (Venter, et al. 2001) Heute ist bekannt, dass die entschlüsselten Sequenzmuster nicht ausreichend sind, um eine Krankheit oder Anomalie genau zu erklären und zu erforschen, da das Transkriptom, das Proteom und die epigenetische Modifikationen eine große Auswirkung auf das Gleichgewicht der Zellen und der Organismen haben. In den Jahren 1992-1997 wurden von unserer Arbeitsgruppe erstmalig Expressionsprofilanalysen von soliden Tumoren durchgeführt. (Gress, et al. 1996) Diese Arbeiten wurden unter Anwendung von Gitter-Arrays (*gridded arrays*) sowie differentieller Hybridisierung zur Analyse von cDNS-Klon-Bibliotheken durchgeführt, um Expressionsmuster zu identifizieren und in Beziehung mit vorhandenen Daten über das Genom, das Transkriptom und die Sequenzinformationen zu setzen. (Gress, et al. 1996, Lehrach, et al. 1990) Diese Arbeit identifizierte über 500 verschiedener Gene, ca. die Hälfte ohne eine bekannte physiologische Funktion, deren Expression sich vom gesunden Pankreasgewebe unterscheidet. (Gress, et al. 1996) Zusätzlich wurden ca. 1600 Kandidatengene relevanter Genfamilien aus der Literatur oder mit substantiellen physiologischen Effekten wie zum Beispiel apoptose-, oder zellzyklusassoziierte Gene, Kinasen, Phosphatasen oder Kandidaten, die eine hohe Wahrscheinlichkeit aufwiesen nützlich für diagnostische oder therapeutische Anwendungen zu sein, für die weitere Analyse ausgewählt. Diese insgesamt 2145 Gene wurden mittels cDNS-*Microarrays* analysiert. Die ersten cDNS-*Microarrays* wurden 1995 von Pat Brown und David Botstein

entwickelt und basieren auf dem Prinzip, dass die markierte cDNS einer komplexen Probe komplementär an eine auf einer Trägermatrix immobilisierte DNS hybridisiert. Durch die hohe Dichte immobilisierter DNS an dem Trägermaterial lassen sich mehrere 1000 Gene einer Probe parallel untersuchen. (Luo, et al. 2003, Schena, et al. 1995) Die für selektierte Gene erstellten fokussierten Nylonmembran-cDNS-Arrays wurden mit einer großen Anzahl an Gewebeproben von Pankreaskarzinomen, PanINs, chronischen Pankreatitis, gesundem Pankreasgewebe, sowie cDNS aus in vitro und in vivo Modellen für Differenzierung, Embryonalentwicklung, Metastasierung, Apoptose und Wachstumsfaktorsystemen hybridisiert. Die Auswertung der *Array*-Daten erfolgt mittels Computerprogrammen durch die Anwendung von Clusteranalysen und ist im Folgenden in der Abbildung 3 exemplarisch dargestellt. Dabei findet eine Gruppenzuordnung aufgrund von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden, bezeichnet als *Clustering*, statt. (Luo, et al. 2003)



**Abbildung 3: Ausschnitt der Ergebnisse der Clusteranalyse der 2000 Kandidatengene.** (Gress, et al. 1996) Jeweils eine Spalte steht für eine Gen und jede Zeile für eine Experiment der Hybridisierung mit humanem Gewebe und in vivo & in vitro Versuchsmodellsystemen. Der Farbkode stellt das Expressionsmuster dar. Hohe Expressionslevel sind rot, mittlere grün und niedrige schwarz. Graue Felder sind Ansätze die keine Aussage ermöglichen.

Dieser Datensatz grenzte die Anzahl von potentiellen 2145 auf 290 Kandidaten mit spezifischer Expressionsdifferenz im Pankreaskarzinomgewebe ein. 137 dieser Gene zeigten ebenfalls Signale mindestens in einem der in vitro Modelle und 21 davon wiesen keine bekannte physiologische Funktion auf. Ausgehend von solchen primären Daten wurden bereits Einzelgencharakterisierungen vorgenommen. So konnten 2001 von Michl et al, Claudin-4 als möglicher therapeutischer Ansatz vorgestellt werden. Claudin-4 ist ein Bestandteil der *tight junctions* in Epithelien des Intestinaltraktes und fungiert im Infektionsfall als Rezeptor für das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE). Es zeigte sich, dass Claudin-4 im Pankreaskarzinom überexprimiert ist, und dass Behandlung von Claudin-4-positiven Tumorzellen mit CPE dosisabhängig zu apoptotischem und nekrotischem Zelltod führt. (Michl, et al. 2001)

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass das ebenfalls im PDAC überexprimierte Gen SERPINE2, das an der Organisation der extrazellulären Matrix beteiligt ist, wesentlich in die Vermittlung der invasiven Eigenschaften des Pankreaskarzinoms involviert ist. (Buchholz, et al. 2003, Neessee, et al. 2007)

KOC (*KH-domain containing protein over expressed in cancer*) erwies sich ebenfalls als für diagnostische Zwecke geeigneter Kandidat. Er lässt sich als sensitiver und spezifischer Marker für die Detektion von malignen Tumoren einsetzen. (Mueller, et al. 2003) Nach einem weiteren Abgleich der über 200 Kandidaten mit Datenbanken und Überlegungen bezüglich vorhandener Modellsysteme sowie potenzieller Eignung als therapeutisches und diagnostisches Mittel wurden 79 besonders geeignete Kandidaten für eine weiterführende funktionelle Charakterisierung ausgewählt. Diese Gruppe beinhaltet Gene, die im Pankreaskarzinom oder in PanIN-Stadien überexprimiert sind, sowie Kontrollgene bekannter Funktion und Gene mit deutlicher Unterexpression im Tumorgewebe. Die Aufarbeitung dieser Kandidaten sollte mittels einer speziellen Hochdurchsatzmethode, die man als „revers transfizierte Mikroarrays“ (*reverse transfection microarrays*) bezeichnet, durchgeführt werden.

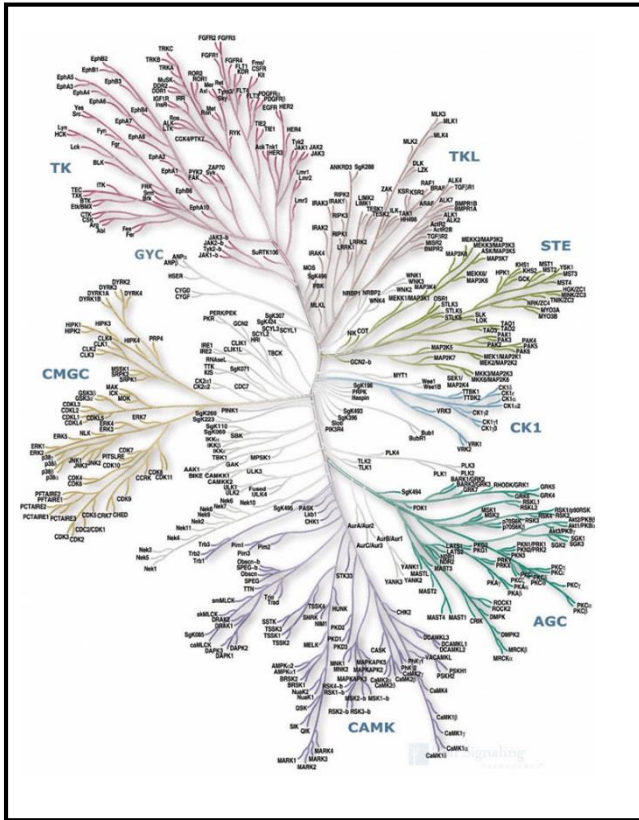
### 2.1.2 Technik des revers transfizierten *Microarrays* (Zaiuddin und Sabatini 2001)

Um den Zeit- und Kostenaufwand für die funktionelle Einzelgenanalyse der 79 Kandidaten zu minimieren, wurde die Methode der reversen Transfektion als eine adäquate Alternative ausgewählt. Dieses Verfahren wurde 2001 von Junaid Ziauddin und David M. Sabatini vorgestellt und ermöglicht eine parallele Untersuchung einer großen Anzahl an Genen, mit der Möglichkeit zur Identifizierung von physiologischen Genfunktionen und weiteren Eigenschaften der Genprodukte. (Zaiuddin und Sabatini 2001) Die Bezeichnung „*reverse*“ wurde auf Grund des umgekehrten Protokollablaufs der Lipofektion vergeben. Zunächst werden auf einer Matrix genspezifische-DNS, inklusive Transfektionsmix, immobilisiert. Solche *living cells assays* basieren als erstes auf dem *input* von zum Beispiel löslichen Faktoren wie Vitaminen, Antibiotika, Serum, die im Medium enthalten sind, unlöslichen Faktoren wie der extrazellulären Matrix, die Migration, Zellteilung und Zellphänotyp beeinflusst und experimentellen Stimuli wie Zytokine, Therapeutika, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Agenzien und Plasmid-DNS. Auf der Matrix werden jeweils zu analysierenden Zelllinien kultiviert. Die gedruckten *Spots* werden von Zellen besiedelt, die jeweiligen Transfektionskomplexe aufgenommen und die spezifischen Genprodukte überexprimiert. Eine detaillierte Methodenbeschreibung ist Abschnitt 3.6.1 zu entnehmen. Die Zellantwortquantifizierung kann auf mannigfaltige Weise, zum Beispiel in Form *enzym-linked immunosorbent assay* oder mittels Mikroskopie erfolgen. Die mikroskopische Auswertung wird durch das grünfluoreszierende Protein und seine Derivate ermöglicht. (Lippicott-Schwartz und Patterson 2003, Wang, Shyy und Chien 2008) Das Originalprotokoll von Ziauddin und Sabatini sah eine Co-Transfektion mit dem grünfluoreszierenden Protein zur Lokalisation der *Spots* vor. Das Aufgreifen des reversen Transfektionsverfahrens durch weitere Arbeitsgruppen führte zu einer stetigen Weiterentwicklung

zum Beispiel durch den Einsatz von fluoreszierenden C- und N-terminalen Fusionskonstrukten. (Palmer und Freeman 2004) Eine weitere Dimension bekam diese Methode durch das Anwenden von RNS-Interferenz (*siRNS*) Technologie, die eine Unterexpression von Genen auf der RNS-Basis bewirkt und ebenfalls wie die DNS für ein solches Methodenformat geeignet ist. (Zaiuddin und Sabatini 2001, Carpenter und Sabatini, Systematic genome-wide screens of gene function. 2004) Das ursprüngliche Verfahren von Ziauddin und Sabatini wurde von diversen Arbeitsgruppen aufgegriffen, weiter modifiziert und fand u.a. Anwendung bei der systematischen Analyse der Herpesvirusgene oder der Identifikation neuer proapoptotischer Faktoren. (Mannherz, et al. 2006, Konrad, et al. 2011) Solche *living cells* Hochdurchsatzverfahren wurden neben der Systembiologie ebenfalls für Wirkstoffstudien angewendet. Diverse frei zugängliche sowie kommerzielle Softwareprogramme zur routinierten Analyse als auch zur Quantifikation von Mikroarrays wurden entwickelt und angeboten. (Bailey, Wu und Sabatini 2002, Carpenter, et al., Cell Profiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. 2006)

### **2.1.3 Identifikation neuer Kandidaten via *Kinome-wide Screening***

Das Kinom umfasst die Gesamtheit aller Kinasen des humanen Genoms. Es kodiert 518 Kinasegene, die 2% aller menschlichen Gene entsprechen, womit sie die größten Genfamilien darstellen. (Manning, et al. 2002) Nach Hanks und der Modifikation nach Manning umfasst die Klassifikation der Kinasen 9 große Hauptgruppen, 90 Familien und 145 Subfamilien. (Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. 2003) Die Abbildung 4 veranschaulicht die Komplexität und die Größe des Kinoms.



**Abbildung 4: Darstellung eines phylogenetischen Baums der Kinasen übernommen von cell signaling Technology®, inc.** Ein Dendrogramm der Kinasen wurde anhand der Sequenz homologien der katalytischen Domäne, aber auch weiteren Sequenz-, Struktur-, Funktionsvergleiche, erstellt. Abgebildet sind 8 Hauptkinasenfamilien nach Hanks ohne die 9. Familie der atypischen Proteinkinase. (Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. 2003, Manning, et al. 2002, Chartier, et al. 2013)

Kinasen sind Enzyme, die die Übertragung von Phosphatgruppen von einem Donor, wie ATP, GTP, auf die Aminosäuren katalysieren. Sie sind nahezu an allen biologischen Prozessen der Zelle wie Apoptose, Transkription, Mobilität, Zellteilung, Zelldifferenzierung und Stoffwechselvorgängen beteiligt. Vergleiche der chromosomalen Kinasekarten mit bekannten Loci verschiedener Erkrankungen lassen den Rückschluss zu, dass mehr als 150 Kinasen ursächlich in Tumorerkrankungen involviert sind. (Manning, et al. 2002) Die Einbeziehung der tumorbedingten Veränderung der Kinaseaktivität eröffnet einen erwägenswerten Therapie- und Diagnoseansatz. So stellen zum Beispiel die p38-, Jnk- und Erk-Signalkaskaden molekulare Angriffspunkte für Arzneimittelentwicklung zur Behandlung diverser humaner Erkrankungen dar. (Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. 2003) Vor diesem Hintergrund wurde in einem Kooperationsprojekt mit dem *Natural and Medical Sciences Institut (NMI)* an der Universität Tübingen ein das gesamte Kinom umfassendes *screening* zur Identifikation neuer Kandidatengene im Pankreaskarzinom durchgeführt. Hierzu wurde die *Ambion® Silencer® Select kinom-wide* siRNS Bibliothek verwendet, um in vollautomatisiertem Format sowohl in transformierter Panc1-Zelllinie als auch in nicht-transformierten Hek293 Zellen die Kinasen einzeln herunter zu regulieren und anschließend einen Apoptose-Assay durchgeführt, der auf der Detektion der Aktivierung von Caspasen beruht. Die Caspasen bilden eine wichtige Gruppe der Proteasen des programmierten Zelltodes. In diesem Format binden durch den *knock down* aktivierte Caspasen 3

und 6 spezifisch an das fluorogene AC-DEVD-AMC-Substrat. Dieses wird zwischen der Asparaginsäure (D) und dem AMC gespalten, wodurch ein fluoreszierendes AMC freigesetzt wird. Anschließend erfolgt die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals mittels UV-Spektrofluorometrie. Vergleiche zwischen den transformierten und nicht-transformierten Zellen in der Aktivierung der Apoptose nach der Runterregulation der jeweiligen Kinase bildeten die Basis für die Auswahl von neuen potenziellen Kandidaten zur weiteren Charakterisierung, wobei Kandidaten selektiert wurden, deren Inaktivierung eine Apoptoseinduktion spezifisch nur in transformierten, nicht aber (oder in signifikant geringerem Maße) in nicht-transformierten Vergleichszellen auslösten. Aus diesen Daten wurde als Kandidat mit der höchsten Priorität die Kinase TTK ausgewählt, die im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit näher charakterisiert wurde (s. unten).

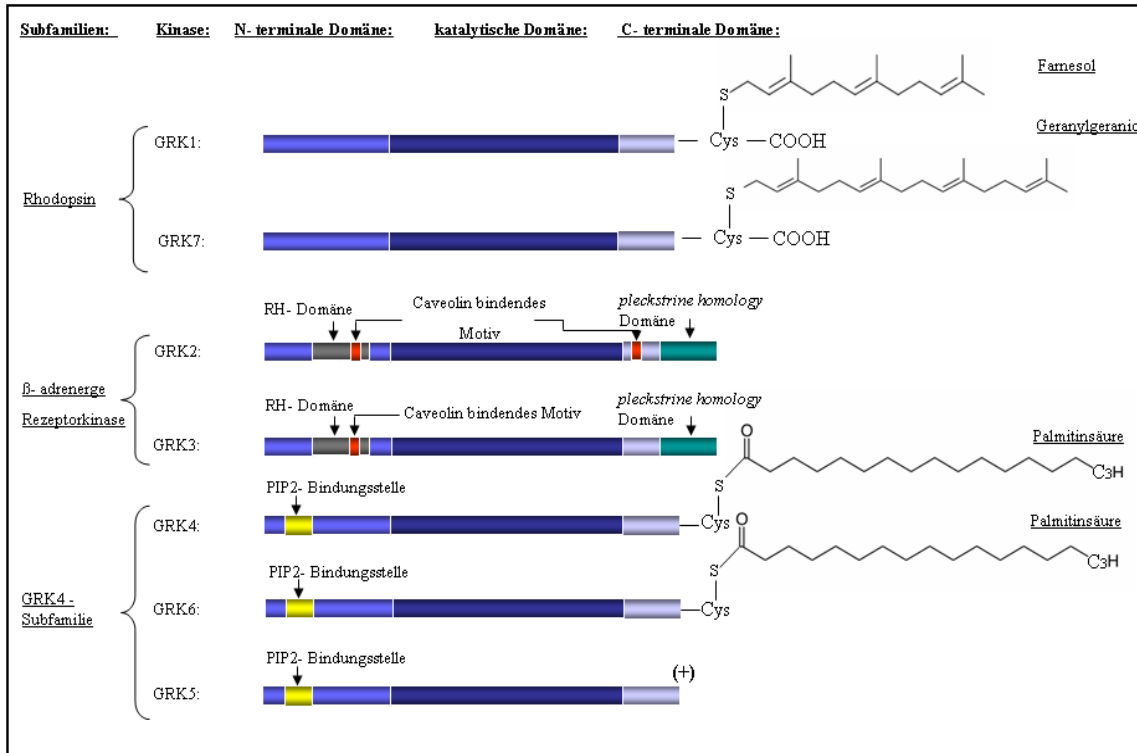
### 3.1 Die Kandidatengene

#### 3.1.1 Der Kandidat *ADRBK1*

Ein aus dem *reverse transfection screening* selektiertes Kandidatengene, das in dieser Arbeit näher Charakterisiert wurde, ist die im Pankreaskarzinom überexprimierte Beta-adrenerge Rezeptorkinase 1, auch bekannt als G-Protein-gekoppelte Kinase-2 (GRK2 = *ADRBK1*). Das 80kD große Enzym, dargestellt in der Abbildung 6, wird nach dem *enzyme commission numbers*-Klassifikationssystem als Transferase in die EC 2 Klasse eingestuft. (Hanks, Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. 2003)

Aufgrund der Strukturmerkmale und der Homologien werden die bisher 7 bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen in 3 Subfamilien eingeteilt. GRK1 und 7 werden zu den Rhodopsinkinasen eingruppiert, GRK2 und -3 gehören zu der Beta-adrenergen Rezeptorkinase und die letzte Gruppe bilden GRK4, GRK5 und GRK6. Für humanes Gewebe ist eine verbreitete Expression der GRK 2, 3, 4, 5, 6 beschrieben, wobei die Expressionsstärke deutlich von der Gewebeart abhängig ist. (Hanks und Hunter, Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. 1995, Stoffel, et al. 1994, Inglese, et al. 1992, Hisatomi, et al. 1998, Weiss, et al. 1998) Es ist sowohl eine Gewebsspezifität als auch eine Zelltypabhängigkeit innerhalb der G-Protein-gekoppelten Kinasen zu bemerken. Die  $\beta$ -adrenergen Rezeptorkinasen 2 und 3 sind beide in Geweben wie Hirn, Herz, Lunge und Nieren nachgewiesen, zusätzlich ist die GRK2-Expression in Leukozyten beschrieben. (Benovic, et al. 1991, Benovic, et al. 1986, De Blasi, et al. 1995) Auch hier äußert sich die Zelltypspezifität. Die GRK2 wird kardial nur in den Endothelzellen und GRK3 in Myozyten exprimiert. (Vinge, et al. 2001) Beide Kinasen sind im inaktiven phosphorylierten Zustand im Zytoplasma lokalisiert, da sie keine

permanenten Modifikationen zur Bindung an Membranen aufweisen. Ausschließlich nach der Aktivierung der G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt eine Dephosphorylierung zu ihrer Translokation an die Membran. (Kohout und Lefkowitz 2003) Im Folgenden beschriebene Strukturmerkmale sind auf der Abbildung 5 zu verfolgen.

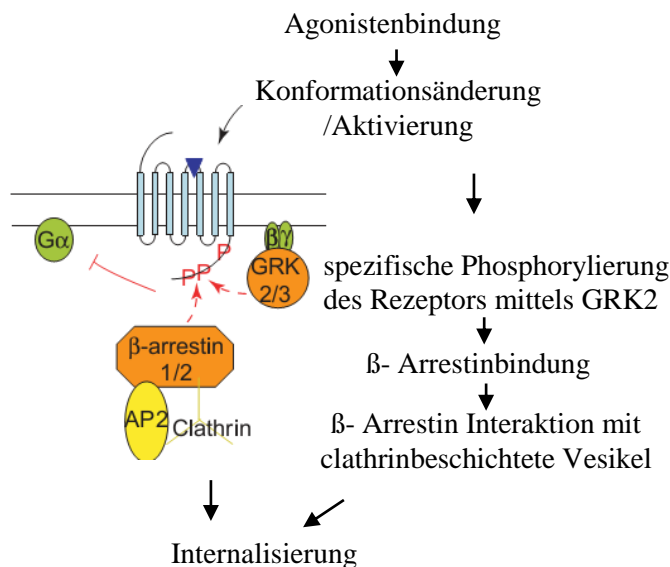


**Abbildung 5: Systematische Übersicht der G-Protein gekoppelten Kinasen.** Zusammenfassend sind 3 Subfamilien entsprechend ihrer Aufteilung nach Homologien innerhalb der N-terminalen, C-terminalen Domänen, inklusive der posttranslationalen Modifikationen und der Interaktionsstellen dargestellt. Die jeweiligen Referenzen sind dem Text zu entnehmen.

Strukturell unterscheiden sich die GRKs am meisten durch die N-terminalen und die C-terminale Domäne. Die aminoternale Domäne dieser Kinasen kann eine Bindungsstelle für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) oder die konservierte, ca. 130 Aminosäuren lange RH-Domäne (*regulator of G-Protein signaling homology*) aufweisen. (Pitcher, et al. 1996, Tesmer 2009) Den größten Unterschied bezüglich der Länge und der posttranslationalen Modifikationen findet man jedoch am carboxyterminalen Ende. Die Subfamilie der Rhodopsinkinase weist ein CAAX-Motiv zur Anheftung eines Terpenrestes auf. (Hisatomi, et al. 1998, Inglese, et al. 1992, Pitcher, et al. 1992) Die GRK4-Subfamilie ist palmitoyliert, das heißt, es werden Palmitinsäuren an Proteincysteinreste angehängt. (Stoffel, et al. 1994, Stony 2004) Die Ausnahme dieser Fraktion bildet die GRK5, deren Wechselwirkungen mit der Membran ausschließlich durch die positiv geladene C-terminale Aminosäuresequenz mit negativ geladenen Gruppen der Membranlipide erfolgen. (Kunapuli und Benovic 1993, Pitcher, et al. 1992) Eine Besonderheit der Subfamilie der Beta-

adrenergen Rezeptorkinasen ist die C-terminale PH-Domäne (*pleckstrine homology*). Diese wird speziell zur Translokation an die Plasmamembran durch die Interaktion mit PIP2 und über die Bindung an die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins benötigt. (Pitcher, et al. 1996, Ribas, et al. 2007) So zeigte die Arbeitsgruppe von Carman, dass eine Punktmutation der PH-Domäne zum Verlust der Bindungskapazität an freie  $\beta\gamma$ -Untereinheit zur Folge hat. (Carman, Barak, et al. 2000) Die strukturelle Gemeinsamkeit aller 7 Kinasen bilden 45% identische Sequenzen der stark konservierten katalytische Domäne, die ein ATP-bindendes zentrales Lysin aufweist. (Carman, Barak, et al. 2000, Kong, Penn und Benovic 1994)

GRKs sind Serin-Threonin phosphorylierende Proteinkinasen, die spezifisch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren phosphorylieren. Die Rezeptorphosphorylierung fördert die Bindung von  $\beta$ -Arrestin, das in Desensibilisierung und clathrinvermittelter Internalisierung des phosphorylierten Rezeptors resultiert, dargestellt in der Abbildung 6. (Kong, Penn und Benovic 1994, Goodman, et al. 1996, Krupnick und Benovic 1998, Lefkowitz und Whalen, Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. 2004, Reiter und Lefkowitz 2006)



**Abbildung 6. Schematische Darstellung der homologen agonistenspezifischen Internalisierung des Phosphorylierten GPCR.**

Die Zeichnung beinhaltet den G-Protein-gekoppelten Rezeptor in hellblau inklusive des gebundenen Agonisten in Dreiecksform. Diese Abbildung ist zur Veranschaulichung der Publikation von Reiter und Lefkowitz entnommen und modifiziert. (Reiter und Lefkowitz 2006)

Beim Prozess der Inaktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann zwischen dem homologen agonistenspezifischen und dem heterologen nicht agonistenspezifischen Mechanismus unterschieden werden. Die homologe Desensibilisierung über die GRKs ist die wichtigste Form der Regulation des G-Protein-gekoppelten Rezeptorsignalweges. Es führt zu einem agonist- und rezeptorspezifischen, schnellen Funktionsverlustes des Rezeptors von 50-70%. (Krupnick und Benovic 1998, Lohse 1993) Der Auslöser dieses Vorgangs ist die Agonistenlangzeitstimulation des Rezeptors. Der Rezeptor bindet einen Agonisten, der zur Konformationsänderung und der damit



verbundenen Aktivierung führt. Die Folge ist eine Interaktion mit dem G-Protein-Heterotrimer, das aus  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Untereinheiten besteht. Es führt zu einem Austausch des GDPs zum GTP an der G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit, was wiederum zur Dissoziation von  $G\alpha$ - von der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Sowohl  $G\alpha$ - von der  $G\beta\gamma$ -Untereinheit sind in der Lage *downstream* Effektoren zu aktivieren. (Lodowski, et al. 2003, Neves, Ram und Iyengar 2002, Hanks und Hunter, Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. 1995) Die aktive Rezeptorform wird von GRKs erkannt, die Kinasen binden spezifisch an den Rezeptor und phosphorylieren diesen. Die Phosphorylierung erhöht die Affinität des Rezeptors zu einem zytosolischen Protein  $\beta$ -Arrestin, dessen Anlagerung sterisch die weitere Signaltransduktion des G-Proteins verhindert. (Goodman, et al. 1996, Krupnick und Benovic 1998, Lefkowitz und Whalen, Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. 2004, Lefkowitz, Stadel und Caron, Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. 1983, Harden 1983) Im Gegenzug verläuft die heterologe Desensibilisierung deutlich langsamer und nicht agonistenspezifisch, wobei die Phosphorylierung des Rezeptors durch die Kinasen der Signalkaskaden wie PKA und PKC eher als Nebenprodukt ohne die Notwendigkeit weiterer Komponenten wie  $\beta$ -Arrestin erfolgt. (Pitcher, et al. 1992, Pitcher, Freedman und Lefkowitz 1998, Roth, et al. 1991) Die entkoppelten Rezeptoren werden anschließend ins Zellinnere transloziert. Dieser Vorgang wird als Internalisierung bezeichnet. Dabei wird das Arrestin, MDM2 vermittelt, ubiquitiniert und ermöglicht eine Bindung des Arrestins an Clathrin, so akkumuliert das Arrestin die GPCR in clathrinbeschichteten Vesikeln und Caveolae. Neben agonistischen Rezeptoren können auch lösliche Proteine wie Phosducin, Phosducin-like Rezeptor,  $\beta$ -Untereinheit des epithelialen  $Na^+$ -Kanals, Ezrin und andere lösliche Substrate von GRKs phosphoryliert werden. Dies ermöglicht die Beteiligung an diversen zellulären Prozessen. (Ribas, et al. 2007)

Aufgrund der globalen Interaktionen des Kandidaten ist es nicht überraschend, dass Zusammenhänge bezüglich der Beteiligung der Kinase GRK2 beim Verlauf von diversen Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Herzinsuffizienz, Morbus Alzheimer, arterielle Hypertonie und Depression ermittelt wurden. (Lympopoulos, Rengo und Koch 2013, Matuzany-Ruban, et al. 2010, Rockman, et al. 1998, Suo und Li 2010, Ungerer, et al. 1993) Ein direkt beschriebener Zusammenhang zwischen bestimmten Tumorerkrankungen und GRK2 ist nicht bekannt, jedoch sind viele onkologische Prozesse mit der Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beschrieben. Fehlerhafte Überexpression der GPCR und ihre para- und autokrine Agonistaktivierung durch die Tumor- oder Stromazellen stellt eine sehr verbreitete Strategie der Krebszellen zur Stimulation der GPCR und ihrer Signalwege dar. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bilden einen Angriffspunkt für Entzündungsmediatoren, was eine mögliche Verbindung zwischen chronischer Entzündung und

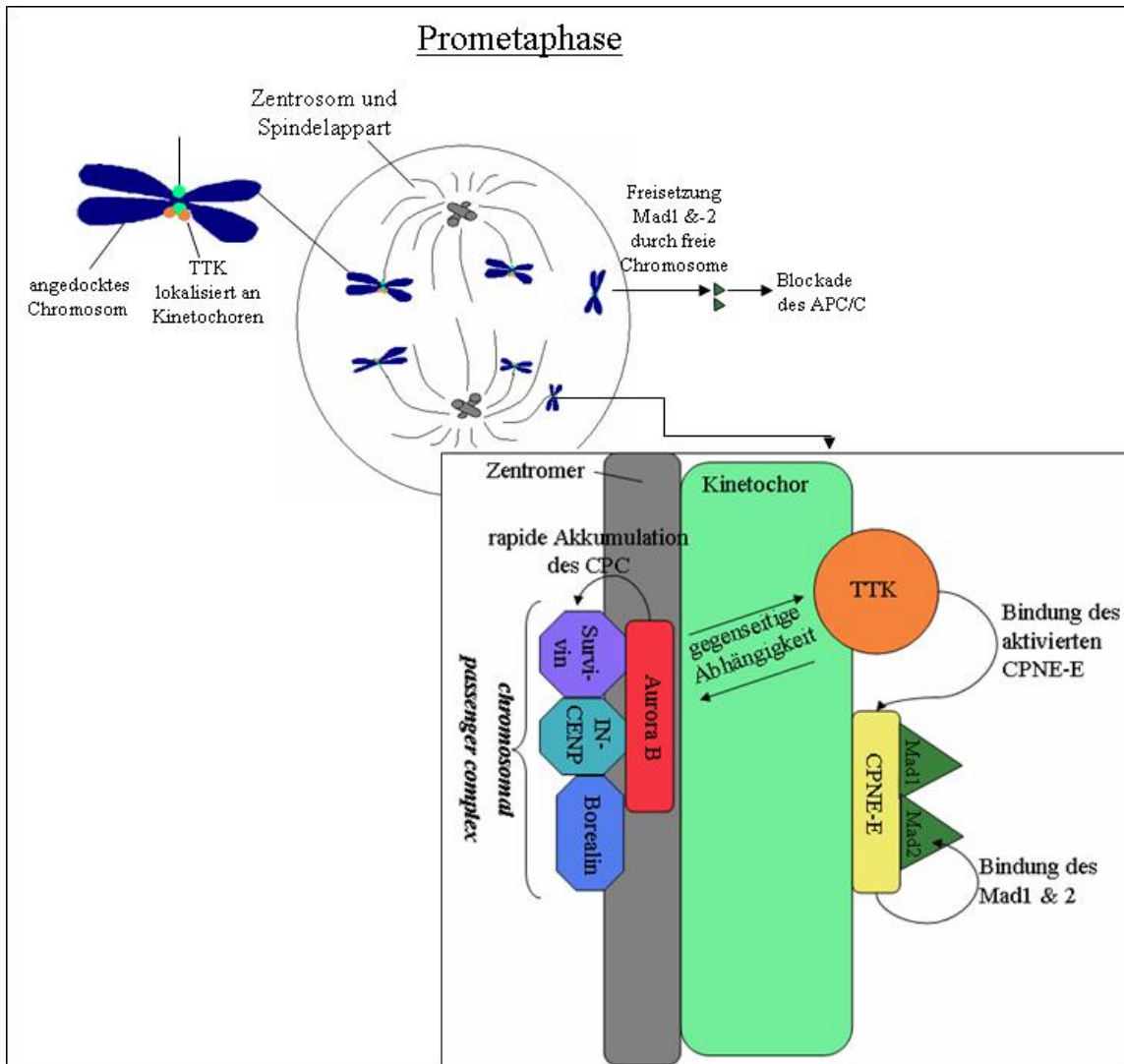
Neoplasien darstellt. Unter anderem ist bekannt, dass die GPCR eine zentrale Rolle in der tumorinduzierten Angiogenese, sowie im Prozess der Metastasierung, speziell bei der Migration der Tumorzellen zu ihren Zielorganen spielt. (Dorsam und Gutkind 2007) Bereits 1986 wurde entdeckt, dass das MAS-1 Onkogen für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kodiert und eine direkte Verbindung zur zellulären Transformation nachgewiesen. (Young, et al. 1986) Viele GPCRs sind überexprimiert in diversen Neoplasien, wobei sie durch die Ligandenaktivierung zur Proliferation der Tumorzellen beitragen. Ebenso spielt eine autokrine und parakrine Sekretion von GPCR-aktivierenden Neuropeptiden eine dominante Rolle bei Überleben und Wachstum aggressiver Neoplasien wie zum Beispiel beim kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC *small cell lung cancer*), Pankreaskarzinom und Prostatakrebs. (Heasley 2001) Die autokrine und/oder parakrine Stimulation, zum Beispiel der *extracellular-signal regulated Kinase*, die über alle Mitglieder der Superfamilie der *mitogen-activated protein kinase*, der c-Jun Kinase, JNK, p38, und der Rho-GTPase, resultiert in der Aktivierung hoch vernetzter, zusammen geschalteter Netzwerke, die die Kontrolle über die Genexpression und unkontrolliertes Tumorzellwachstum haben. (Dorsam und Gutkind 2007)

### 3.1.2 Der Kandidat TTK

Aus dem oben beschriebenen *Kinome-wide Screening* wurde die Kinase TTK als Kandidat mit der höchsten Priorität ausgewählt. Es ist eine Kinase mit dualer Spezifität zur Phosphorylierung sowohl von Serin/ Threonin als auch von Tyrosin. Dieses 95kDa große Enzym ist auch bekannt unter den Synonymen PYT *Phosphotyrosine picked Threonine Kinase*, MSP1, *Monopolar Spindle 1 in Saccharomyces cerevisiae*, Mph1 *Mps1-p like pombe homolog in Saccharomyces pombe* und als murines ESK, *embryonal carcinoma STY Kinase*. (Douville, et al. 1992, He, Jones und Winey 1998, Mills, et al. 1992, Winey, et al. 1991) Nach dem EC-Klassifikationssystem (*enzyme commission numbers*) stuft man sie als Proteinphosphotransferase in die 2. EC Klasse ein.

Eine hohe TTK-Expression auf dem mRNS-Level wurde in vivo und in vitro in schnell proliferierenden Zelllinien und humanem Gewebe wie Thymus und Testikel nachgewiesen, aber nicht oder wenig in anderen benignen Geweben wie Lunge oder Niere. Wiederum zeigte frisch isoliertes Tumorgewebe der Lunge oder auch des Ovarien- und Nierenzellkarzinoms eine detektierbare Expression an TTK-mRNS. Zelllinien wie Neuroblastom-, Melanom-, Ovarienkarzinom- oder hämatopoetische Zelllinien haben während der exponentiellen Wachstumsphasen ebenfalls messbare Expressionen an TTK. (Mills, et al. 1992) Über diese dualspezifische Kinase sind nur wenige Daten verfügbar. Dabei agiert sie bei einem sehr wichtigen zellulären Prozess. Sie ist eine essentielle Komponente des mitotischen Kontrollpunktes SAC, *mitotic spindle assembly checkpoint*, eines Mechanismus zur Überwachung der

Zentrosomenduplikation und des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums. Diese Kontrolle hemmt den Eintritt des Zellzyklus in die Anaphase so lange, bis alle Chromosomen an korrekt an eine Spindel angeheftet sind. Defekte in diesem Mechanismus können einen normalen Ablauf der Mitose stören und fehlerhafte Chromosomentrennung bis hin zur Aneuploidie auslösen. Bei diesem Prozess durchläuft TTK einen ständigen mit der Funktion einhergehenden Lokalisationswechsel. Die initiiierende Transition des TTK-Komplexes zu den sich entwickelnden Kinetochoren, speziell an der äußersten Domäne fibrous corona in der frühen Prometaphase, ist durch die plus-end Motoraktivität des CPNE-E vermittelt. (Mills, et al. 1992, Zhang, et al. 2002, Liu, et al. 2003, Lombillo, et al. 1995, Wang, et al. 2009) Chromosomen, die nicht an den Spindelapparat angedockt haben, setzen eine aktivierte Form von Mad 2, *mitotic arrest deficient 2*, frei, das den APC/C, *anaphase promoting complex/cyclosome*, inhibiert. Da dieser Komplex den proteasomalen Abbau der Anaphaseninhibitoren katalysiert, kommt es kausal zur Blockade der Mitose durch diese freien Chromosomen. Die duale Kinase scheint bei eben diesem Vorgang eine Rolle zu spielen für die Rekrutierung des aktivierten CPNE-E an die Kinetochoren, die die Bindung von Mad 1 und Mad 2 an diese bedingt. (Abrieu, et al. 2001) Die Freisetzung von TTK erfolgt, wenn die Chromosomen sich am Äquator ausrichten. Danach bewegt sie sich zurück zu den Spindelpolen. Das zentrosomale TTK ist in der Lage, die Spindelvollständigkeit und die Dynamik via Phosphorylierung der Maps, *microtubule associated proteins*, oder anderer Proteinen, die in den Prozess der Zentrosomenduplikation involviert sind, zu regulieren. Daraus ergibt sich die Möglichkeit zur Runterregulation des SAC. Während der Interphase ist TTK im Nukleus angrenzend an nukleäre Poren lokalisiert. (Dou, et al. 2003, Sliedrecht, et al. 2010)



**Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der TTK-Interaktionen und Lokalisation an den Kinetochoren während der Prometaphase.** Schematisch dargestellt ist eine Zelle während der Prometaphase des Mitosezyklus. Die duale Kinase ist an den Kinetochormikrotubuli-gebundenen Chromosomen als orange-farbener Kreis dargestellt. Freie Chromosomen setzen Mad1 & -2 ab, die den weiteren Verlauf der Mitose inhibieren. Der vergrößerte Ausschnitt unten links im Bild zeigt die Interaktion der TTK mit dem aktivierten CPNE-E (gelbes Viereck), das die Bindung der Mad1 und 2 bedingt. Des Weiteren ist die Relation zur am Zentromer-lokalisierten Aurora B Kinase (rotes Viereck) abgebildet. Die voneinander abhängige Interaktion fördert die rasche Akkumulation des aus Aurora B, Survivin (violette Achtecke), INCENP (azurblaue Achtecke) und aus Borealin (blaue Achtecke) bestehenden *chromosomal passenger complex*. Die jeweiligen Referenzen sind dem Text zu entnehmen.

Ein besonders bedeutender TTK-Partner ist die Aurora B-Kinase. Zur Veranschaulichung des im Folgenden beschriebenen wurde die Abbildung 7 angelegt. Ebenso wie TTK durchläuft Aurora B einen fließenden Lokalisationswechsel während der Mitose. Sie ist in der Prophase an den Chromosomen, in der Pro- und Metaphase an den Zentrosomen und in der Anaphase an den mitotischen Spindeln lokalisiert. (Chen, et al. 2003, Nijenhuis, et al. 2013) Aurora B bildet die katalytische Einheit des chromosomalen Passagier-Komplexes, *CPC*, *chromosomal passenger*

*complex*, und ist mit der Aufgabe der chromosomalen Segregation, der Chromosomenbewegung und dem Andocken der mitotischen Spindel an die Zentrosomen betraut. (van der Waal, et al. 2012) Der CPC besteht aus einer Gruppe von Proteinen wie Aurora B, sowie nicht enzymatischen Mitgliedern Survivin, Borealin und INCENP und koordiniert den Verlauf der Mitose. Versuche zur Herunterregulation einer dieser Komponenten bewirkten eine fehlerhafte Chromosomenverteilung und Spindelapparatanomalien. (Honda, Körner und Nigg 2003) Zu Beginn der Mitose stimuliert Aurora B via Kinetochorenrekrutierung die mitotischen Kontrollpunkte. Es aktiviert die Checkpointkinase TTK und kann auch unterhalb der mitotischen Kontrollpunktesignalkaskade agieren, um die Hemmung von APC/C aufrecht zu erhalten. (Santaguida und Mussachio, The life and miracles of kinetochores. 2009, Santaguida, Tighe, et al. 2010, Santaguida, Vernieri, et al. 2011) Untersuchungen zeigen, dass TTK und Aurora B eine gegenseitige Abhängigkeit, bei Aurora für die Zentromeraktivität und bei TTK für die Kinetochorenaktivität aufweisen. (Sliedrecht, et al. 2010, Nijenhuis, et al. 2013, van der Waal, et al. 2012, Saurin, et al. kein Datum) Die Aurora B bedingte rapide Chromosomenanlagerung beruht auf Haspin-abhängigen Histon 3-Phosphorylierung und Bub 1-abhängiger H2A-Phosphorylierung, die wieder eine Bindung von Borealin über das Intermediat mit dem Shugoshin (Sgo) ermöglicht. (Wang, et al. 2011) Die TTK-Aktivität verbessert die H2A-Phosphorylierung. Die duale Kinase und Aurora kooperieren in Bezug auf Bub1/H2A/Sgo-Rekrutierung, was zur rapiden Akkumulation des CPC an den Zentromeren und den Beginn der Mitose vorantreibt. (Nijenhuis, et al. 2013, van der Waal, et al. 2012, Jelluma, et al. 2008) Neben der Zellzyklusregulation vermittelt TTK die genomische Stabilität während der Mitose. Es konnte gezeigt werden, dass die duale Kinase das *bloom syndrome protein* BLM, welches zur Familie der RecQ-Helikasen gehört und für den Schutz des Genoms über die Hemmung fehlerhafter Replikation zuständig ist, an der Position Ser144 phosphoryliert. Dies bewirkt wiederum die Rekrutierung von PLK1, die ebenfalls BLM an einer anderen Position phosphoryliert. (Leng, et al. 2006) BLM ist in die DNS-Replikation, -Reparatur und durch den Schaden ausgelöste Signalkaskaden involviert. (Sengupta, et al. 2011) PLK1, *Polo like kinase 1* ist eine M-Phase-Kinase, die an zahlreichen kritischen Prozessen der Zellteilung inklusive des mitotischen Austritts beteiligt ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von BLM durch die beiden Kinasen absolut essentiell ist für die Genomstabilität beim Ablauf der Mitose. (Leng, et al. 2006) Chk2 wurde als neuer Interaktionspartner von TTK beschrieben. Die Checkpoint Kinase 2 phosphoryliert zahlreiche Komponenten wie zum Beispiel Cdc25 und p53 als Antwort auf DNS-Schäden und ist ein Kontrollpunktregulator und Tumorsuppressor. Dies offenbart einen Kreuzungspunkt der mitotischen Kontrollpunkte und DNS-Schaden-Kontrolle. TTK beteiligt sich an der Reaktion auf den DNS-Schaden durch die direkte Aktivierung der Zellzykluskontrolle Kinase Chk2 über die

Phosphorylierung des Thr-68. Chk2 phosphoryliert sowohl p53 und als auch die Zellzyklusphosphatase Cdc25. Inaktivierung von Cdc25 resultiert in Akkumulation des inaktiven Cyclin B, was zum Zellzyklusarrest infolge eines DNS-Schadens führt. Die Phosphorylierung von p53 durch die aktive Chk2 stabilisiert Transkriptionsfaktoren und treibt den Zellzyklusarrest und Apoptose als Antwort auf DNS-Schaden voran. (Wei, et al. 2005) Eine weitere Bezeichnung für TTK ist *cancer/testis Antigene 96*, CT96, weil eine Studie eine Unregelmäßigkeit in der Expression im Tumorgewebe und somit als tumorassoziiertes Antigen und potentiellen neuen Biomarker präsentiert. (Shan, et al. 2013) Bis auf diese Studie sind keine weiteren direkten Zusammenhänge unter Beteiligung der dualen Kinase an Neoplasien und anderweitigen Erkrankungen bekannt.

### 3.2 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten 79 Kandidatengene aus vorausgegangenen Expressionsprofilanalysen mit ermittelten Tumor- oder PanIN-spezifischen Expression durch das Anwenden von Hochdurchsatzanalysen in Form von *reverse transfection microarrays* untersucht werden. Dies beinhaltete transkriptionelle und funktionale Analysen basierend auf der Repression und Überexpression der selektierten Kandidaten zur Bestimmung der Veränderung der Morphologie, Lokalisation der Genprodukte und funktionale Aktivitäten zum Beispiel Apoptose, Proliferation sowie epithelial-mesenchymale Transition. Nach anschließender Validierung der Datensätze sollten Gene mit vielversprechenden signifikanten Effekten für eine tiefergehende Einzelgeneuntersuchung ausgewählt werden. Der zweite Part der praktischen Arbeit befasst sich mit der Klärung der Beteiligung der Kandidatengene *ADRBK1*, gewählt aus den *reverse transfection microarray*-Analysen, und *TTK*, selektiert aus dem *kinome wide screening*, an den pathogenen Mechanismen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.

## 2. Material

### 2.1 Biologisches Material

#### 2.1.1 Eukaryotische Zellen

| <u>Name:</u>                           | <u>Ursprung/Zelltyp:</u>                      | <u>Herkunft:</u>                               |
|--|---|--|
|  | humane  |  |
| BxPC3 (Tan, et al. 1986)               | Pankreasadenokarzinomzelllinie                | ATCC® Manassas (USA)                           |
| Capan-1 (Fogh, Fogh und Orfeo 1977)    | humane<br>Pankreasadenokarzinomzelllinie      | ATCC® Manassas (USA)                           |
| Hek293 (Graham, et al. 1977)           | humane embryonale<br>Nierenzelllinie          | ATCC® Manassas (USA)                           |
| HPDE (Furukawa, et al. 1996)           | humane duktale Pankreaszelllinie              | Furukawa T, Montreal<br>(Kanada)               |
| IMIMPC1 (Vilá, et al. 1995)            | humane<br>Pankreasadenokarzinomzelllinie      | Institute Municipale de<br>Investigatió Médica |
| IMIMPC2 (Vilá, et al. 1995)            | humane<br>Pankreasadenokarzinomzelllinie      | Barcelona (Spanien)                            |
| MIAPaCa-2 (Fountzilias, et al. 1986)   | hum. epitheliale<br>Pankreaskarzinomzelllinie | ATCC® Manassas (USA)                           |
| Panc1 (Lieber, et al. 1975)            | humane  |  |
| PaSCs (Bachem, et al. 1998)            | Pankreaskarzinomzelllinie                     | ATCC® Manassas (USA)                           |
| PaTu-8988S (Elsässer, et al. 1992)     | humane Pankreassternzellen                    | Bachem MG, Ulm                                 |
| PaTu-8988T (Elsässer, et al. 1992)     | humane<br>Pankreasadenokarzinomzelllinie      | DMSZ Braunschweig                              |
| S2-007 (Iwamura, Katsuki und Ide 1987) | humane<br>Pankreasadenokarzinomzelllinie      | DMSZ Braunschweig                              |
| S2-028 (Iwamura, Katsuki und Ide 1987) | humane<br>Pankreaskarzinomzelllinie           | Iwamura T, Japan                               |
|  |   | Iwamura T, Japan                               |

#### 2.1.2 Prokaryotische Zellen

| <u>Bakterienstamm:</u>   | <u>Hersteller:</u>                |
|--|-----------------------------------|
| One Shot® TOP10 Chemically Competent<br>Escherichia coli               | Life technologies™ Carlsbad (USA) |
| One Shot® TOP10F <sup>+</sup> Chemically Competent<br>Escherichia Coli | Life technologies™ Carlsbad (USA) |

### 2.1.3 Gewebe

Die chirurgische Entnahme des genutzten humanen Gewebes wurde unter Einhaltung ethischer Normen sowie dem Einverständnis der Patienten vom chirurgischen Institut der Universität Heidelberg durchgeführt.

### 2.1.4 Enzyme

| <u>Bezeichnung:</u>               | <u>Hersteller:</u>                 |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Age I                             | New England BioLabs® Ipswich (USA) |
| BamH I                            | New England BioLabs® Ipswich (USA) |
| EcoR I                            | New England BioLabs® Ipswich (USA) |
| GoTaq® DNS Polymerase             | Promega Madison (USA)              |
| Omniscript™ Reverse Transcriptase | Qiagen Hilden                      |
| ProteaseArrest™                   | G-Biosciences Saint Louis (USA)    |
| Trypsin/EDTA                      | Life technologies™ Carlsbad (USA)  |

### 2.1.5 Antibiotika

| <u>Bezeichnung/ Konzentration:</u> | <u>Hersteller:</u>                         |
|------------------------------------|--|
| Ampicillin (50mg/mL)               | Sigma Aldrich® Steinheim                   |
| Doxycyclin (2mg/mL)                | Sigma Aldrich® Steinheim                   |
| Gentamicin (10mg/mL)               | GE Healthcare Bio-Science Piscataway (USA) |
| Kanamycin (50mg/mL)                | Sigma Aldrich® Steinheim                   |
| Puromycin (10mg/mL)                | InvivoGen Toulouse (France)                |

### 2.1.6 Antikörper

| <u>Antikörperbezeichnung:</u> | <u>Wirt:</u> | <u>Verdünnung/<br/>Anwendung</u> | <u>Katalog-<br/>Nr.:</u> | <u>Hersteller:</u>                        |
|-------------------------------|--------------|----------------------------------|--------------------------|---|
| Anti Cyclin D1 (SP4) ab16663  | Kaninchen    | 1:200 /IF                        | #4135                    | abcam® Cambridge (UK)                     |
| Anti β-Aktin HRP-linked       | Kaninchen    | 1: 30000/WB                      | sc-1616                  | Santa Cruz biotechnology Santa Cruz (USA) |
| anti-Active® Caspase-3        | Kaninchen    | 1:150/IF                         | #G7481                   | Promega Madison (USA)                     |



## 2. Material

|                            |           |            |               |   |
|----------------------------|-----------|------------|---------------|---|
| Anti-E-Cadherin            | Maus      | 1:100/IF   | #610181       | BD Franklin Lakes<br>(USA)                      |
| Anti-mouse Cy3 conjugated  | Ziege     | 1500/IF    | ab697035      | abcam® Cambrige<br>(UK)                         |
| Anti-mouse IgG             | Pferd     | 1:5000/WB  | #7076         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |
| Anti-Msp1                  | Maus      | 1:1000/WB  | #05-682       | Merck Millipore<br>Darmstadt                    |
| Anti-Rabbit Cy3 conjugated | Ziege     | 1:500/IF   | ab6939        | abcam® Cambrige<br>(UK)                         |
| Anti-Rabbit HRP-linked     | Ziege     | 1:10000/WB | #7074         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |
| c- myc (9E10)              | Maus      | 1:1000/WB  | sc-40         | Santa Cruz<br>biotechnology Santa<br>Cruz (USA) |
| Caspase-3                  | Kaninchen | 1:1000/WB  | #9662         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |
| Cleaved Caspase-3 (Asp175) | Kaninchen | 1:1000/WB  | #9661         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |
| Cyclin B1                  | Maus      | 1:2000/WB  | #4135         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |
| Cyclin B1 [V152]           | Maus      | 1:200/IF   | ab72          | abcam® Cambrige<br>(UK)                         |
| Cyclin D1 (DCS6)           | Maus      | 1:2000 /WB | #2926         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |
| GRK2 (3F8)                 | Maus      | 1:1000/WB  | MA5-<br>15840 | Thermo Fisher<br>Scientific Waltham<br>(USA)    |
| Ki67                       | Kaninchen | 1:400/IF   | ab833         | abcam® Cambrige<br>(UK)                         |
| p15 INK4B                  | Kaninchen | 1:1000/WB  | #4822         | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA)  |

|                                 |           |            |         |  |
|---------------------------------|-----------|------------|---------|--|
| p21                             | Maus      | 1:1000/WB  | #2946   | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA) |
| PARP                            | Kaninchen | 1:1000/WB  | #9542   | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA) |
| Phospho-Histone H2A.X<br>(20E3) | Kaninchen | 1:1000 /WB | #9718   | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA) |
| Survivin (6E4)                  | Maus      | 1:1000/WB  | #2802   | Cell Signaling<br>Technology® Danvers<br>(USA) |
| Vimentin [Vim3B4]               | Maus      | 1:200/IF   | ab28028 | abcam® Cambrige<br>(UK)                        |

## 2.2 Chemikalien

### Bezeichnung:

### Hersteller:

|   |                                    |
|---|------------------------------------|
| (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)          | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| (Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]ether)Triton®x-100 | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)                                 | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| 4% Paraformaldehyd  | USB® Cleveland (USA)               |
| 5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion (Luminol )                         | Sigma Aldrich Saint Louis (USA)    |
| Acrylamid   | AppliChem Darmstadt                |
| Agarose   | Sigma Aldrich® Steinheim           |
| Amersham <sup>TM</sup> ECL (Plus)   | GE Healthcare Europe GmbH Freiburg |
| Ammoniumperoxodisulfat  | Merck Darmstadt                    |
| BD Bacto <sup>TM</sup> Agar   | BD Biosciences Heidelberg          |
| Bisacrylamid  | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| Borsäure  | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| Bovines Serumalbumin  | Sigma Aldrich Deisenhofen          |
| Bromphenolblau  | Sigma Aldrich Deisenhofen          |
| Calciumchlorid  | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| Chloroform  | Carl Roth GmbH Karlsruhe           |
| Chlorwasserstoffsäure   | Merck Darmstadt                    |

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent | Thermo Fisher Scientific Waltham (USA) |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate       | Fermentas GmbH Sankt Leon Roth         |
| DharmaFECT®                           | Thermo Fisher Scientific Waltham (USA) |
| Didestilliertes Wasser Ampuwa®        | Fresenius Kabi GmbH Bad Homburg        |
| Dimethylsulfoxid                      | Sigma Aldrich Deisenhofen              |
| Dithiothreitol                        | Serva Electrophoresis Heidelberg       |
| Effectene                             | Qiagen Hilden                          |
| Essigsäure                            | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Ethanol                               | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Ethidiumbromid                        | Sigma Aldrich® Steinheim               |
| Ethylendiamintetraessigsäure          | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Formaldehyd 37%                       | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Gelatine                              | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Glycerin 87%                          | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Glycin                                | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Isopropanol                           | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Kaliumdihydrogenphosphat              | Merck Darmstadt                        |
| Kaliummethanolat                      | Merck Darmstadt                        |
| Kollagen Typ I                        | Sigma Aldrich® Steinheim               |
| Kristallviolett                       | Serva Electrophoresis Heidelberg       |
| Lipofectamine™2000                    | Life Technologies™ Carlsbad (USA)      |
| Luria Agar                            | Sigma Aldrich® Steinheim               |
| Luria Broth Reagenz                   | Sigma Aldrich® Steinheim               |
| Magermilchpulver                      | Sigma Aldrich® Deisenhofen             |
| Magnesiumchlorid                      | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Magnesiumsulfat                       | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Mangan (II)-chlorid                   | Sigma Aldrich® Steinheim               |
| Methanol                              | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| MitoTracker®Red CMXRos                | Invitrogen™ Carlsbad (USA)             |
| Natriumchlorid                        | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Natriumhydrogenphosphat               | Merck Darmstadt                        |
| Natriumhydroxid                       | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Natriumlaurylsulfat (SDS)             | Carl Roth GmbH Karlsruhe               |
| Ponceaurot                            | Sigma Aldrich® Steinheim               |

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Propanon  | Carl Roth GmbH Karlsruhe            |
| Propidiumiodid  | Sigma Aldrich® Steinheim            |
| QIAzol® Lysis Reagent                                   | Qiagen Hilden                       |
| Rubidiumchlorid   | Merck Darmstadt                     |
| siLentFect™   | Bio-Rad München                     |
| Slim-Fast®  | Allpharm Vertrieb GmbH Messel       |
| SYBR® Green   | Life technologies™ Carlsbad (USA)   |
| Tetramethylethyldiamin                                  | Carl Roth GmbH Karlsruhe            |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                        | Carl Roth GmbH Karlsruhe            |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane-hydrochloride           | Carl Roth GmbH Karlsruhe            |
| Tween 20  | Sigma Aldrich® Steinheim            |
| Vectashield® Mounting Medium with DAPI                  | Vector Laboratories Burlingame (CA) |
| Wasserstoffperoxid                                      | Carl Roth GmbH Karlsruhe            |
| Amersham™ECL (Plus) Western Blotting Detection Reagents | GE Healthcare Europe GmbH Freiburg  |

## 2.3 Verbrauchsmaterial

| <u>Bezeichnung:</u>                            | <u>Hersteller:</u>             |
|--|--------------------------------|
| 0,2mL PCR Röhrchen                             | greiner bio-one Frickenhausen  |
| 0,5mL Reagiergefäße                            | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf |
| 1,25mL Combitips Biopure®/plus                 | Eppendorf Hamburg              |
| 1,5mL Reagiergefäße                            | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf |
| 10µL Pipettenspitzen für Pipettierautomat      | Tecan Group Ltd. Crailsheim    |
| 100µL Pipettenspitzen für Pipettierautomat     | Tecan Group Ltd. Crailsheim    |
| 1000mL Laborglasflaschen mit Schraubverschluss | Schott Duran® Mainz            |
| 1000mL Messzylinder                            | Schott Duran® Mainz            |
| 100mL Laborglasflaschen mit Schraubverschluss  | Schott Duran® Mainz            |
| 10cm Zellkulturschalen                         | greiner bio-one Frickenhausen  |
| 10mL Pipettenspitzen                           | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf |
| 12 Loch Kulturplatten                          | greiner bio-one Frickenhausen  |
| 12,5mL Combitips Biopure®/plus                 | Eppendorf Hamburg              |
| 12mL rundboden Polypropylenröhrchen            | greiner bio-one Frickenhausen  |
| 12mL Transfektionsröhrchen                     | greiner bio-one Frickenhausen  |

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| 15mL konische Zentrifugenröhrchen                | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf   |
| 2,0mL Reagiergefäße                              | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf   |
| 200mL Messzylinder                               | Schott Duran® Mainz              |
| 24 Loch Kulturplatten                            | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 25 x 60mm Deckgläser                             | Menzel-Gläser Braunschweig       |
| 250mL Erlenmeyerkolben                           | Schott Duran® Mainz              |
| 25mL Pipettenspitzen                             | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf   |
| 25mm runde Deckgläser                            | Menzel-Gläser Braunschweig       |
| 2mL Cryo.s™ Einfrierröhrchen                     | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 2mL Pipettenspitzen                              | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 48 Loch Kulturplatten                            | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 500mL Erlenmeyerkolben                           | Schott Duran® Mainz              |
| 500mL Laborglasflaschen mit Schraubverschluss    | Schott Duran® Mainz              |
| 50mL konische Zentrifugenröhrchen                | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf   |
| 50mL Pipettenspitzen                             | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 5mL Combitips Biopure® /plus                     | Eppendorf Hamburg                |
| 5mL Einwegspritzen                               | B. Braun Melsungen AG Berlin     |
| 5mL Pipettenspitzen                              | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 5mm runde Deckgläser                             | Menzel-Gläser Braunschweig       |
| 6 Loch Zellkulturplatten                         | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf   |
| 96 Loch Kulturplatten                            | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 96- Loch Polystyrol µClear® F-Boden Mikroplatten | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 96- Loch U-Boden Microplatte                     | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 96 Loch- Zellkulturmikroplatte, PS, U-Boden,     | greiner bio-one Frickenhausen    |
| 96-Loch View Plate FTC                           | Perkin Elmer Waltham (USA)       |
| BrdU Platten                                     | Massachusetts (USA)              |
| CELLSTAR® 96 Lochmikroplatte                     | greiner bio-one Frickenhausen    |
| DIAMOD® Standard Pipettenspitzen D10             | Gilson® Middleton (USA)          |
| DIAMOD® Standard Pipettenspitzen D1000           | Gilson® Middleton (USA)          |
| DIAMOD® Standard Pipettenspitzen D200            | Gilson® Middleton (USA)          |
| Einwegnadeln                                     | B. Braun Melsungen AG Berlin     |
| Falcon™ Mikrotiterplatten PRIMARIA               | Becton Dickinson GmbH Heidelberg |
| Kosmetiktuch                                     | Igefa Ahrensfelde                |
| Latexhandschuhe                                  | VWR Darmstadt                    |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Nitrocellulose-Membran        | Schleicher und Schüll Dassel                  |
| Parafilm                      | Pechiney Plastic Packaging Inc. Chicago (USA) |
| PVDF-Membran                  | Merck Millipore Darmstadt                     |
| quadriPerm® Zellkulturplatten | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf                |
| Röntgenfilm 18 x 24cm         | CEA Hamburg                                   |
| Sterilfilter 0,2µm            | Schleicher und Schüll Dassel                  |
| Sterilfilter 0,45µm           | Schleicher und Schüll Dassel                  |
| SuperFrost® Plus Objektträger | Menzelgläser Braunschweig                     |
| SuperFrost®Plus Objektträger  | Menzel-Gläser Braunschweig                    |
| T175 Zellkulturflaschen       | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf                |
| T25 Zellkulturflaschen        | greiner bio-one Frickenhausen                 |
| T75 Zellkulturflaschen        | greiner bio-one Frickenhausen                 |
| Whatman Blotting Papier       | Schleicher und Schüll Dassel                  |
| Zellschaber                   | Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf                |

## 2.4 Medien, Puffer und Rezepturen

Bezeichnung:

Hersteller:

|  |   |
|--|---|
| Dulbecco`s Modified Eagle Medium,<br>Low Glucose, Pyruvate | GIBCO®, Life technologies™ Carlsbad (USA)       |
| Dulbecco`s Modified Eagle Medium,<br>Low Glucose, Pyruvate | PAA, GE Healthcare Bio-Science Piscataway (USA) |
| Fetales Kälberserum  | PAA, GE Healthcare Bio-Science Piscataway (USA) |
| Phosphat gepufferte Saline                                 | PAA, GE Healthcare Bio-Science Piscataway (USA) |

|  |                 |
|--|-----------------|
| <u>0,1% TBS-Waschpuffer mit Tween® 20:</u> | <u>Volumen:</u> |
| Tween® 20                                  | 1mL             |
| TBS  | 999mL           |

|  |                      |
|--|----------------------|
| <u>10x TBE-Puffer:</u>                 | <u>Menge/Volumen</u> |
| Tris(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) | 108g                 |
| Borsäure                               | 55g                  |
| 0,5M Na <sub>2</sub> EDTA              | 40mL                 |
| pH auf 8,3 einstellen                  |                      |
| auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen  |                      |

---

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| <u>10x WB-Laufpuffer:</u>             | <u>Menge:</u> |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan       | 30,3g         |
| Glycin                                | 144g          |
| Natriumdodecylsulfat                  | 10g           |
| auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen |               |

|  |                      |
|--|----------------------|
| <u>4x SDS-Puffer:</u>                            | <u>Menge/Volumen</u> |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan<br>hydrochloride | 2g                   |
| Bromphenolblau                                   | 25mg                 |
| ddest. Wasser                                    | 25mL                 |
| auf 45mL mit Glycerol auffüllen                  |                      |
| pH auf 6,8 einstellen                            |                      |

|                                       |                      |
|---------------------------------------|----------------------|
| <u>Blotting-Puffer:</u>               | <u>Menge/Volumen</u> |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan       | 3,03g                |
| Glycin                                | 14,4g                |
| Natriumdodecylsulfat                  | 1,0g                 |
| Methanol                              | 200mL                |
| auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen |                      |

|  |                      |
|--|----------------------|
| <u>Sammelgelpuffer:</u>                  | <u>Menge/Volumen</u> |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan          | 12,11g               |
| 20% Natriumdodecylsulfat                 | 4mL                  |
| auf 200mL mit H <sub>2</sub> O auffüllen |                      |
| pH auf 6,8 einstellen                    |                      |

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| <u>TBS-Puffer:</u>                    | <u>Menge:</u> |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan       | 6,05g         |
| NaCl                                  | 8,76g         |
| auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen |               |
| pH auf 7,6 einstellen                 |               |

|  |                      |
|--|----------------------|
| <u>TE-Puffer:</u>                        | <u>Menge/Volumen</u> |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan          | 12,14g               |
| 0,5M EDTA                                | 20mL                 |
| auf 100mL mit H <sub>2</sub> O auffüllen |                      |
| pH auf 8,0 einstellen                    |                      |

| <u>Trenngel:</u>                         | <u>Menge/Volumen</u> |
|--|----------------------|
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan          | 36,34g               |
| 20% Natriumdodecylsulfat                 | 4mL                  |
| auf 200mL mit H <sub>2</sub> O auffüllen |                      |
| pH auf 8,8 einstellen                    |                      |

## 2.5 Kits

| <u>Bezeichnung:</u>                                  | <u>Hersteller:</u>                    |
|--|---------------------------------------|
| Cell Proliferation ELISA, BrdU<br>(chemiluminescent) | Roche Applied Science Basel (Schweiz) |
| NucleoBond® PC 500                                   | Macherey-Nagel GmbH Düren             |
| NucleoSpin® Plasmid                                  | Macherey-Nagel GmbH Düren             |
| Omniscript® Reverse Transcription Kit (200)          | Qiagen Hilden                         |
| PageRuler Prestained Protein Ladder 10-170 kDa       | Thermo Fisher Scientific Sankt Leon   |
| peqGOLD Total RNA Kit®                               | PeqLab Biotechnologie GmbH Erlangen   |
| Qiagen RNeasy® Mini Kit                              | Qiagen Hilden                         |
| QIAquick Gel Extraction Kit                          | Qiagen Hilden                         |

## 2.6 Geräte

| <u>Bezeichnung:</u>                                  | <u>Hersteller:</u>                |
|--|-----------------------------------|
| 10µL Einkanalpipetten DISCOVERY Comfort<br>DV10C     | ABIMED GmbH Langenfeld            |
| 100µL Einkanalpipetten DISCOVERY Comfort<br>DV100C   | ABIMED GmbH Langenfeld            |
| 1000µL Einkanalpipetten DISCOVERY Comfort<br>DV1000C | ABIMED GmbH Langenfeld            |
| 7500 Fast Real- Time PCR System                      | Life technologies™ Carlsbad (USA) |
| Analysewaage Mettler AE 163                          | Mettler- Toledo GmbH Gießen       |
| Autoklav 3850 EL                                     | Tuttnauer Breda Niederlande       |
| BD LRS II Flow Cytometer                             | BD Biosciences Heidelberg         |
| Brutschrank 6000                                     | Heraeus Instruments Dreiech       |
| Cell Observer® Fluoreszenz Mikroskop                 | Carl Zeiss Jena                   |



|  |  |
|--|--|
| Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer       | Berthold Technologies GmbH Bad Wildbad           |
| ChemoCam                                     | Intas Science Imaging Instruments GmbH Göttingen |
| DNA Engine® Thermal Cycler                   | Bio- Rad München                                 |
| Electrophoresis Power Supply EPS 3500        | GE Healthcare Europe GmbH Freiburg               |
| Elektrophoresekammer                         | Thermo Fisher Scientific Sankt Leon Rot          |
| Feinwaage BP 110S                            | Sartorius AG Göttingen                           |
| Gefriertank HC35                             | Taylor-Wharton Thodore (USA)                     |
| Inkubationsbad 1003                          | GFL Burgwedel                                    |
| Kippschüttler PMR-30                         | Kobe Marburg                                     |
| Luminometer Centro LB 960                    | Berthold Technologies GmbH Bad Wildbad           |
| Magnetrührer MR2002                          | Heildolph Instruments Schwabach                  |
| Mehrkanalpipette Eppendorf Research 10-100µL | Eppendorf hamburg                                |
| Mikroskop                                    | Olympus Europa GmbH Hamburg                      |
| Mikrowelle VIP 20                            | Bauknecht Hausgeräte GmbH Stuttgart              |
| Miniprep 75                                  | Tecan GmbH Crailsheim                            |
| Multipette®                                  | Eppendorf Hamburg                                |
| Multiscan® FC Microplate Photometer          | Thermo Fisher Scientific Sankt Leon Rot          |
| NanoDrop® ND-1000                            | PeqLab Biotechnologie GmbH Erlangen              |
| pH-Meter 761 Calimatic                       | Knick Berlin                                     |
| Pipetboy Acu                                 | Integra Biosciences Zizers (Schweiz)             |
| Sterilbank Bio-II-A                          | Telstar Terrasa (Spanien)                        |
| Techne Dri- Block DB- 2A                     | Kobe Marburg                                     |
| Thermo Scientific Heraeus® Multifuge®        | Thermo Scientific GmbH Dreieich                  |
| Thermomixer 5436                             | Eppendorf Hamburg                                |
| Tiefkühlager Hera Freez                      | Thermo Electron Corporation Karlsruhe            |
| TopSpot® E-Microarray Spotter                | BioFludix GmbH, Freiburg                         |
| Vortexer VF2                                 | IKA Labortechnik Staufen                         |
| Waage Mettler PJ3600 Delta Range             | Mettler- Toledo GmbH Giessen                     |
| Zentrifuge Cryofuge 5000                     | Heraeus Instruments Dreieich                     |
| Zentrifuge Laborfuge 400e                    | Heraeus Instruments Dreieich                     |
| Zentrifuge Rotixa 120R                       | Hettich GmbH Tuttlingen                          |
| Zentrifuge Varifuge K                        | Heraeus Instruments Dreieich                     |
| Zentrifuge Heraues Multifuge 3SR+            | Thermo Scientific GmbH Dreieich                  |
| Zentrifuge Heraues Pico 17                   | Thermo Scientific GmbH Dreieich                  |

## 2.7 Gentechnische Elemente

### 2.7.1 Primer & Oligo\_dT

| <u>Primerpaarbezeichnung:</u> | <u>Sequenz:</u>            | <u>Hersteller:</u>  |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------|
| ADRBK1_forw:                  | CAGAAATTCATTGAGAGCGATAAGTT | Biomers GmbH<br>Ulm |
| ADRBK1_rev:                   | TGCGATGCACGCTGAAGT         |                     |
| RPLP0_forw:                   | CCAGGCGTCCTCGTGGAAGTG      | Biomers GmbH<br>Ulm |
| RPLP0_rev:                    | TTCCCGCGAAGGGACATGCG       |                     |
| TTK_forw:                     | TGGCCAACCTGCCTGTTT         | Biomers GmbH<br>Ulm |
| TTK_rev:                      | AATGCATTCATTTGCTGAAGAAGA   |                     |
| TTKmus_forw:                  | AAAGCAGATAGGCAGTGGAGGTT    | Biomers GmbH<br>Ulm |
| TTKmus_rev:                   | ATCGGCGTCTTCTAGGTTTACA     |                     |
| XS13_MenschMaus_forw:         | TGGGCAAGCCCACCATGATG       | Biomers GmbH<br>Ulm |
| XS13_MenschMaus_rev:          | AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT     |                     |

### 2.7.2 small interfering RNS-Sequenzen

| <u>Zielgen:</u> | <u>Bezeichnung:</u> | <u>Silencer® Select siRNA<br/>from Ambion® ID:</u> | <u>Katalognr:</u> | <u>Hersteller:</u>                      |
|-----------------|---------------------|--|-------------------|---|
| <i>ADRBK1</i>   | siRNS1:             | s1127  | 4390824           | Life<br>Technologies™<br>Carlsbad (USA) |
| <i>ADRBK1</i>   | siRNS2:             | s1128  | 4390824           |   |
| <i>ADRBK1</i>   | siRNS3:             | s1129  | 4390824           |   |
| <u>Zielgen:</u> |                     | <u>FlexiTube siRNA ID:</u>                         | <u>Katalognr:</u> | <u>Hersteller:</u>                      |
| <i>TTK</i>      | siRNS2:             | 7272   | SI02223214        | QIAGEN<br>Hilden                        |
| <i>TTK</i>      | siRNS6:             | 7272   | SI02223207        |   |
| <i>TTK</i>      | siRNS7:             | 7272   | SI00050701        |   |

## 2.8 Software

Programmbezeichnung:

Hersteller:

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System

Life Technologies™ Carlsbad (USA)

ChemoCam Analysesoftware

Intas Science Imaging Instruments GmbH Göttingen

FlowJo

Tree Star Inc. Ashland (USA)

ModFit LT™

Verity Software House, Topsham (USA)

System-Software AxioVision

Carl Zeiss Jena

*Time Lapse Analyser open source software* <http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/tla/>  
(Huth, et al. 2011)

Universität Ulm

---

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Zellkultivierung

Die Zelllinien Hek-293, S2-007, S2-028, 8988T, Panc-1 wurden mit DMEM komplett (10% FKS, 10µg/mL Gentamicin) bei 37°C, 5%-Kohlenstoffdioxid in T75-Zellkulturflaschen in Kultur gehalten. Bei 80% Konfluenz wurden die Zellen mit 5mL PBS gewaschen, 3mL Trypsin/EDTA abgelöst und mit 7mL DMEM komplett aufgefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension entsprechend ihrer Wachstumsrate verdünnt in eine neue T75-Zellkulturflasche überführt. Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter dem Lichtmikroskop begutachtet und in regelmäßigen Abständen anhand von Mykoplasmentests auf Kontamination untersucht.

#### 3.1.2 Zellen auftauen

Die kryokonservierten Zellen wurden in einem Wasserbad bei Zimmertemperatur, bis ein Eiskern übrig blieb, aufgetaut. Der Kryoröhrcheninhalt wurde in ein 50mL Röhrchen, das mit 15mL kaltem DMEM komplett Medium gefüllt war, vorsichtig überführt. Diese Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 300 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit frischem DMEM komplett Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Kulturgefäß überführt und anschließend bei 37 °C und 5%-Kohlenstoffdioxid im Brutschrank bebrütet.

#### 3.1.3 Kryokonservierung

Die für die Konservierung vorgesehenen Zellen sollten sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Diese wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Flasche abgelöst, mit DMEM komplett Medium resuspendiert und 5 Minuten bei 300 x g pelletiert. Das Pellet wurde im 10%-Dimethylsulfoxid-haltigem fetalem Kälberserum aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension zügig in ein Kryoröhrchen überführt und mit einer Temperatursenkung von -1°C pro Minute in einem *Cryocontainer* auf -70°C abgekühlt. Zur Langzeitlagerung wurden die Zelllinienstämme in einen Stickstofftank verwahrt.

#### 3.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Quantifizierung der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dafür sollte das Deckglas auf das Zählfeld der Kammer so auflegen werden, das die Newton'schen Ringe erscheinen. 10µL der Zellsuspension wurden in die Zählkammer, unter Vermeidung von Luftblasen, eingefüllt.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen in den 4 Großquadraten ausgezählt. Dabei wurde beachtet, dass die Anzahl zwischen 10 und 50 Zellen pro Quadrat betrug. Aus der Summe der ausgezählten Großquadrate wurde ein Durchschnittswert gebildet. Das Volumen der Großquadrate, berechnet aus der Fläche von  $1\text{mm}^2$  und einer Höhe  $0,1\text{mm}$ , liegt bei  $0,1\text{mm}^3$  was  $0,1\mu\text{L}$  entspricht. Somit erhält man die durchschnittliche Zellzahl pro  $0,1\mu\text{L}$ , bei einer Multiplikation mit dem Faktor  $10^4$  errechnet man die Anzahl der Zellen pro mL.

#### 3.1.5 Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen in Zellkulturplatten auf autoklavierte Rundgläschen unter Antibiotikaentzug für 48h kultiviert. Anschließend wurden die Gläschen mit PBS gewaschen, mit 4%-Paraformaldehydlösung für 10 Minuten fixiert und mit *Vectashield® Mounting Medium with DAPI* eingedeckelt. Die Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop auf Färbung bakterieller DNS (extranukleäre DAPI-Signale) untersucht.

#### 3.1.6 Transfektion mit Lipofectamine® 2000

Zunächst wurde in Polypropylenrundbodenröhrchen eine entsprechende Menge antibiotikumfreies serumarmes Medium vorgelegt. Anschließend wurde Lipofectamine dazu pipettiert, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNS wurde ebenfalls in ein separates Polypropylenrundbodenröhrchen mit vorgelegtem, antibiotikumfreiem, serumarmem Medium dazu pipettiert. Der Lipofectamine-Medium-Mix wurde zum DNS-Medium-Ansatz dazu pipettiert, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit wurde genutzt um einen Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen durchzuführen und eine entsprechende Menge an DMEM komplett vorzulegen. Bei schwer transfizierbaren Zelllinien oder Konstrukten konnte auch bei diesem Schritt zur Steigerung der Effizienz antibiotikumfreies serumarmes Medium verwendet werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und die Platte anschließend langsam geschwenkt. Die Konfluenz der Zellen betrug am Tag der Transfektion 70-90% und der Transfektionsmediumwechsel erfolgte nach 4-stündiger Inkubationszeit. Das Verhältnis, der von uns eingesetzten DNS-Menge in  $\mu\text{g}$  zum Volumen an Lipofectamine® in  $\mu\text{L}$  lag bei 1:2,5. Die Endkonzentration von DNS betrug  $1,6\mu\text{g/mL}$  Medium.

#### 3.1.7 Transfektion mit siLentFect™

In Polypropylenrundbodenröhrchen wurde eine entsprechende Menge an antibiotikumfreiem Medium vorgelegt. Das siLentFect™ wurde dazu pipettiert und vorsichtig gemischt. Die siRNS

wurde in ein separates, mit antibiotikumfreiem Medium gefülltes Polypropylenrundbodenröhrchen pipettiert. Die Ansätze inkubierten 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der siLentFect™-Medium-Mix wurde zum siRNS-Medium-Ansatz pipettiert, vorsichtig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit wurde genutzt, um bei den zu transfizierenden Zellen ein Mediumwechsel durchzuführen und anschließend eine entsprechende Menge an DMEM komplett vorzulegen. Bei schwer transfizierbaren Zelllinien oder Konstrukten konnte auch bei diesem Schritt zur Steigerung der Effizienz antibiotikumfreies, serumarmes Medium verwendet werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und die Platte anschließend langsam geschwenkt. Die Konfluenz der Zellen betrug am Tag der Transfektion 70-90%. Der Transfektionsmediumwechsel bei Hek293 Zellen erfolgte nach 4h, bei allen anderen Zelllinien nach 9h. Das Verhältnis des eingesetzten siLentFect-Volumens in  $\mu\text{L}$  zum Volumen an  $20\mu\text{M}$  siRNS in  $\mu\text{L}$  lag bei 1,5:2,0. Die Endkonzentration der siRNS betrug  $20\text{nM}$ .

## 3.2 Funktionelle Analysen

### 3.2.1 Zellviabilitätstest (Mossmann 1983)

Die Zellen wurden unter Berücksichtigung ihrer Wachstumsrate in 24-Lochplatten ausgesät und 24h später transfiziert. 72h nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend haben wir  $184\mu\text{L}$  serumfreies DMEM-Medium auf die Zellen vorgelegt und  $16\mu\text{L}$  3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid gelöst im PBS mit einer Konzentration von  $5\text{mg/mL}$  dazu pipettiert. Das MTT-Reagenz ist toxisch, somit wurde die Platte je nach Sensibilität der jeweiligen Zelllinie 1 bis 2h bei  $37^\circ\text{C}$  5%-Kohlenstoffdioxid im Brutschrank unter Beobachtung bebrütet. Das 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid wird durch Dehydrogenasen lebender Zellen reduziert, als blau bis violett gefärbte Formazankristalle in den Zellen akkumuliert und stellt somit ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen dar. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die MTT-Medium-Lösung abpipettiert und die Zellen mit  $200\mu\text{L}$  DMSO 5 Minuten auf dem Laborschüttler lysiert.  $200\mu\text{L}$  mit PBS verdünntes Lysat wurde in eine U-Boden 96-Loch-Mikrozellkulturplatte pipettiert und die Extinktion kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von  $570\text{nm}$  mittels Multiscan® FC Microplate Photometer bestimmt. Dabei wurde beachtet, dass die Messwerte der Kontrollen im Bereich 0,1-1,0 lagen und dies schon bereits der Verdünnung der Lysate mit PBS berücksichtigt.

### 3.2.2 Zellproliferations-ELISA (Portsmann und Ternynck 1985)

Der Einbau des phosphorylierten Bromdesoxyuridins, ein Analog des Desoxyuridins, in der S-Phase des Zellzyklus kann mit dem *Anti-BrdU-POD*-Antikörper detektiert werden und damit die Proliferationsraten über das relative Maß an DNS-Synthese quantifizieren. Je nach Zelllinie wurden zwischen 2.000-4.000 Zellen pro Plattenvertiefung einer 96-Loch *ViewPlate* unter Berücksichtigung von Hintergrundkontrollen ausgesät. Als Schutz vor Austrocknung wurden die äußeren Vertiefungen der Platte mit PBS versehen und zusätzlich durch eine feuchte Kammer im Brutschrank geschützt. 24h nach der Aussaat wurden die Zellen transfiziert, 48h nach Transfektion das Medium abgenommen, die Zellen mit 100µL *BrdU labeling solution* 4h bei 37 °C, 5%-Kohlenstoffdioxid im Brutschrank markiert. Danach wurde die Platte über Kopf ausgeklopft und nach Herstellerprotokoll für das *Cell Proliferation ELISA, BrdU* Kit von Roche, allerdings mit modifizierten Inkubationszeiten, weiter verfahren. Die Zellen wurden 1h fixiert und 1,5h mit *Anti-BrdU-POD solution* inkubiert. Die Waschrinne benötigten je 5 Minuten, während dieser Zeit wurde das *Chemiluminescent Substrat* vorbereitet. Die Lumineszenz wurde innerhalb von 10 Minuten nach Substratzugabe auf die Zellen am Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer gemessen.

### 3.2.3 Softagar-Kolonie-Bildung-Test

Der Softagartest erlaubt die Messung substratunabhängigen Wachstums, welches ein Merkmal neoplastischer Transformation der Zellen bildet. Als Vorbereitung werden 5mL 5%-Bacto-Agar-Lösung im 50mL Röhrchen in einer Mikrowelle aufgeköcht. 37mL des auf 42°C vorgewärmten Mediums wurden komplett zum vorgekochten Bacto-Agar dazu pipettiert und sorgfältig mit der Pipette resuspendieren. Davon wurden je 1mL in eine 12-Loch-Platte und je 2mL in rundboden Polypropylenröhrchen vorgelegt. Die Platte mit dem Agar-Medium-Gemisch wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten zu aushärten stehen gelassen, die Röhrchen wurden bei 42°C gelagert. Nach dieser Vorbereitung wurde eine Zellsuspension mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  pro mL Medium eingestellt. Die Polypropylenröhrchen mit vorgelegtem Agargemisch wurden folgend mit 1mL Zellsuspension vorsichtig zusammenpipettiert und je 1mL dieser Suspension auf den ausgehärtet Bacto-Agar in der Platte blasenfrei geschichtet. Die Platte sollte bei Raumtemperatur 45 Minuten stehen bis der Agar geliert ist. Abschließend wurde vorsichtig 1mL Komplettmedium als Schutz vor dem Austrocknen oben hinaufpipettiert. Die Kolonienbildung wurde nach 7-10 Tagen lichtmikroskopisch durch Auszählung 5 unterschiedlicher Blickfelder erfasst.

### 3.2.4 Time Lapse Analyse

Als Vorbereitung für diesen Versuch musste eine 6 Loch-Kulturplatte mit 2mL, entsprechend dem Herstellerprotokoll gelösten, Rattenschwanzkollagen Typ I Lösung beschichtet werden. Danach wurde die Platte mindestens 2h bei 37 °C und 5%-Kohlenstoffdioxid im Brutschrank inkubiert. Die Kollagenlösung wurde abgenommen, die Platte mit 2mL PBS gewaschen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert. 42h nach Transfektion wurden die zu analysierenden Zellen mit PBS gewaschen, vom Kulturgefäß mit Trypsin abgelöst und mit Komplettmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 Minuten bei 300 x g abzentrifugiert und die Zellen im frischen Medium sehr gut vereinzelt. Die Zellzahl wurde auf  $1,5 \times 10^4$  pro mL eingestellt. Im nächsten Schritt wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro Plattenvertiefung in die mit Kollagen beschichteten Platten ausgesät und mindestens 6 Stunden bei 37°C und 5%-Kohlenstoffdioxid im Brutschrank inkubiert. Das Zeiss *Cell Observer*® Fluoreszenzmikroskop ist mit einer Inkubatoreinheit ausgestattet und ermöglicht eine Kultivierung der Zellen bei 37°C und 5%-Kohlenstoffdioxidsättigung über lange Zeiträume. Dafür wurde die Kulturplatte in die Halterung eingesetzt und mittels der Mikroskopsoftware die Bewegung der Zellen in festgelegten Intervallen von 10 Minuten abgebildet. Die 120 aufgenommenen Abbildungen wurden zu einem Film komplementiert und mit *Time Lapse Analyzer open source software* analysiert.

## 3.3 Proteinchemie

### 3.3.1 Proteinernte & Messung

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Kulturgefäßboden abgelöst, die Zellsuspension in ein 15mL Zentrifugenröhrchen überführt, das Kulturgefäß mit kaltem PBS abgespült und zur Zellsuspension dazu pipettiert. Hiernach wurde das Röhrchen 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1mL kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5mL Röhrchen überführt. Folgend wurde die Zellsuspension erneut pelletiert, 150µL 1x-*ProteaseArrest*<sup>TM</sup>-PBS-Lösung angesetzt und das Pellet damit resuspendiert. Der Zellenaufschluss erfolgte mittels Sonifikation. Zur Kontrolle wurde der sonifizierte Ansatz erneut bei 1200 x g zentrifugiert, war kein Pellet vorhanden, so wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.



### 3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976)

In eine U-Boden 96-Loch-Mikrozellkulturplatte wurden 150µL *Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent* pro Messansatz vorlegt. Eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin bekannter Konzentration, 2µL der Messprobe unbekannter Konzentration wurde zum vorgelegten Reagenz dazu pipettiert und als Leerwert nur das Bradfordreagenz genutzt. Die Platte wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde die Zunahme der Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 597nm gemessen. Anhand der Eichgerade, erstellt aus den Werten des bovinen Serumalbumins bekannter Konzentration, und der linearen Regression wurde die Proteinkonzentration der unbekannt Probe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt.

### 3.3.3 Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Trennung der Proteine anhand des Gelfiltrationseffektes, d.h. auf Grund ihrer molekularen Masse. Dafür wurden 50µL Gesamtproteinlysats mit 7µL DTT, 16µL 4x SDS-Puffer versehen und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Dabei wurden Disulfidbrückenbindungen durch das reduzierende Reagenz DTT gespalten. Das SDS ist ein anionisches Detergenz, das durch seine hydrophilen Eigenschaften an Proteine bindet und diese durch Störung der hydrophoben Wechselwirkungen denaturiert. Die negative Ladung des SDS überdeckt die natürliche Ladung des Proteins, so dass alle SDS behandelte Proteine eine linearisierte Form und ein ähnliches Verhältnis von Ladung zu Masse aufweisen. 10-25µg der vorbereiteten Proben wurden in die mit Laufpuffer ausgespülten Taschen des auspolymerisierten Polyacrylamidgels geladen, der Geltank entsprechend der Markierung mit Laufpuffer befüllt und das Gel bei 120 Volt laufen lassen. Nach dem Übergang der Proben in das Trenngel konnte die Voltzahl bis auf 200 erhöht werden.

### 3.3.4 Protein- & Immunoblot

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden wurden auf feste Trägermembranen, wie PVDF- und Nitrocellulosemembran, übertragen. Die PVDF-Membran wurde vor dem Gebrauch 10 Minuten in 100%-Methanol aktiviert und anschließend 2mal kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Für den Elektrotransfer von Proteinen wurde eine puffergetränkte Membran luftblasenfrei auf das Gel platziert und oberhalb sowie unterhalb eine Lage Whatmanpapier aufgelegt. Für das Tankblot- bzw. Nassblotverfahren wurde der zusammengelegte *Blot* von beiden Seiten mit einem Schwamm versehen, in eine Kassette einlegt, festgeklemmt und nach dem Verstauen in den Tank mit Transferpuffer bis zur vorgesehenen Markierung befüllt. Sowohl beim *semidry*-Verfahren als auch

beim Nasssblotverfahren sollte darauf geachtet werden, dass ausgehend von der Kathode nach dem Whatmanpapier zuerst das Gel und anschließend die Membran und darauf das Whatmanpapier platziert werden. Für das *semydry*-Verfahren wurden aus den Whatmanpapieren, dem Gel und der Membran ein bündig zusammengebauter Stapel in die Kammer gelegt, evtl. Luftblasen entfernt und vorsichtig den Deckel des *Blotters* aufgesetzt. Die Schrauben des Deckels sollten gleichmäßig angezogen werden. Ein orthogonal zum Polyacrylamidgel angelegtes elektrisches Feld ließ die durch das SDS negativ geladenen Proteine Richtung Anode wandern. Der Transfer im Tank erfolgte bei einer Stromstärke von 300mA und beim *semydry*-Verfahren wurden sie anhand der Fläche des Gels, in der Regel 1mA pro cm<sup>2</sup>, berechnet. Die Zeitdauer ist von der Proteingröße abhängig, der Regel nach beträgt diese 1 Minute pro kDa zu transferierender Proteinmasse. Der Erfolg der Proteinübertragung wurde mit 5-minütigen Ponceau S Färbung und folgendem Waschschrift mit bidest. Wasser überprüft. Die Sättigung der unbesetzten Bindestellen auf der Membran wurde durch den Einsatz von Blockreagenzien, wie Magermilchsuspension, in Abhängigkeit vom eingesetzten primären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur gewährleistet. Danach erfolgte die Inkubation mit gegen ein bestimmtes Protein gerichteten, primären Antikörpern bei 4 °C über Nacht. Um die überschüssigen und unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 3mal jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1%-TBST gewaschen. Zur Detektion des spezifisch gebundenen primären Antikörpers wurde die Membran mit enzymgekoppelten, in Suspension gelöstem sekundären Antikörper 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran musste 3mal jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1%-TBST gewaschen werden, um ebenfalls überschüssigen und unspezifisch gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Die genauen Antikörperkonzentrationen sind den Abschnitt 2.1.6 zu entnehmen. Der Proteinnachweis, vermittelt durch das Immunkonjugat, erfolgt mittels *ECL Plus Western Blotting Detection Reagents*. Während der 1 minütigen Inkubation der Membran in der Lösung des *Blotting Detection Reagents* katalysierte die an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase die Oxidation des *Enhanced Chemiluminescence* Substrats. Das so entstandene Acridiumester ist ein Luminophor und leuchtet nach Bestrahlung mit kurzwelligem Licht. Die emittierte Strahlung wurde mit dem ChemoCam System der Firma Intas detektiert und dokumentiert.

## 3.4 Durchflusszytometrie

### 3.4.1 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Die zu analysierenden Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, von der Kulturplatte mit Trypsin abgelöst und bei 1200 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 500µL kaltem PBS gewaschen, in ein 5mL

Polystyrene Round-Bottom Tube überführt und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 500µL kaltem PBS gut resuspendiert. Folgend wurde 1mL eiskalte 70% Ethanollösung unter ständigem vortexen auf die Zellen getropft. Zum Fixieren wurden die Ansätze 24h bei 4°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden nun bei 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 500µL eiskaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert. Der Waschschritt wiederholte sich 2mal. Die Zellen wurden mit 500µL in PBS verdünntem FxCycle™ Violet Stain von Invitrogen mit der Endkonzentration von 1ng/µl 30- 45 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt. Die Proben wurden mittels BD™ LRS II Durchflusszytometer, violetter Laser bei der Wellenlänge 405nm und einem Bandpass Filter von 440/40nm analysiert. Zu Auswerten des Datensatzes wurde die Software ModFit LT™ genutzt.

#### 3.4.2 Durchflusszytometrische Apoptosedetektion

Der Mediumüberstand der für die durchflusszytometrische Analyse vorgesehenen Zellen wurde in ein 5mL-*Polystyrene*-Rundboden-Röhrchen überführt. Die adhärenen Zellen wurden mit PBS gewaschen, von der Kulturplatte mit Trypsin abgelöst und in dem *Polystyrene*-Rundboden-Röhrchen mit dem Überstand vereint. Die Zellsuspension wurde 3 Minuten bei 1500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1mL PBS gewaschen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Folgend wurden die Zellen in 400µL *Binding Buffer* aufgenommen, sehr gut resuspendiert, 10µL Annexin V von BD Pharming zum Ansatz pipettiert und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Kurz vor der Messung am BD™ LRS II Durchflusszytometer wurden 5µL Propidium Iodid Lösung mit der Endkonzentration von 1µg/ml zugegeben. Die Proben wurden anhand des Blauen Laser mit der Wellenlänge von 488nm und einem Bandpass Filter von 530/30 und 575/26 analysiert. Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo von Tree Star.

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 RNS-Präparation aus Zellen mit peqGOLD Total RNS Kit®

Zunächst wurden die Suspensionszellen 3 Minuten bei 300 x g pelletiert bzw. bei adhärenen vorliegenden Zellen das Medium abgenommen. Das Zellpellet wurde mit 400µL *RNA Lysis Buffer T* je  $1 \times 10^7$  Zellen lysiert. Ein *DNA Removing Column* wurde in ein 2mL *Collection Tube* eingesetzt und das Lysat auf das Säulchen geladen. Der nächste Schritt beinhaltete 1-minütige Zentrifugation bei 12000 x g. Der Durchfluss wurde mit äquivalenten Mengen an 70% Ethanol versetzt, gemischt und auf ein *PerfectBind RNA Column* geladen. Das Säulchen wurde 1 Minute bei 10000 x g

zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, das Säulchen mit 500µL *RNA Wash Buffer I* versehen, anschließend 15 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss erneut verworfen, das Säulchen mit 600µL komplettierten *RNA Wash Buffer II* gewaschen, 15 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert und dieser Waschschrift noch mal wiederholt. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurde das *PerfectBind RNA Column* in ein 1,5 mL Röhrchen reingesetzt und mit 40µL sterilem, RNase-freiem, destilliertem Wasser 1 Minute bei 5000 x g eluiert. Die RNS-Konzentration und -Reinheitsgrad wurden anhand einer Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 260nm mittels NanoDrop® ND-1000 bestimmt.

#### **3.5.2 RNS-Präparation aus Gewebe mit dem *QIAzol® Lysis Reagent***

Als Vorbereitung wurden der Mörser, das Pistill und das Skalpell 1h zum Abkühlen auf Trockeneis gelagert. 500µL *QIAzol® Lysis Reagent* wurden in 1,5mL Röhrchen vorlegt. Ein gefrorenes Stück Gewebe von ca. 4 mm Durchmesser wurde mit einem auf Trockeneis positionierten Mörser zu Pulver zerstoßen, das Pulver mit einem sterilen Skalpell in die vorbereiteten Röhrchen mit Lysispuffer überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde mehrmals auf- und abpipettiert, 150µL Chloroform dazu gegeben, 15 Sekunden kräftig durchgemischt. Anschließend erfolge eine 10-minütige Inkubation und eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C sowie maximaler Geschwindigkeit. Nach diesem Schritt erhielt man eine Phasentrennung, die farblose obere Schicht wurde in ein neues Tube überführt ohne dabei die weiße Interphase zu berühren. 0,7 x Volumen Isopropanol wurden zu der abgenommenen farblosen Phase wurden hinzupipettiert, 15 Sekunden durchmischt, der Ansatz 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 20 Minuten bei 4°C 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 1mL 70% Ethanol zum Pellet zugegeben, erneut 10 Minuten bei 4°C 12000 x g abzentrifugiert. Danach wurde sehr vorsichtig der Überstand abgenommen und das Tube offen auf Eis stehen lassen bis das Restethanol verdampft war. Die RNS wurde in 50µL sterilem, RNase-freiem, destilliertem Wasser gelöst. Die RNS-Konzentration und -Reinheitsgrad wurden durch die Absorptionmessung bei einer Wellenlänge von 260nm mittels NanoDrop® ND- 1000 bestimmt.

#### **3.5.3 cDNS-Synthese mittels *Omniscript® Reverse Transcription Kit***

Zuerst wurden in 0,5mL Röhrchen 0,5µL 10µM Oligo-dT-Nukleotide vorgelegt, 1µg RNS dazu pipettiert und das Volumen auf 11µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Danach wurde der Ansatz 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Zusätzlich wurden 4µL RNase freien Wassers, 2µL 5mM dNTP-Mix, 2µL *10x Buffer RT* und als letztes 1µL *Omniscript Reverse*

*Transkriptase* zum RNS-Oligi-dT-Mix dazu pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Eine finale Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase wurde nicht durchgeführt.

### 3.5.4 Isolierung von Plasmid-DNS mit *NucleoBond® Xtra Midi & Maxi*

Vorerst wurden 200mL der Bakterienkultur in 50mL Zentrifugenröhrchen 60 Minuten bei 4°C 4000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 12mL S1-Puffer resuspendiert, mit 12mL S2-Puffer lysiert, dabei das Röhrchen 6 x invertiert und 3 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 12mL S3-Puffer neutralisiert, auch bei diesem Schritt wurde das Röhrchen invertiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gelagert. Während der Inkubationszeit wurde das *NucleoBond® Xtra* Säulchen mit 6mL N2-Puffer äquilibriert. Folgend wurde ein Papierfilter auf diese Säule gesetzt, das Lysat vollständig filtriert, der Trichter mit dem Rückstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 32mL mit N3-Puffer gewaschen, die Säule in ein frisches Röhrchen gesetzt und mit 15mL N5-Puffer die DNS eluiert. Danach wurden 11mL Isopropanol zum Eluat pipettiert, 1 Stunde bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 400µL TE-Puffer gelöst und in ein 1,5mL Röhrchen überführt, 40µL 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2) dazu pipettiert und 1mL Ethanol hinzugefügt und gut durchmischt. Hernach erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 1mL 70% Ethanol gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Die DNS wurde nun an der Luft vom Restethanol getrocknet, später in 100µL sterilem destilliertem Wasser gelöst. Die DNS-Konzentration und -Reinheitsgrad wurden anhand der Absorptionsmessung mittels NanoDrop® ND-1000 bestimmt.

### 3.5.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht neben spezifischer Vervielfältigung definierter DNS-Abschnitte eine relative Quantifizierung des erhaltenen PCR-Produktes. Für das gesamte Verfahren wurden die Protokolle, die Geräte und die Software der Firma Applied Biosystems® verwendet. Die spezifischen Primersequenzen wurden anhand der Primer Express® Software v3.0.1 erstellt. Die Reaktionsansätze wurden wie folgend in der Tabelle 1 angegeben zusammen pipettiert, die Analyse mittels *7500 Fast Real-Time PCR System* durchgeführt und die Daten nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode von Livak und Schmittgen ausgewertet. (Livak und Schmittgen 2001) Die Mengendifferenzen der eingesetzten cDNS wurde anhand des Referenzgens RPLP0 normalisiert.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der qRT-PCR-Ansätze**

|                                 |                       |
|---------------------------------|-----------------------|
| Komponenten pro qRT-PCR-Ansatz: | eingesetztes Volumen: |
| Wasser:                         | 8,6µL                 |

---

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Power SYBR® Green PCR Master Mix: | 10µL  |
| 10µM forw. Primer:                | 0,2µL |
| 10µM rev. Primer:                 | 0,2µL |
| 1:10 verdünnte cDNS               | 1µL   |
| <hr/>                             |       |
| Gesamtvolumen:                    | 20µL  |

### 3.5.6 Herstellung kompetenter Bakterien der *E. coli* Stämme TOP10, XL1Blue, DH5α

Zunächst wurde eine Vorkultur aus 10mL LB-Medium und 10µL Zellsuspension angesetzt und über Nacht bei 37°C, 200rpm inkubiert. 100mL LB-Medium wurden mit 1mL 1M MgCl<sub>2</sub>, 1mL 1M MgSO<sub>4</sub> versetzt und mit 2mL der Vorkultur angeimpft. Der Ansatz wurde 2-2,5h bei 37°C, 200rpm kultiviert. Die Extinktion der Suspension wurde bei OD<sub>600</sub> gemessen, bei Werten zwischen 0,6-0,7 in 50mL Reaktionsröhrchen abgefüllt und anschließend 20 Minuten auf Eis inkubiert. Alle Lösungen und Gebrauchsgegenstände sollten nun vorgekühlt werden. Danach wurde die Kultur bei 260 x g 8 Minuten pelletiert, die Pellets mit 33 mL RF I-Lösung resuspendiert und 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Der Ansatz wurde erneut bei 2670 x g 8 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 5mL RF II-Lösung aufgenommen, folgend 15 Minuten bei 0°C inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden als 50µL Ansätze aliquotiert und im flüssigen Stickstoff schockgefroren.

### 3.5.7 Transformation kompetenter Bakterien (Kushner, Boyer und Nicosia 1978)

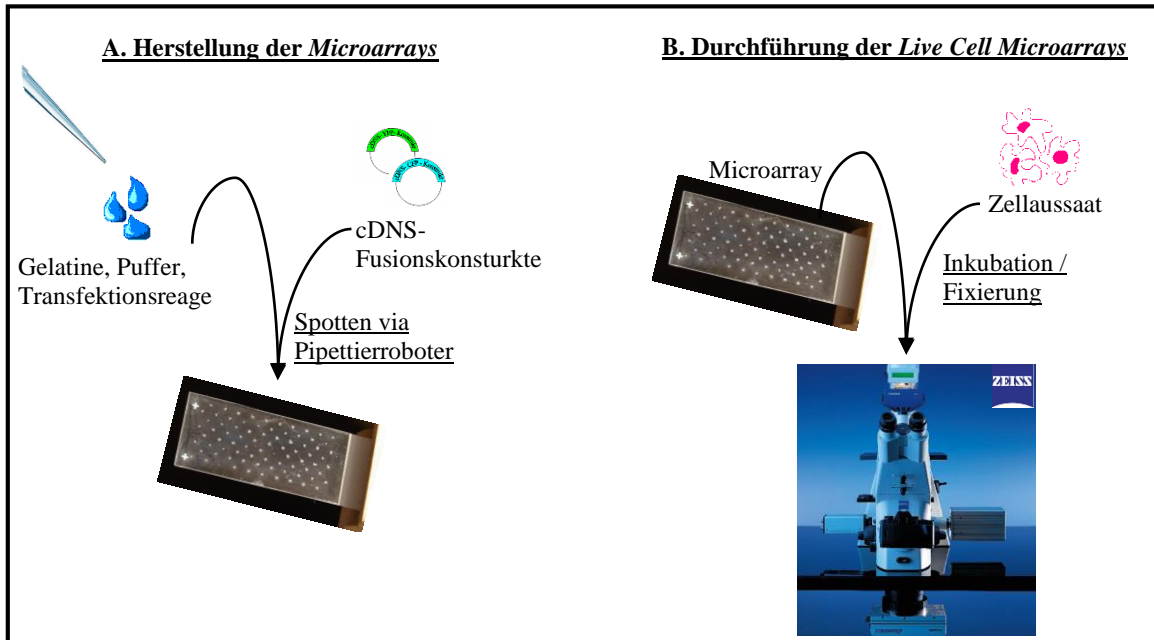
Als Erstes wurden 50µL kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 0,5µL Plasmid (c = 1,0 µg/µL) dazupipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein 30-45 Sekunden kurzer Hitzeschockschritt bei 42°C, mit folgender 2-minütigen Inkubation auf Eis und 30-minütigen Kultivierung bei 37°C. 100µL dieser Bakterienkultur wurden auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurde über Kopf 24h bei 37°C im Inkubator bebrütet. Zur weiteren Vermehrung wurde in Rundbodenröhrchen 2mL dem Plasmid entsprechendes, antibiotikahaltiges LB-Medium vorgelegt, die Kolonien mit einer Öse aus der Platte entnommen und das Medium angeimpft. Diese Vorkultur konnte genutzt werden, um entweder eine Übernachtskultur für die Extraktion der Plasmid-DNS anzusetzen oder, um aus 900µl dieser Vorkultur mit 100µL Glycerin eine Stocklösung für eine dauerhafte Anwendung anzusetzen.

## 3.6 Hochdurchsatzverfahren

### 3.6.1 Herstellung der *reverse transfection microarrays* (Zaiuddin und Sabatini 2001)

Um die Transfektionseffizienzen zu steigern und an Pankreaskarzinommodellssysteme anzupassen, wurde das ursprüngliche Protokoll von Ziauddin und Sabatini von unserer Arbeitsgruppe entsprechend modifiziert. Für dieses Versuchssystem wurden für alle 79 Gene verifizierte cDNS-Klone bei der Firma Biocat in Heidelberg erworben. Die offenen Leserahmen wurden mittels der PCR-Methode vervielfältigt und in den „Eingangsvektor“ des Gateway™-Systems von Invitrogen kloniert. Anschließend erfolgte eine Subklonierung in die Empfängervektoren pdEYFP-N1 und pdECFP-C1, sodass alle 79 Kandidaten als YFP- und CFP-Fusionskonstrukte vorliegen. Die Fusion ist von Bedeutung für die spätere Zellantwortquantifizierung. Die mikroskopische Auswertung wurde die Derivate des grün fluoreszierenden Proteins ermöglicht. (Kushner, Boyer und Nicosia 1978, Lippicott-Schwartz und Patterson 2003, Wang, Shyy und Chien 2008) Zur Herstellung der Mikroarrays (vgl. Abbildung 8) wurde zunächst ein Rundbodenröhrchen mit 600µL PBS, ein zweites mit 180µL Lipofectamine gelöst in 540µL PBS und ein drittes mit 0,2% Gelatinelösung vorbereitet. Zusätzlich wurde eine Cellstar® 96-Lochmikroplatte mit bereits vorgelegten 1µg/µL konzentrierten Plasmiden und eine leere Cellstar® 96-Lochmikroplatte für das Zusammenpipettieren der Reaktionsansätze benötigt. Der Roboter setzte pro Loch aus 4µg Plasmid-DNS, 11µL PBS und 2µL Lipofectamine® 2000-Lösung einen Reaktionsansatz an. Während dessen wurden 15 Superfrost® plus Objektträger auf die vorgesehene Halterung platziert. Anschließend nahm der Roboter 15µL Gelatinelösung auf, mischte sie mit jeweiligem Reaktionsmix zusammen und setzt mit einer 10µL Spitze, wobei er die Objektträger an der jeweils programmierten Stelle berührt, ca. 1mm kleine *Spots* auf die Objektträger ab. Nach dem Ablauf des Programms wurden die Objektträger eingesammelt und im Exsikkator über Nacht gelagert. Die Gelatine wird dabei zum Immobilisieren der *Spots* benötigt. Ein Objektträger umfasst jeweils 40 *Spots* der YFP- und der CFP-Kandidatenkonstrukte in einer vorgegebenen Reihenfolge. Die getrockneten Objektträger konnten bis 3 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Für die *Life*-Mikroarrays wurden die angefertigten Plasmid-*Microarrays* wurden in die quadriPerm® Zellkulturplatten platziert und 6mL komplett Medium-Zellsuspension (Panc1:  $7,5 \times 10^4$  Z/mL; Hek293:  $10 \times 10^4$  Z/mL; S2-007:  $5,0 \times 10^4$  Z/mL) vorsichtig auf die Objektträger pipettiert. Anschließend wurde die Zellkulturplatte bei 37°C und 5%-Kohlenstoffdioxid für 48h im Brutschrank bebrütet. Die Zellen besiedeln einen *Spot*, nehmen die Transfektionskomplexe auf und überexprimieren das jeweilige Konstrukt. Somit befinden sich auf dem Objektträger ein Zellrasen aus untransfizierten Zellen und jeweils definierte Punkte mit transfizierten Zellen. Hiernach wurden die Zellen auf dem Objektträger mit kaltem PBS gewaschen, 15 Minuten mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert und 3mal mit PBS gewaschen. Zu Letzt konnten die Präparate mit dapihaltigem *Vectashield Mounting Medium* eingedeckelt werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie wurden transkriptionelle Profilanalysen basierend auf der Morphologie,

Lokalisation der Genprodukte in Abhängigkeit unterschiedlicher Inkubationsbedingung angefertigt. Zusätzlich konnten immunzytologische Färbungen zum Beispiel auf Apoptose, Proliferation, epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung Daten zur Funktionalität liefern.



**Abbildung 8: Herstellung und Durchführung der reverse transfection Microarray-Methode.** (Zaiuddin und Sabatini 2001) Zur Herstellung der Mikroarrays wird vollautomatisch ein Gemisch aus cDNS, Transfektionsreagenzien und Gelatine zusammenpipettiert und anschließend auf Glasobjektträger „gespotet“ wie im Bildteil A dargestellt. Anschließend werden sie über Nacht im Exsikkator getrocknet. Für die *Live Cell Microarrays* werden Zellen auf die Objektträger ausgesät und 48h inkubiert wie Teilabschnitt B. aufzeigt. Zellen, die auf den *Spots* sitzen, nehmen die Transfektionskomplexe auf und exprimieren das jeweilige Konstrukt. Zur Auswertung werden die Zellen fixiert und fluoreszenzmikroskopisch auf die Lokalisation, die Morphologie und bei Bedarf mittels Immunzytologie auf funktionelle Effekte untersucht.

### 3.6.2 Immunzytologie

Sowohl im *reverse transfection* Format auf Objektträgern kultivierte Zellen als auch in 96 Loch- $\mu$ Clear® F-Boden Mikroplatten transfizierten oder behandelten Zellen sowie auf Rundgläschen in 6-Loch-Kulturplatten angezogenen Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen. Die weiterführenden Schritte sind identisch, jedoch variiert der Einsatz der Lösungen, Puffer und Suspensionen je nach verwendetem Antikörper und sind der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Protokoll der Antikörperanwendung zur immunhistologischen Färbung**

| Antikörper: | E-Cadherin | Vimentin                              | Cyclin D1 | Ki67 | Caspase 3 |
|-------------|------------|---------------------------------------|-----------|------|-----------|
| Fixierung:  |            | 15-20 Min. mit 4% Paraformaldehydlsq. |           |      |           |



|                                 |   |  |   |  |  |
|---------------------------------|---|--|---|--|--|
|                                 | 10-15 Min. mit<br>50%<br>Methanol-<br>Aceton-Lsg.                                 |  |   |  |  |
| <b>Permeabili-<br/>sierung:</b> | entfällt  | 10-25 Min. via 1%PBS-Triton<br>X                                     | 20 Min. via 2%TBS-Triton X  |  |  |
| <b>Waschen:</b>                 | 5 Min. mit PBS waschen  |  | 5 Min. mit TBS waschen  |  |  |
| <b>Blocken:</b>                 | 1 Stunde bei<br>RT in 5%<br>Milch-TBS   | 1 Stunde bei RT in 5% Milch-<br>0,1%PBST                             | 2 Stunden bei RT in 10%<br>FKS-0,1% TBST  |  |  |
| <b>1. Antikörper:</b>           | 1:100 üN in<br>1% Milch-<br>0,2% TBST   | 1:100 1h bei<br>RT in<br>Blockpuffer                                 | 1:100 üN in<br>1% Milch-<br>0,1% PBST   | 1 : 400 4h bei<br>RT im<br>Blockpuffer                   | 1 : 150 4h<br>bei RT im<br>Blockpuffer |
| <b>Waschen:</b>                 | je 10 Min bei<br>RT 2x TBS; 2x<br>mit TBST; 2x<br>TBS                             | 3x je 5 Min.<br>bei RT in TBS  | 3 x je 5 Min. bei RT in PBS   |  |  |
| <b>2. Antikörper:</b>           | 1 : 500 Anti-<br>Maus-Cy3 in<br>5% Milch-<br>0,2% TBST 1h<br>bei RT im<br>Dunkeln | 1:500 Anti-<br>Maus-Cy3 in<br>Blockpuffer 1h<br>bei RT im<br>Dunkeln | 1 : 500 Anti-<br>Maus-Cy3 in<br>5% Milch-<br>0,1% PBST 1h<br>bei RT im<br>Dunkeln | 1 : 250 Anti-Kaninchen-Cy3<br>in PB 2h bei RT im Dunkeln |  |
| <b>Waschen:</b>                 | je 10 Min bei<br>RT 2x TBS; 2x<br>mit TBST; 2x<br>TBS                             | 3x je 5 Min.<br>bei RT in TBS  | 3 x je 5 Min. bei RT in PBS   |  |  |

### 3.7 Statistische Anwendungen

Alle erhobenen Daten wurden anhand von mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen gesammelt. Die empirischen Werte wurden gemittelt, normalisiert und die Standardabweichung berechnet. Zur statistischen Aufstellung der Signifikanz wurde ein einseitiger bzw. zweiseitiger

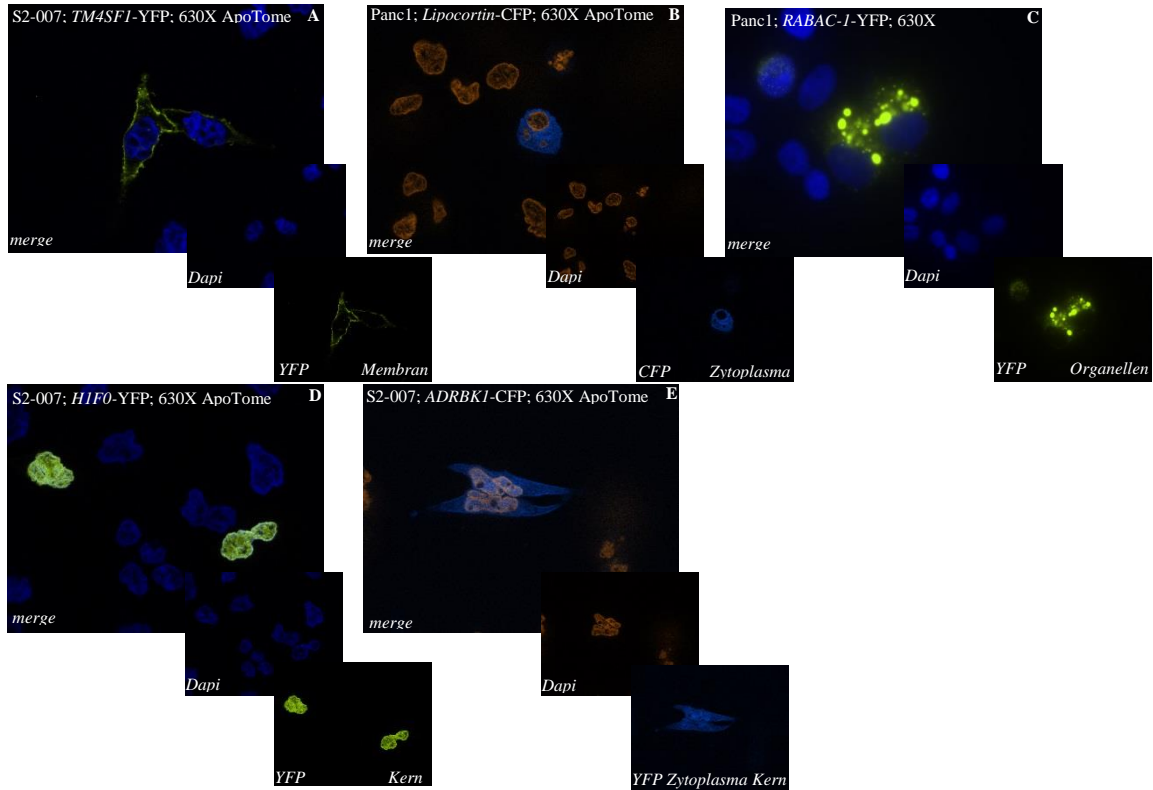
ungepaarter T-Test angewandt. Die ermittelten Werte von 0,05 dargestellt als „\*“ sind als signifikant, von 0,01 bezeichnet mit „\*\*“ als hoch signifikant eingestuft. Die Ermittlung der Signifikanzen der Gewebeuntersuchung im Boxplotformat erfolgte unter Gebrauch des Mann-Whitney-U-Tests. Der Wert  $< 0,0001$ , symbolisiert durch „\*\*\*“ bezeichnet ein hoch signifikantes Ergebnis.

## 4. Ergebnisse

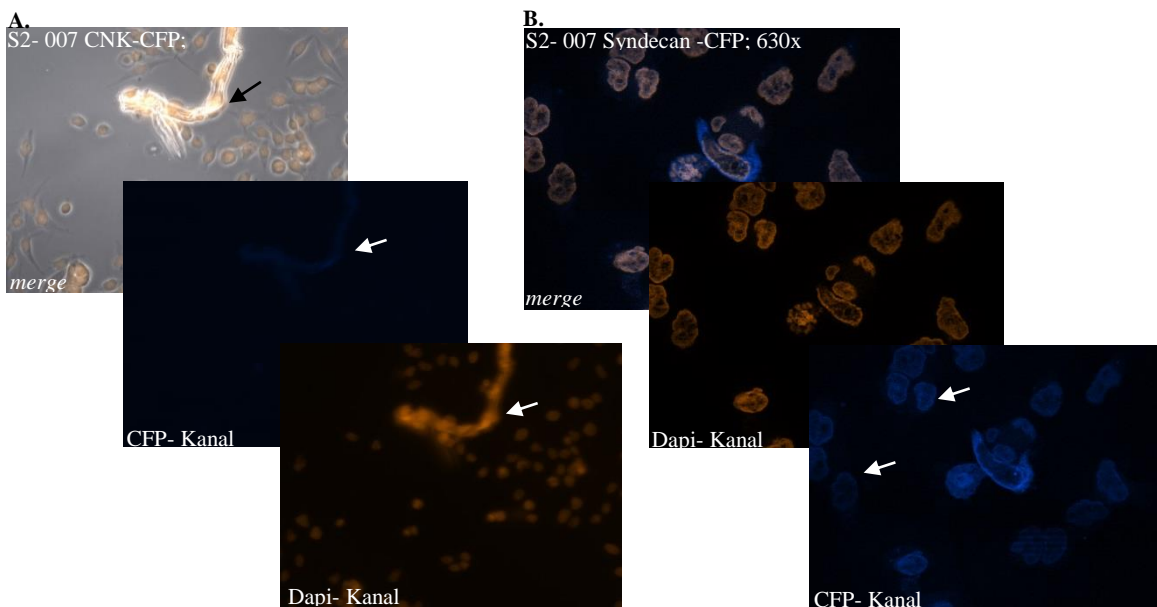
### 4.1 Hochdurchsatzanalysen

#### 4.1.1 Serielle Lokalisationsbestimmungen

Die Zielsetzung der ersten Analysen sah die Bestimmung der zellulären Lokalisation der Genprodukte in transformierten und nicht-transformierten Zelllinien vor. Darüber hinaus erfolgte die Kultivierung der Zellen mit und ohne Serumentzug. In der Tabelle 7 ist die gesamte Kandidatengenliste zur Einsicht hinterlegt. Wie im Methodenteil 3.6.1 beschrieben, fanden Mikroarrays, die mindestens 60 von 80 saubere, abgegrenzte *Spots* mit einem Durchmesser von 0,5mm aufwiesen, Verwendung. Nach Zellaussaat, Inkubation und Fixierung der *reverse transfection* Mikroarrays wurde die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Genprodukte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die einzelnen *Spots* wurden bei 100-facher Vergrößerung bezüglich der Transfektionseffizienz und Artefaktenbildung begutachtet, vgl. Abbildung 10. Anschließend wurden sowohl im Durchlicht zur Gesamtübersicht als auch im DAPI-Kanal die Nukleusfärbung sowie dem CFP- bzw. YFP-Kanal die Genprodukte fotografiert und dokumentiert. Detaillierte Aufnahmen wurden ebenfalls bei 200- und 630-facher Vergrößerung angefertigt. Zusätzlich zur subzellulären Lokalisation war es möglich, morphologische Veränderungen transfizierter Zellen zu untersuchen. Die Aufzeichnung der möglichen subzellulären Lokalisationen erlaubte die Eingruppierung der Ergebnisse in 5 Hauptkategorien: zytoplasmatische, nukleäre, membranständige, gemischt zytoplasmatische / nukleäre, sowie Organelllokalisierung, exemplarisch dargestellt in der Abbildung 9. Im Regelfall waren auch diverse Kombinationen dieser Gruppen zu beobachten.



**Abbildung 9: Abgebildet sind 5 Musterbeispiele zur Einordnung der subzellulären Lokalisation.** Die Darstellung beinhaltet Überlagerungsbilder und jeweils einzelne Kanäle bei einer 360fachen Vergrößerung. Fluoreszenzsignale des *Yellow Fluorescent Protein* (YFP-Kanal) sind grün-gelb und der dazugehörige DAPI-Kanal blau dargestellt. Das *Cyan Fluorescent Protein* (CFP-Kanal) erscheint blau und zur besseren Kontrastierung sind die dazugehörigen DAPI-Färbungen braun dargestellt. **A. Membranlokalisation** in S2-007, *TM4SF1*-YFP-Konstrukt; **B. zytoplasmatische Lokalisation** in Panc1, Lipocortin-CFP-Konstrukt; **C. Organelllokalisation** in Panc1, *RABAC-1*-YFP-Konstrukt; **D. nukleäre Lokalisation** in S2-007, *HIF0*-YFP-Konstrukt; **E. zytoplasmatische & nukleäre Lokalisation** in S2-007; *ADRBK1*-CFP-Konstrukt; Die gezeigten Beispiele sind Ergebnisse der Versuche unter serumfreien Konditionen.



**Abbildung 10: Exemplare der Artefaktenbildung.** Das Auswerten der Mikroarrays wurde durch unterschiedliche Störfaktoren erschwert. Die Abbildung **A.** zeigt beispielhaft, dass Fremdkörper wie Staub Fluoreszenzsignale in allen Kanälen erzeugen. Dies kann ebenfalls durch Luftblässcheneinschlüsse bewirkt werden. Abgebildet ist ein Überlagerungsbild aus dem Durchlicht-, CFP- (blau) und Dapi- (braun) sowie die Einzelkanäle. Die Aufnahme **B.** zeigt deutlich, dass entweder erhöhte Belichtungszeiten schwacher Signale oder zu starke Fluoreszenz zur Überstrahlung in andere Kanäle führen. Im Überlagerungsbild sieht man exakt transfizierte Zellen und Kerne angrenzender Zellen. Im braungefärbten Dapi-Kanal allein betrachtet entdeckt man deutlich die Nuklei. Der CFP-Kanal einzeln zeigt sowohl die Fluoreszenz transfizierter aber auch die Kerne nicht transfizierter Zellen. Insbesondere trat dieses Artefakt bei den CFP-Konstrukten auf, da sie anfällig waren für das Phänomen der Photobleichung. Bei diesem raschen Prozess ist das Anregungslicht ausreichend, um das Fluorophor zu zerstören. Dies führte zu schwachen Signalen und erhöhten Belichtungszeiten. YFP-Konstrukte waren bei zu starker Expression ebenfalls in der Lage ähnliche Artefakte zu verursachen.

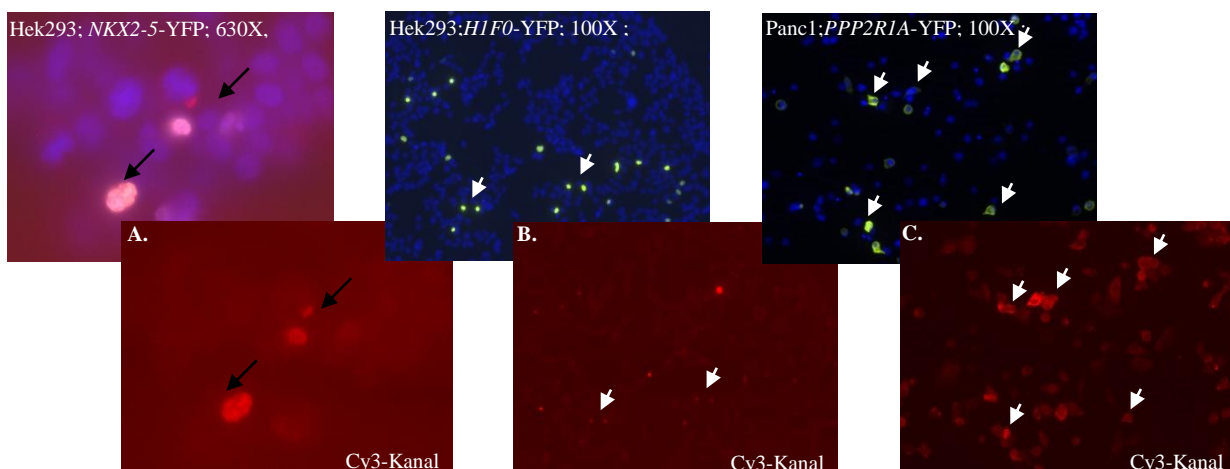
Nach mindestens drei (zur ausreichenden Datenerhebung), jedoch maximal fünf Durchläufen begann die Auswertung der Morphologieauffälligkeiten und der Lokalisationswechsel. Verglichen wurden CFP- vs. YFP-Fusionskonstrukte des gleichen Gens (Aufdeckung von möglichen Signalsequenzen durch Vergleich von N- und C-terminaler Fusion), transformierte (S2-007, Panc1) versus nicht-transformierte Zelllinien (Hek293) und Unterschieden zwischen serumfreien und -haltigen Kultivierungen. Das dreistufige Wertungssystem unterteilte die Effekte nach stark und gut reproduzierbar ( $n \geq 3 = ++$ ), schwach reproduzierbar ( $2 \leq n \leq 3 = +$ ), nicht eindeutige ( $(+)$ ) oder keine Veränderung, zusammengetragen in der Tabelle 3. Der komplette Datensatz ist im Anhang als Tabelle Nummer 9 hinterlegt.

| Genkurzzeichen: | HEK293 vs. Transf. | 10% FCS vs. 0% FCS | CFP vs. YFP |
|-----------------|--------------------|--------------------|-------------|
| CCL14           |                    | ++                 |             |
| NFATC1          |                    | ++                 |             |
| PCTK1           |                    | ++                 |             |
| PPM1G           |                    | ++                 |             |
| FASTK           |                    | ++                 | +           |
| PAI-1/ SERPINE1 | +                  | ++                 | +           |
| PPP2R1A         | +                  | ++                 |             |
| FRA-2, FOSL2    | ++                 | ++                 |             |
| CCND1           | ++                 | ++                 |             |
| GTF2F2          | ++                 | +                  |             |
| IFI27           |                    |                    | ++          |

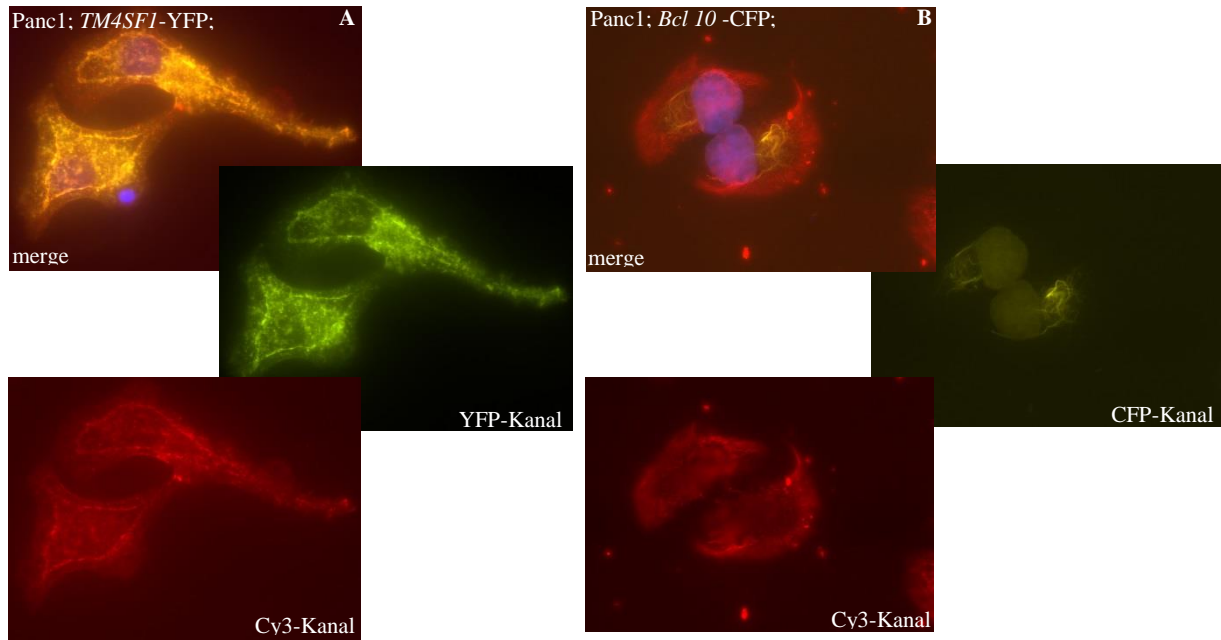
**Tabelle 3: Ausschnitt der Auswertung der Lokalisationsbestimmung.** Zusammenfassend sind die Gene mit den stärksten Effekten ( $n \geq 3 = ++$ ) bezüglich des subzellulären Positionswechsels innerhalb der 3 Vergleichskategorien (transformierte versus nicht-transformierte Zelllinien, CFP- vs. YFP-Konstrukte und Serum-entzug verglichen mit Komplettmedium) tabellarisch dargestellt. Bis auf *IFI27* zeigten alle diese Kandidaten eine Änderung in Abhängigkeit von Serumstimulation. *IFI27* zeigte eine Variation in Zusammenhang mit der Art des Konstrukts. *Fra-2*, *CCND1* und *GTF2F2* weisen in Hek293 Zellen einen Wechsel im Vergleich zu Tumorzelllinien.

### 4.1.2 Funktionelle Analysen

Der zweite Teil der Hochdurchsatzanalyse der Kandidaten beinhaltete das Aufdecken funktioneller Effekte, die durch rekombinante Expression der Kandidatengene ausgelöst wurden. In diesem Zusammenhang, entsprechend dem Methodenteil 3.6.2, wurden die fixierten Objektträger immunzytologisch nachbehandelt. Unsere Arbeiten beschränkten sich speziell auf proliferative Zellfunktionen, detektiert mittels Ki67- und Cyclin-B1-Antikörpern, apoptotische Signale, untersucht mit Caspase 3-Antikörpern, und epithelial-mesenchymale Transdifferenzierung, festgestellt anhand der E-Cadherin- und Vimentin-Antikörperfärbung. Um die fluoreszenzmikroskopische Analyse zu ermöglichen, kam ein Cy3-markierter Sekundärantikörper zum Einsatz. Dies ermöglichte eine mehrkanalige Aufnahme sowohl der CFP- bzw. YFP- als auch der Dapi- und Cy3-Signale in parallelen Ansätzen. Einzelne Spots wurden angefahren, besichtigt und dokumentiert. Bei der Auswertung richtet sich ein besonderes Augenmerk auf den Abgleich transfizierter Zellen mit der Antikörperfärbung mit benachbarten, gefärbten aber untransfizierten Zellen, vgl. Abbildung 11 & 12. Es ist zu erwähnen, dass die Hochdurchsatzanalysen ein Gemeinschaftsprojekt bildeten. Sowohl die Ki67-, die Caspase3-Detektionen und Aufnahmen sowie Lokalisationsbestimmungen unter serumhaltigen Bedingungen, sind von einer weiteren Doktorandin, Sandra Kirchof, geb. Melchisedesch, durchgeführt worden.



**Abbildung 11: Musterbeispiel proliferativer und apoptotischer Signale.** Dargestellt sind Überlagerungsaufnahmen aus YFP- (grün), Dapi- (blau) und Einzelmotiven des Cy3-Kanals. Zur Aufnahme **A.** gehört das Überlagerungsbild der *NKX2-5*-YFP transfizierter Hek293 Zellen, das beim Vergleich mit der Ki67-Cy3-Kanalaufnahme eine deutliche Korrelation zwischen den Signalen erkennen lässt. Die mittlere Abbildung **B.** zeigt eine YFP- & Dapikanalaufzeichnung der *HIF0*-YFP transfizierter Hek293 Zellen. Im dazugehörigen Cy3-Kanal lässt sich eindeutig eine kernlokalisierte Färbung der Caspase-3 transfizierter Zellen erkennen und somit ebenfalls ein proapoptisches Signal vermerken. Das letzte Bild **C.** zeigt eine Überlagerungsaufnahme der *PPP2R1A*-YFP transfizierter Panc1-Zellen und der Nukleusfärbung. Die Betrachtung der Aufzeichnung des Cyclin-B1-Cy3-Signals ergibt eine positive Übereinstimmung mit den transfizierten Zellen.



**Abbildung 12. Exemplarische Aufnahmen der E-Cadherin- und Vimentinfärbung.** Die Dokumentationen zeigen jeweils ein Überlagerungsbild aus dem YFP- (grün) bzw. CFP- (gelb) sowie Dapi- (blau) als auch Cy3-Kanal (rot) und dazugehörige Einzelkanalaufnahmen. Das Bild **A.** zeigt ein 360fache Vergrößerung der *TM4SF1*-YFP transfizierter Panc1 Zellen. Durch den Abgleich der Einzelaufnahmen des YFP- und des dazugehörigen Cy3-Kanals lässt sich ein positives Signal für die E-Cadherinfärbung vermerken. Des Weiteren kann diese Aufnahme beispielhaft ein zweites Resultat in Form einer deutlich sichtbaren Colokalisation des *TM4SF1* Genproduktes und E-Cadherins belegen. Abbildung **B.** zeigt eine 360fach vergrößerte Aufnahme der mit *Bcl-10*-YFP transfizierten Panc1-Zellen. Die YFP-Aufnahme lässt eine Kernexpression unter evtl. Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums beobachten. Die Cy3-Färbung zeigt ein positives Signal für einen Vimentinnachweis.

Bemerkenswert ist, dass die funktionelle Analyse in gleicher Weise von Artefaktenbildung betroffen war wie die Auswertung der subzellulären Lokalisation. Neben den bereits gezeigten Störfaktoren kam es zu positiven Caspase-3 Signalen, die nicht als Folge der zellulären Genfunktion in Erscheinung traten, sondern auf Grund der unnatürlich hohen Überexpression der jeweiligen Genkonstrukte. Ein Beispiel dafür stellt das Gen *COPEB* mit positiven proliferativen und gleichzeitig proapoptotischen Signalen in Hek293 Zellen. Es ergaben sich auch Schwierigkeiten mit der Zelllinie S2-007. Durch eine hohe Rate an Ausfällen und Problemen der *Spot*-Zuordnung wurden funktionelle Assays bis auf die Ausnahme der Caspase-3-Färbung nur in den Zelllinien Panc1 und Hek293 durchgeführt. Der vollständige Datensatz, ausgewertet nach dem dreistufigen System ist der Tabelle 11 im Anhang zu entnehmen.

#### 4.1.3 Validierung der reversen Transfektion und Untersuchung der PaCa/Net-Gene

Alle Ergebnisse der reversen Transfektion, zusammengetragen in der Tabelle 9 und 11, (Anhang), erlauben eine Extraktion der Kandidatengene mit den stärksten und reproduzierbarsten Signalen. Diese Vorauswahl ermöglichte eine Literaturrecherche bezüglich der Kandidatengene und bereits erforschter Erkenntnisse im Zusammenhang mit Pankreaskarzinomen. So konnten einerseits von uns ermittelte Befunde bestätigt und zugleich bereits in der Forschung befindliche Themen ausgeschlossen werden. Es ergab sich eine Vorauswahl aus 14 Kandidaten mit reproduzierbaren Effekten, zu denen in der Literatur bisher keine Erkenntnisse vorlagen. Um die Ergebnisse der reversen Transfektion überprüfen zu können, wurden konventionelle Zellkulturmethoden eingesetzt. Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten auf Glasdeckelchen ausgesät, transfiziert, inkubiert und fixiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der subzellulären Lokalisation sowie antikörperdetektierten funktionellen Effekte. In diesem *forward* Transfektionsformat konnten die bestehenden Ergebnisse bekräftigt, neue Daten wie in dem Fall von *FASTK* und *PPP2R4* generiert und falsch positive Ergebnisse, wie zum Beispiel die Lokalisationswechsel von *GTF2F2* und *PPP2RIA*, korrigiert werden; siehe Tabelle 4. Auch bei der Validierung übernahm Frau Sandra Kirchhof, geb. Melchisedesch, den Part der Caspase-3- und Ki67-Assays und teilweise die Lokalisationsbestimmungen, wobei *ADRBK1* sowie *TABPB* bei ihren Arbeiten nicht berücksichtigt wurden und die vollständigen Validierungsdaten dieser Kandidaten fehlten.



| Genkurzzeichen  | Format | Lokalisation              |           |             | Apoptose                |       |             |       | Proliferation |       |        |       | EMT       |       |            |           |            |
|-----------------|--------|---------------------------|-----------|-------------|-------------------------|-------|-------------|-------|---------------|-------|--------|-------|-----------|-------|------------|-----------|------------|
|                 |        | Hek293 vs. Transformierte | +FCS/-FCS | CFP vs. YFP | Morphologisch auffällig |       | Casp3 + FCS |       | Casp3 - FCS   |       | Ki67   |       | Cyclin B1 |       | Vimentin   |           | E-Cadherin |
|                 |        |                           |           |             | Hek293                  | Panc1 | Hek293      | Panc1 | Hek293        | Panc1 | Hek293 | Panc1 | Hek293    | Panc1 | Panc1 -FCS | PANCI+FCS |            |
| <i>ADRBK1</i>   | F      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           | +         |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>CFL1</i>     | F      |                           |           |             |                         |       |             |       | +             |       | ++     |       | +         |       | (+)        |           |            |
|                 | R      |                           | +         |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>CRABP1</i>   | F      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       | +      |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       | +      |       |           |       |            |           |            |
| <i>FASTK</i>    | F      | ++                        |           |             |                         |       | +           |       |               |       | +      | ++    |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           | ++        | +           |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>PPM1G</i>    | F      | ++                        | ++        |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           | ++        |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>PPP2R1A</i>  | F      | +                         |           |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           | ++         |
|                 | R      | +                         | ++        |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       | +         |       |            |           | ++         |
| <i>PPP2R4</i>   | F      | +                         | +         |             |                         |       |             |       | +             |       | +      | +     |           |       |            |           | ++         |
|                 | R      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>Syndecan</i> | F      |                           |           |             |                         |       |             |       | +             |       |        |       |           |       | +          |           |            |
|                 | R      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>TABPB</i>    | F      |                           |           |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>TM4SF1</i>   | F      |                           |           |             |                         | ++    |             | +     |               |       | +      | +     |           |       |            |           | ++         |
|                 | R      |                           |           |             |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>EBI2</i>     | F      |                           |           |             |                         | ++    |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           |           |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>FRA2</i>     | F      |                           |           |             |                         |       | +           | ++    | +             | ++    |        |       |           |       |            | (+)       |            |
|                 | R      | ++                        | ++        |             |                         |       | ++          | ++    |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>GTF2F2</i>   | F      |                           |           |             |                         |       | +           | +     |               | +     |        |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      | ++                        | +         |             |                         |       | +           |       |               |       |        |       |           |       |            |           |            |
| <i>IFI27</i>    | F      |                           |           | ++          |                         |       | +           |       |               | +     |        |       |           |       |            |           |            |
|                 | R      |                           |           | ++          |                         |       |             |       |               |       |        |       |           |       |            |           | +          |

**Tabelle 4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus dem reverse und forward Transfektionsformat.** Aufgelistet sind 14 Kandidatengene, die aus dem Auswahlverfahren nach der reversen Transfektion für die anschließende Datenvalidierung im "vorwärts" Format bestimmt wurden. Die Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der Ergebnisse für subzelluläre Lokalisationsbestimmungen und funktionelle Analysen aus den Mikroarrayversuchen und den Kontrollversuchen. Die zweite Spalte der Tabelle gibt das jeweilige Format für jedes einzelne Gen an, wobei das „F“ für *forward* und das „R“ für *reverse* steht. Das dreistufige Wertungssystem unterteilt die Effekte nach sehr stark, reproduzierbar ( $n \geq 3 = ++$ ), schwach, reproduzierbar ( $2 \leq n \leq 3 = +$ ), nicht eindeutige ((+)) oder keine konstante Veränderung ( $n \leq 2$ ).

Eine spätere Auswahl an 12 zusätzlichen Kandidaten (hinterlegt in der Tabelle 7 im Anhang) wurde auf Basis von Daten, die in einem Kooperationsprojekt im Rahmen des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN PaCaNet) gewonnen wurden, getätigt. Auf Grund der niedrigen Anzahl wurden diese Gene nicht im reversen Transfektionsformat untersucht. Die Entscheidung fiel

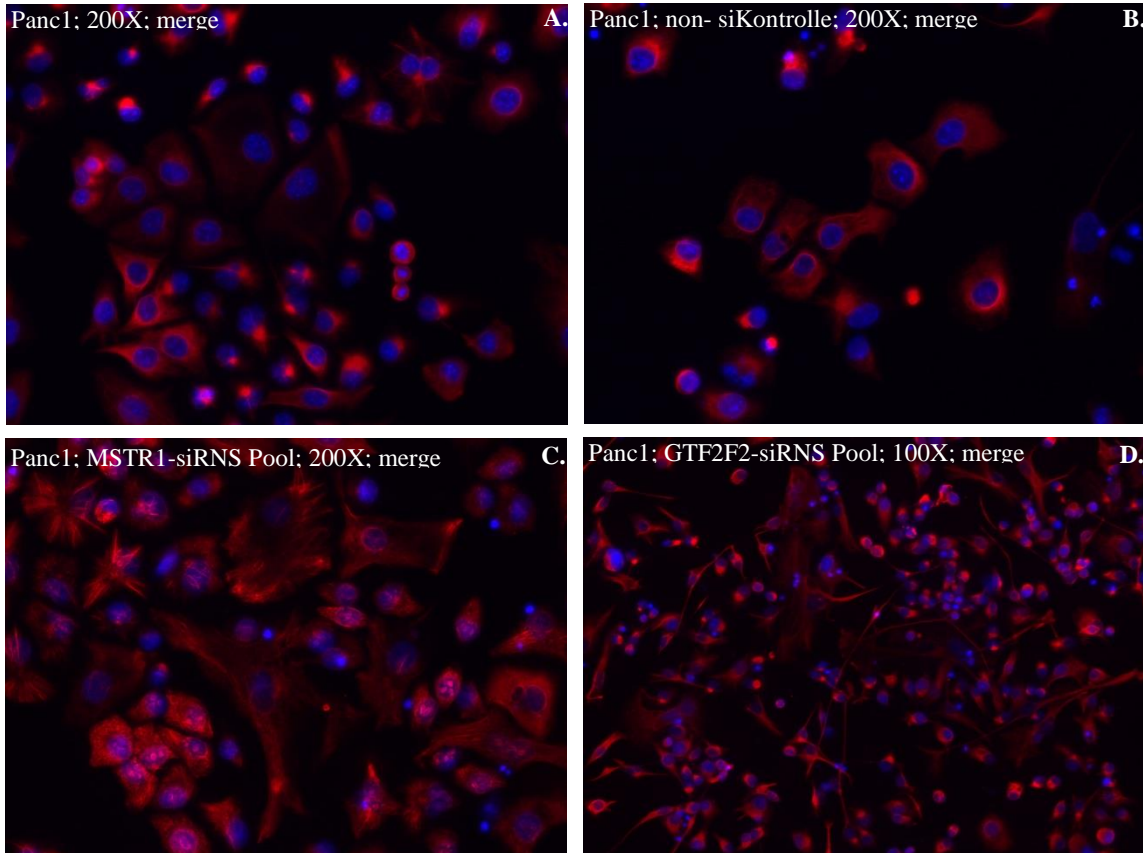
auf den gängigen Zellkulturmodus. Die Zellen wurden in spezielle *Viewer-Plate* 96 Loch-Platten mit extra dünnem Boden für mikroskopische Aufnahmen ausgesät. Die PaCa/Net-Gene lagen ebenso als YFP- und CFP-Fusionskonstrukte vor. Nach der Transfektion, Inkubation und Fixierung wurden die Zelllinien Hek293, S2-007 und Panc1 fluoreszenzmikroskopisch zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation untersucht. Die Auswertung bezog sich auch hier auf die Veränderung der Lokalisation im Vergleich von CFP- und YFP-Konstrukten, Tumorzelllinien versus Hek293-Zellen und Differenzen nach Serumentzug. Die komplette Aufschlüsselung der Lokalisationsbestimmungen ist im Anhang (Tabelle Nr. 10) hinterlegt. Fortführend begannen die funktionellen Analysen mittels der Immunzytologie aus bereits erläuterten Grund nur in Panc1- und Hek293-Zelllinien. Die Ergebnisse der Überexpressionsversuche dieser 12 PaCaNet-Gene sind nach dem üblichen dreistufigen Wertungssystem in der unteren Tabelle Nr. 5 dargestellt. Die Caspase-3- und Ki67-Färbungen und Teile der Lokalisationsbestimmungen wurden von Frau Sandra Kirchof, geb. Melchisedesch, durchgeführt.

|                   | Genkurzzeichen: | Lokalisation              |                 |             | Funktion  |        |        |        |           |        | EMT      |        |            |        | Morphologie |        |        |   |
|-------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-------------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|----------|--------|------------|--------|-------------|--------|--------|---|
|                   |                 | Hek293 vs. Transformierte | 10%FCS vs.0%FCS | CFP vs. YFP | Caspase 3 |        | Ki67   |        | Cyclin B1 |        | Vimentin |        | E-Cadherin |        | Hek293      | Panc 1 | S2-007 |   |
|                   |                 |                           |                 |             | Hek293    | Panc 1 | Hek293 | Panc 1 | Hek293    | Panc 1 | Hek293   | Panc 1 | Hek293     | Panc 1 |             |        |        |   |
| 12 PaCa/Net- Gene | <i>CDC20</i>    |                           | ++              |             |           |        | +      |        |           |        |          |        |            |        |             |        |        |   |
|                   | <i>MAPRE2</i>   | +                         |                 | +           |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             |        |        |   |
|                   | <i>PKM2</i>     | +                         | +               |             |           |        | +      | ++     |           |        |          | ++     |            | +      | +           | +      |        |   |
|                   | <i>TSG101</i>   |                           |                 |             |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             | ++     |        |   |
|                   | <i>NT5E</i>     |                           |                 |             |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             | +      |        |   |
|                   | <i>EZH2</i>     | +                         | ++              |             |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             |        |        |   |
|                   | <i>MRE11A</i>   |                           |                 |             |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             |        |        |   |
|                   | <i>SUV39H1</i>  |                           | ++              | +           | ++        | ++     |        |        |           |        |          |        |            |        |             | +      |        |   |
|                   | <i>RALB</i>     |                           |                 | ++          |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             |        |        |   |
|                   | <i>SRPK1</i>    |                           |                 | +           |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             | +      |        |   |
|                   | <i>PRKCZ</i>    |                           |                 |             |           |        |        |        |           |        |          |        |            |        |             |        | ++     |   |
|                   | <i>RRAS</i>     | +                         | +               | +           | +         |        |        |        | ++        |        |          |        |            |        |             |        | +      | + |

**Tabelle 5. Auswertung der vorwärts Transfektionsanalyse der 12 PaCaNet-Kandidatengene.** Hinsichtlich subzellulärer Lokalisationsveränderungen in Bezug auf 3 verschiedene Kriterien zeigten hier 4 Gene, *CDC20*, *EZH2*, *Suv39H1* und *RALB*, starke reproduzierbare Effekte insbesondere als Reaktion auf das Serumdefizit. Bis auf die Cyclin B1- und E-Cadherinfärbung zeigten auch hier diverse Kandidaten, wie *PKM2*, *PRKCZ* robuste positive Caspase-3, Vimentin- und Ki67-Signale. 2 Gene, *TSG101* und *PRKCZ*, erzeugten starke Veränderungen in der Morphologie der transfizierten Zellen.

#### 4.1.4 Bestimmung der Repressionseffekte

Wie bereits in der Einleitung und der Tabelle 6 festgehalten, wurden zahlreiche Kandidatengene im Pankreaskarzinom als überexprimiert eingestuft und somit sollten die Repressionsversuche einen festen Bestandteil unserer Hochdurchsatzanalysen bilden. Da eine siRNS-Bibliothek, bestehend aus jeweils 4 individuellen fluoreszenzmarkierten siRNS gegen alle Kandidaten sehr kostspielig gewesen wäre, sollten diese Versuche im *reverse* Transfektionsformat durchgeführt werden, wobei die *Spots* nicht mit Hilfe der fluoreszierenden Produkte, sondern über die Farbmarkierung der *Spots* identifiziert werden sollten. Die in der siRNS-Bibliothek gegen unsere Kandidatengene eingesetzten Sequenzen (ohne Fluoreszenzmarkierung; jeweils vier Sequenzen pro Gen) sind der Tabelle 8 im Anhang aufgeführt. Da die Menge der siRNS aufgrund der Kosten gering gehalten werden sollte, jedoch die Transfektionseffizienzen nicht darunter leiden durften, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein TopSpot® E-Microarrayer Spotter der Firma BioFludix GmbH eingesetzt. Diese nach dem Piezo-Prinzip kontaktlos arbeitende Maschine erlaubt ein frei wählbares Volumen im nL-Bereich und ein schnelles drucken von Mikroarrays. Allerdings konnte unsere Arbeitsgruppe sowie das *Supportteam* des Herstellers das Problem mit der Viskosität der Gelatine zur Immobilisierung der *Spots* und damit verbundenen Verschlüsse der Kapillarleitungen trotz zahlreicher Versuche nicht beheben. Auf Grund dieser Problematik fiel die Entscheidung zur Anwendung des *forward* Transfektionsformats in den speziellen *Viewer-Plate* 96 Loch-Platten zur Untersuchung der Effekte in der Hek293- und der Panc1-Zelllinien nach der Herunterregulation der Kandidatengene im gewöhnlichen Zellkulturmodus. Für die Repression kam pro Gen ein Pool aus jeweils vier verschiedenen gegen ein bestimmtes Gen gerichteten siRNS zum Gebrauch. Die Zellen wurden ausgesät, transfiziert und fixiert. Wie bereits bei den Überexpressions- experimenten erfolgte eine Färbung mit E-Cadherin- und Vimentin-Antikörpern zur Untersuchung der Wirkung der Kandidatengenherunterregulation auf die epithelial-mesenchymale Transition. Die einzelnen Vertiefungen der 96-Loch-Platte wurden zur Übersicht mikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung begutachtet und bei 200- bzw. 360-facher Vergrößerung im Detail untersucht und dokumentiert. Ergebnisse der funktionellen parallelisierten EMT-Untersuchung nach durchgeführter Herunterregulation der Kandidatengene sind in der Tabelle 12 (Anhang) zusammengetragen und exemplarische Effektdarstellungen sind der Abbildung Nr. 13 zu entnehmen. Die proliferativen Effekte wurden dieses Mal in Form eines BrdU- und MTT-Assays ebenfalls in 96-Loch-Platten, wie im Methodenteil 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben, von Frau Sandra Kirchhof durchgeführt und gemessen. Diese Versuche lieferten keine weiter verwendbaren Daten und sind daher in dieser Arbeit nicht weiter verzeichnet.



**Abbildung 13: Exemplarische Effektaufnahmen der Vimentinfärbung der Repressionsversuche inklusive der Kontrollen.** Aufnahme **A.** zeigt unbehandelte Panc1 Zellen. Die Aufnahme **B.** wurde ebenfalls von Panc1 Zellen nach der Transfektion mit non-silencing Kontroll-siRNS angefertigt. Beide Aufzeichnungen, dargestellt in 200facher Vergrößerung, belegen vimentingefärbte Kontrollgruppen zu den mit jeweils gegen einen bestimmten Kandidaten gerichtetem siRNS-Pool behandelten Zellen. Abbildung **C.** dient als Beleg für einen beobachteten Effekt, nach der Runterregulation des Gens MSTR1 in Panc1-Zellen. Die 200fache Vergrößerung zeigt deutlich eine Vimentinkernfärbung und -strukturveränderung im Vergleich zu den Kontrollen im Abschnitt **A.** und **B.** Die Dokumentation der mit GTF2F2-siRNS transfizierten Panc1-Zellen in der Darstellung **D.** offenbart morphologische Veränderungen. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wirken die Zellen deutlich filamentöser und verzweigter.

#### 4.1.5 Auswahl der Gene für die Einzelcharakterisierung

Zusammenfassend ergab sich nach der Validierung eine Auswahl von 11 Kandidaten aus der Liste der ursprünglichen 79 Kandidaten zur Einzelgencharakterisierung. Die Auswertung belegte, dass alle 11 entweder funktionelle Effekte und/oder eine subzelluläre Lokalisationsveränderung nach der Überexpression aufweisen. Zusätzlich zeigten zwei dieser Gene, *EBI2* und *CRABPI*, ebenso Signale nach der Repression der Kandidaten auf der RNS-Ebene. Die Sichtung der 12 PaCaNet-Gene ermöglichte ebenfalls die Selektion von fünf Genen mit starken Effekten aus den Überexpressionsversuchen, wobei *RRAS* zusätzlich Signale in Abhängigkeit von der siRNS-Behandlung lieferte. Darüber hinaus brachte die Herunterregulation zusätzlich zwei weitere potentielle Gene zur Einzelanalyse, die keine überexpressionsabhängigen Signale vorwiesen, vgl.

Tabelle Nr. 6. Im Ganzen ergab die Evaluierung ein Kollektiv von 18 Genen, wobei drei spezifisch für PanIN-Läsionen, drei als unter- und 12 als überexprimiert im Pankreaskarzinom zugeordnet, waren.

|   | <b>Genkurzzeichen:</b> |               | <b><u>Auswirkung der Überexpression des Kandidaten:</u></b>                                 | <b><u>Auswirkung der Repression des Kandidaten:</u></b> |
|---|------------------------|---------------|---|---|
| <i>reverse &amp; forward transfection</i> | <i>ADRBK1</i>          | ÜE            | Lokalisationswechsel  |   |
|   | <i>CFL1</i>            | ÜE            | Proliferationssignale   |   |
|   | <i>CRABP1</i>          | ÜE            | Proliferationssignale   | Vimentinstrukturveränderung                             |
|   | <i>FASTK</i>           | ÜE            | Lokalisationswechsel  |   |
|   | <i>PPM1G</i>           | ÜE            | Lokalisationswechsel, proapoptotische Signale   |   |
|   | <i>PPP2R1A</i>         | ÜE            | Lokalisationswechsel, vermehrte E-Cadherinfärbung   |   |
|   | <i>PPP2R4</i>          | ÜE            | Lokalisationswechsel, vermehrte E-Cadherinfärbung   |   |
|   | <i>EB12</i>            | UE            | Phänotypveränderung, proapoptotische Signale  | vermehrte E-Cadherinfärbung                             |
|   | <i>Fra-2, FOSL2</i>    | UE            | Lokalisationswechsel, proapoptotische Signale   |   |
|   | <i>GTF2F2</i>          | UE            | Lokalisationswechsel, proapoptotische Signale   |   |
|   | <i>IF127</i>           | PanIN         | Lokalisationswechsel, vermehrte E-Cadherinfärbung   |   |
|   | <b>PaCaNet-Gene</b>    | <i>MAPRE2</i> | ÜE  | Lokalisationswechsel, vermehrte E-Cadherinfärbung       |
| <i>PKM2</i>                               |                        | ÜE            | Lokalisationswechsel, Phänotypveränderung, proliferative Signale, vermehrte Vimentinfärbung |   |
| <i>SUV39H1</i>                            |                        | ÜE            | Lokalisationswechsel, Phänotypveränderung, proapoptotische Signale                          |   |
| <i>PRKCZ</i>                              |                        | ÜE            | Phänotypveränderung, proliferative Signale  |   |
| <i>RRAS</i>                               |                        | ÜE            | Lokalisationswechsel, Phänotypveränderung   | vermehrte E-Cadherinfärbung                             |
| <b>k.d.</b>                               | <i>c8orf20</i>         | PanIN         |   | Phänotyp-, Vimentinstrukturveränderung                  |
|   | <i>CST3</i>            | PanIN         |   | Vimentinstrukturveränderung                             |

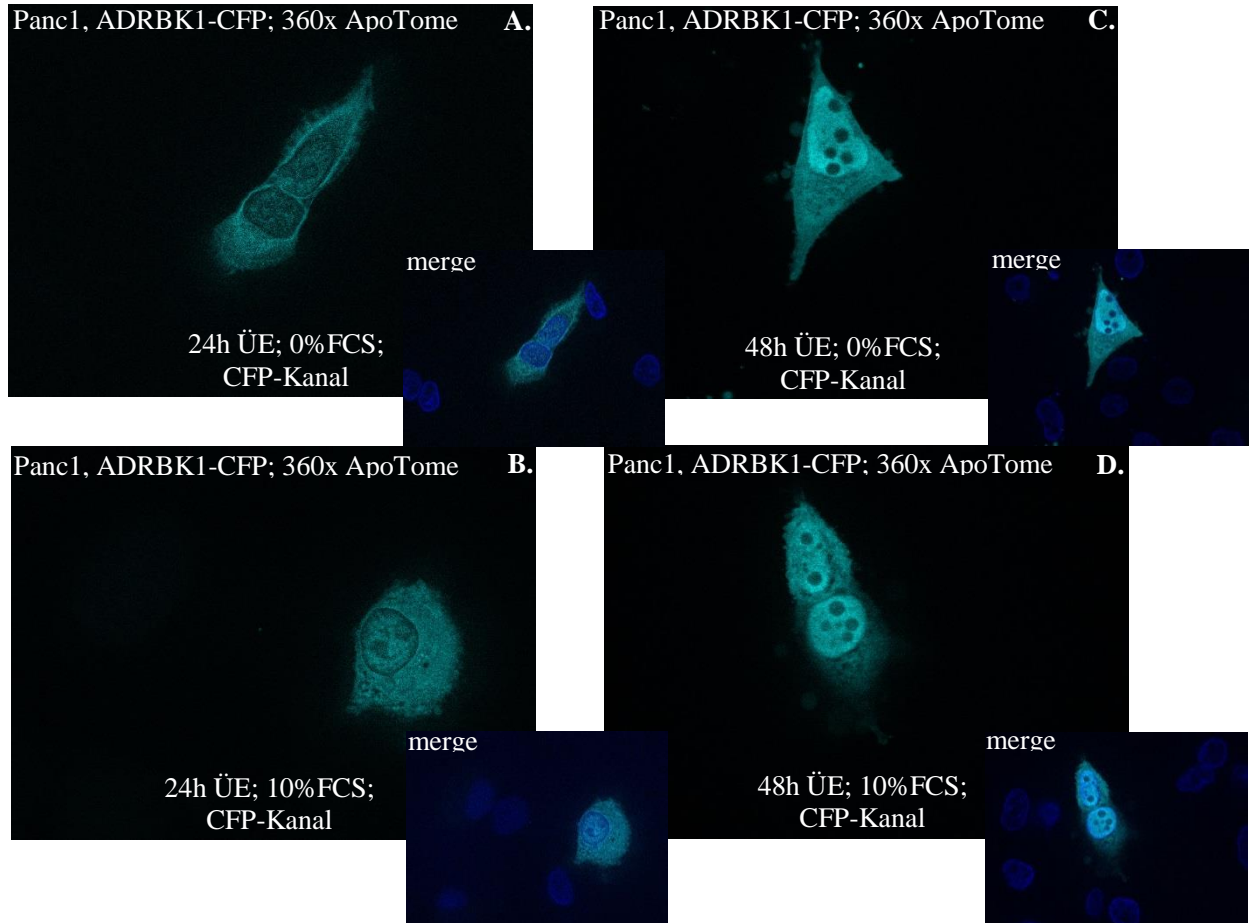
**Tabelle 6: Zusammenfassende Übersicht der 18 Kandidatengene für die Einzelgenanalyse.** Die linke Spalte benennt mit den Überschriften *reverse & forward transfection*, PaCaNet-Gene sowie *knock down*,

abgekürzt k.d., die Herkunft der Wahlkategorie. Nach der Spalte mit der Genbezeichnung wird die ursprünglich eingeordnetes Expressionslevel im Pankreaskarzinom mit den Abkürzungen „ÜE“ für überexprimiert, „UE“ für unterexprimiert und „PanIN“ für spezifisch in PanIN-Stadien für das jeweilige Gen ausgewiesen. Folgend wurden die Effekten in der linken Spalte aus den Überexpressions- und in der rechten Spalte aus den Repressionsversuchen für das entsprechende Gen zusammengefasst.

## **4.2 *ADRBK1*-Einzelgencharakterisierung**

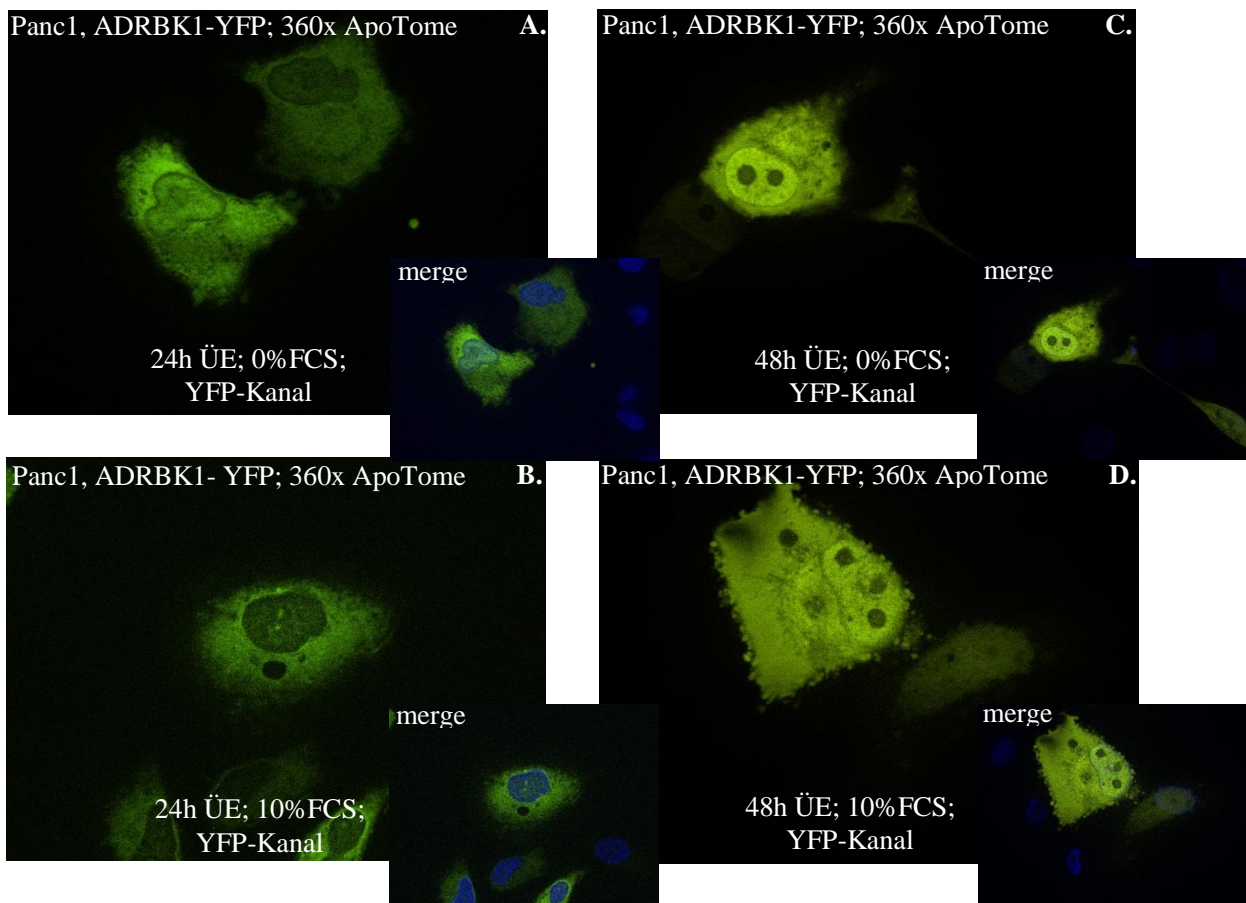
### **4.2.1 Expressionsmuster in humanem Gewebe und Modellzelllinien**

*ADRBK1*, auch als *GRK2* bezeichnet, ist ein Auswahlkandidat der Hochdurchsatzanalyse. Das Gen gehört zur Gruppe der im Pankreaskarzinom überexprimierten Gene und stellte durch den Lokalisationswechsel in Abhängigkeit vom Serumentzug einen interessanten Kandidaten für die Einzelgenuntersuchung dar. Die ersten Einzelgenanalysen dienten dem Ziel, diese Ergebnisse zu validieren. Zum Zwecke der subzellulären Lokalisationsbestimmung wurde die Zelllinie Panc1 mit Überexpressionskonstrukten *ADRBK1*-YFP und -CFP auf Deckgläschen transfiziert und ein Teil der Ansätze bei 10% und die andere Hälfte bei Serumentzug kultiviert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der subzellulären Lokalisationen nach 24, 48 und 72 Stunden Überexpression in Panc1-Zellen. Das Resultat zeigt eine zytoplasmatische *ADRBK1*-Lokalisation sowohl für CFP- als auch für YFP-Konstrukte unabhängig vom Serumgehalt, siehe Abbildung 14 und 15. Nach 48h Stunden ergab sich ein Wechsel von rein zytoplasmatischen zu sowohl Kern- als auch Zytoplasmalokalisation in Panc1-Zellen, unabhängig vom Konstrukt und Serum. Der ursprünglich dokumentierte Lokalisationswechsel fand abhängig von der Zeitkonstante statt.



**Abbildung 14: Nachweis des subzellulären ADRBK1-CFP-Lokalisationswechsel in Panc1 Zellen.** Die Darstellung beinhaltet ein CFP-Kanalaufnahme (hellblau) und das dazugehörige Überlagerungsbild aus CFP- und Dapi-Kanal (blau) bei einer 360fachen Vergrößerung. Die Darstellungen **A.** und **B.** zeigen Panc1-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit dem ADRBK1-CFP-Konstrukt. Die Zellen in der oberen Abbildung wurden ohne und in der unteren mit 10% Serum kultiviert. Es lässt sich eine deutliche Verteilung des ADRBK1 auf das Zytoplasma erkennen. Die Aufnahmen **C.** und **D.** zeigen ebenfalls Panc1-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem ADRBK1-CFP-Konstrukt sowohl mit Serumentzug im oberen aber auch mit 10% Serumbehandlung im unteren Bild. Es ist ein deutlicher Wandel in der zellulären ADRBK1- Verteilung auf den Nukleus und Zytoplasma zu erkennen.



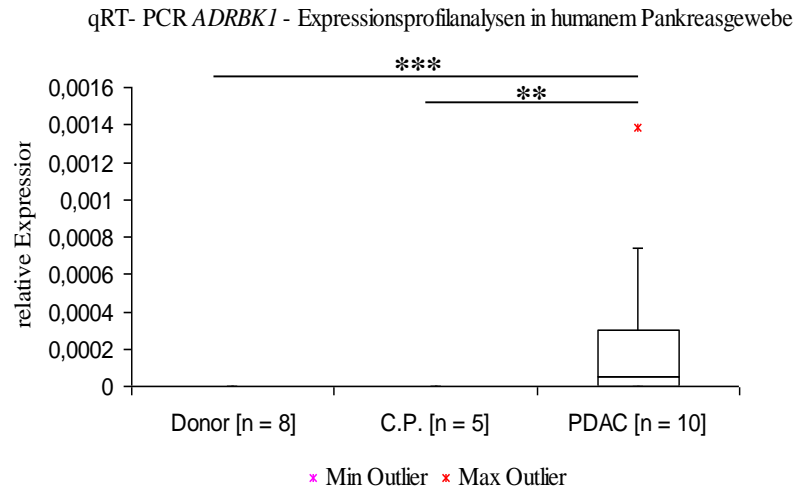


**Abbildung 15: Nachweis des subzellulären ADRBK1-YFP-Lokalisationswechsel in Panc1 Zellen.** Die Darstellung beinhaltet ein YFP-Kanalaufnahme (grün) und das dazugehörige Überlagerungsbild aus YFP- und Dapi-Kanal (blau) bei einer 360fachen Vergrößerung. Die Darstellungen **A.** und **B.** zeigen Panc1-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit dem ADRBK1-YFP-Konstrukt. Die Zellen in der oberen Abbildung wurden ohne und in der unteren mit 10% Serum kultiviert. Es lässt sich eine deutliche Verteilung des ADRBK1 auf das Zytoplasma erkennen. Die Aufnahmen **C.** und **D.** zeigen ebenfalls Panc1-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit dem ADRBK1-YFP-Konstrukt sowohl mit Serumentzug im oberen aber auch mit 10% Serumbehandlung im unteren Bild. Es ist ein deutlicher Wandel in der zellulären ADRBK1- Verteilung auf den Nukleus und Zytoplasma zu erkennen.

Die Hochdurchsatzanalysen mit Genexpressions-Arrays hatten für *ADRBK1* eine Überexpression im Pankreaskarzinom ergeben. Um diese Ergebnisse zu validieren erfolgte die Expressionsanalyse von *ADRBK1* auf der mRNA-Ebene in humanem Gewebe sowie Zelllinien. Zunächst wurde gesamtzelluläre RNS aus humanem Gewebe und Zelllinien extrahiert und in cDNA umgeschrieben und anschließend in der quantitativen RealTime PCR analysiert. Die chirurgische Entnahme des genutzten humanen Gewebes wurde unter Einhaltung der Ethikrichtlinien sowie dem Einverständnis der Patienten vom chirurgischen Institut der Universität Heidelberg durchgeführt. Als Vergleichsmaterial diente Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis sowie gesundes

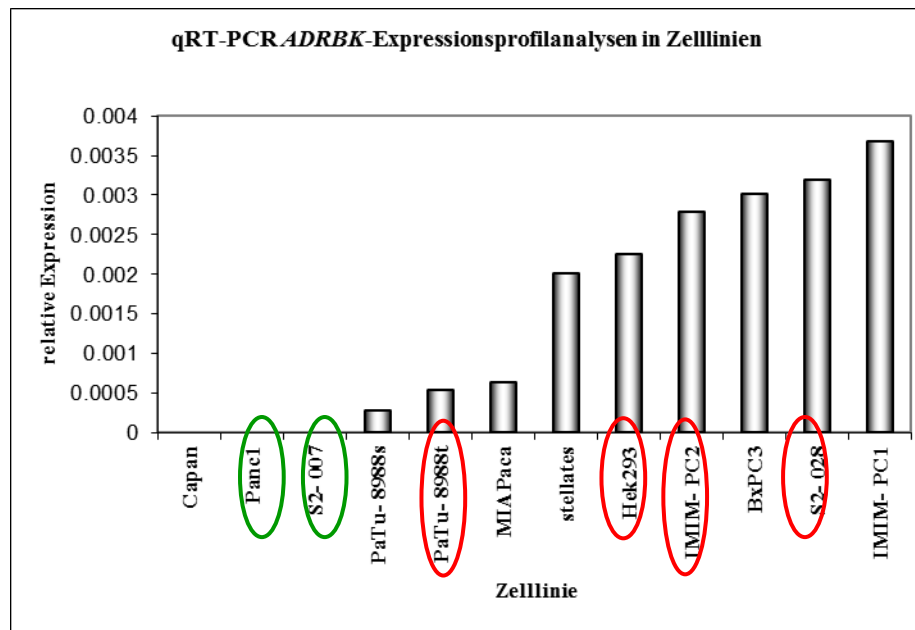


Pankreasgewebe. Abbildung 16 zeigt die *ADRBK1*-Expression im gesunden, an chronischer Pankreatitis erkranktem und Tumorgewebe anhand der quantitativen RT-PCR-Daten. Es lässt sich eine signifikant erhöhte *ADRBK1*-Expression im Tumorgewebe sowohl gegenüber der chronischen Pankreatitis als auch dem gesundem Material belegen, wodurch die ursprünglich ermittelten Angaben bestätigt wurden.



**Abbildung 16: Via quantitative RT-PCR ermittelte *ADRBK1*-Expression in humanem Gewebe.** Anhand der qRT-PCR wurden Daten für Proben der chronischen Pankreatitis (CP), Pankreaskarzinom (PDAC) und gesundem Gewebe (Donor) generiert. Die Variable  $n$  gibt die Menge verwendeter Proben an. Die gemessenen Werte für *ADRBK1* wurden mit Hilfe des Haushaltgens *RPLP0* normalisiert. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Überexpression in den Tumorproben im Vergleich zu den Gruppen der chronischen Pankreatitis und gesundem Material. Mann-Whitney U-Statistiktest: \*\*\* =  $p < 0,0001$ ; \*\* =  $p < 0,001$

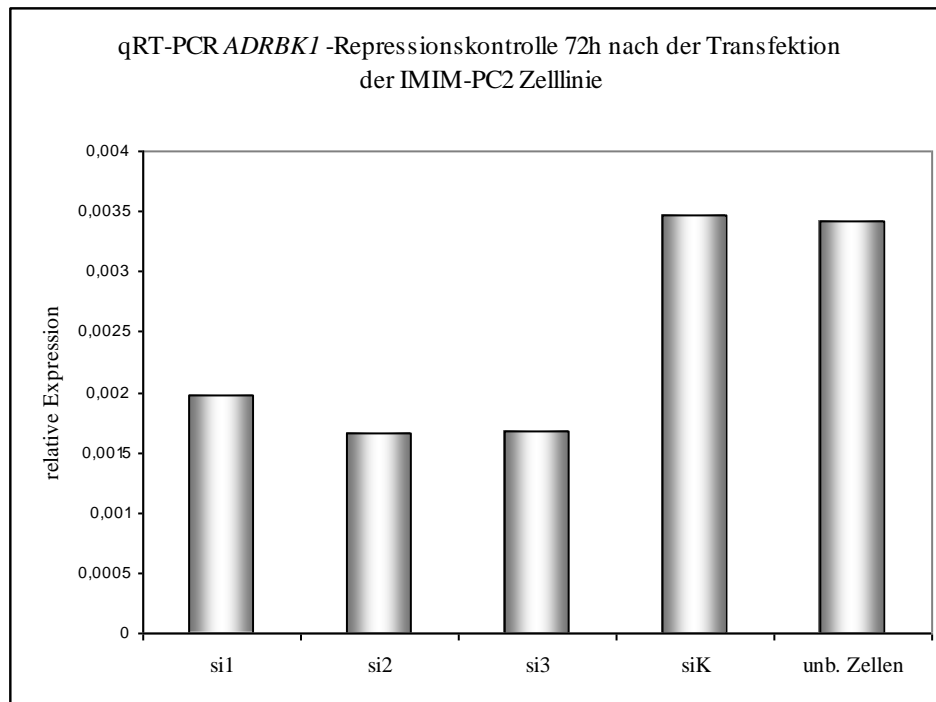
Zur Auswahl geeigneter Zelllinien für weitere funktionelle Analysen wurde eine qRT-PCR-Untersuchung der *ADRBK1*-Expression in etablierten humanen Zelllinien (vgl. Abschnitt 2.1.1) durchgeführt. Das zweite Diagramm zeigt die *ADRBK1*-Expression sowohl in transformierten als auch in der nicht-transformierten Kontrollzelllinien Hek293 (Abbildung 17). Die Auswahl der passenden Zelllinien für die Repressionsversuche fiel aufgrund der hohen Werte auf die S2-028 und IMIM-PC2. Eine Reihe von Untersuchungen wurden außerdem zusätzlich in PaTu-8988T Zellen durchgeführt. Die Zelllinien Panc1 und S2-007 zeigten keine Expression an endogenem *ADRBK1* und wurden somit für die Überexpressionsversuche bestimmt.



**Abbildung 17: Expressionsprofil von *ADRBK1* in Pankreaskarzinomzelllinien.** Mittels der quantitativen *real time*-PCR wurde der *ADRBK1*-mRNS-Gehalt in den Tumorzelllinien und Hek293-Zellen bestimmt. Es erfolgte eine Normalisierung der Werte entsprechend der Expression des Haushaltgens RPLP0. Die Zelllinien Capan, Panc1 und S2-007 wiesen keine *ADRBK1* Expression auf. In den Linien PaTu-8988T und -8988S sowie MIA PaCa wurde im Vergleich zu den übrigen Proben ein geringeres Expressionslevel gemessen. Grün markierte Zelllinien wurden für die Überexpressionsversuche und rot markierte für die Repressionsversuche ausgewählt.

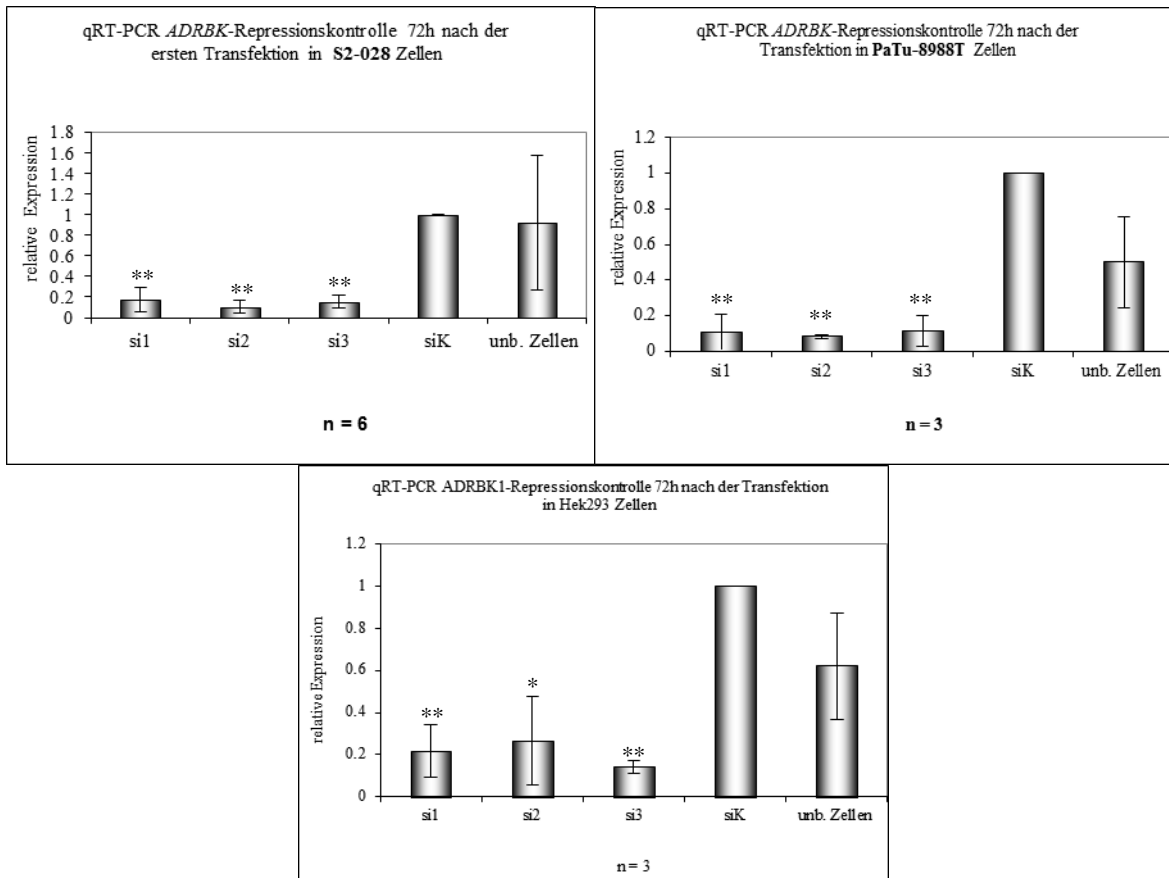
#### 4.2.2 *ADRBK1*-Repression

Zunächst sollte in den entsprechend ausgewählten Zelllinien ein signifikanter *knock down* des Gens in den Zelllinien etabliert und anhand der qRT-PCR auf der mRNS-Ebene nachgewiesen werden. Für diese Versuchsansätze wurden drei siRNS unterschiedlicher Sequenzen transfiziert. Als Kontrolle diente eine *non-sense* siRNS, die nachweislich kein entsprechendes Pendant als Ziel-mRNS hat. Nach 72 Stunden erfolgte die Gesamt-RNS-Ernte, Transkribierung in cDNA und die Messung anhand der quantitativen RT-PCR. Abbildung 18 belegt eine *knock down*-Effizienz des *ADRBK1* in der Zelllinie IMIM-PC2. Für S2-028 und IMIM-PC2 konnte zunächst kein für weitere Untersuchungen geeigneter *knock down* nach der Transfektion entsprechend dem Standardprotokoll (s. Methodenteil 3.1.7) nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: Darstellung der *ADRBK1* knock down Kontrolle in IMIM-PC2 Zellen.** Das Balkendiagramm zeigt die relative Expression des *ADRBK1*-Gens 72 Stunden nach der Transfektion der IMIM-PC2 Zellen mit entsprechenden siRNS sowie unbehandelten Zellen (Abk. unb.). Im Vergleich zu den Kontrollen zeigen die mit si1, 2, 3 transfizierten Ansätze eine Runterregulation des *ADRBK1*-Gens (<50%).

Nach diversen Versuchen und Protokollmodifikationen war es nicht möglich, die *knock down* Effizienzen in der Zelllinie IMIM-PC2 zu erhöhen. Hingegen bewirkte eine Wiederholung der siRNS-Transfektion 24 Stunden nach der ersten Transfektion eine annehmbare Repression des *ADRBK1*-Gens in den S2-028 Zellen. Sowohl die Hek293, als auch die PaTu-8988T bereiteten keine besonderen Schwierigkeiten bei der Anwendung des Standardtransfektionsprotokolls. Die Datenanalyse zeigte eine signifikante, transiente im Durchschnitt 85,5-prozentige Herunterregulation des Kandidaten in allen drei verwendeten Zelllinien, siehe Abbildung 19.

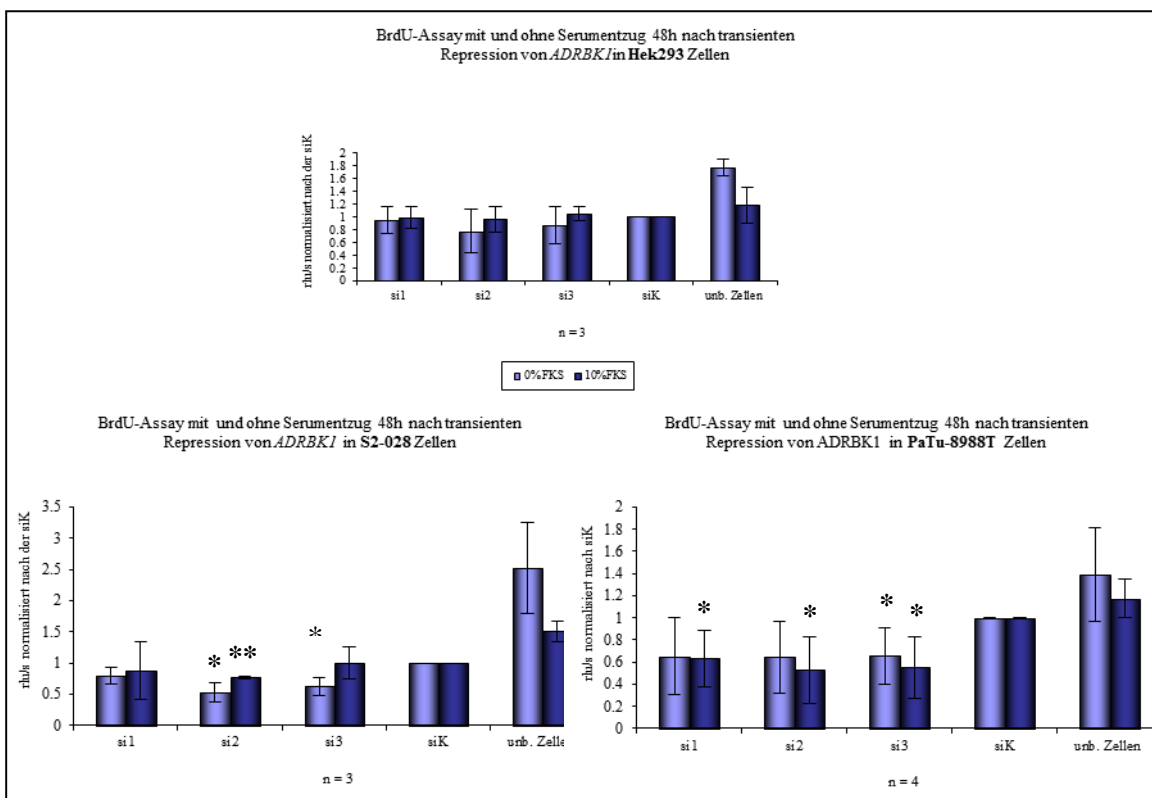


**Abbildung 19: *ADRBK1* knock down in S2-028, PaTu-8988T und Hek293.** Die Balkendiagramme zeigen die relative Expression des *ADRBK1* 72 Stunden nach der Transfektion mit drei entsprechenden siRNS sowie Kontroll-siRNS (Abk. siK) in 3 verschiedenen Zelllinien. Jedes Diagramm umfasst mindestens 3 Versuche. Zur statistischen Auswertung wurden alle Werte auf die siKontrolle normalisiert. So ergab sich eine hohe Signifikanz für alle verwendeten siRNS in den transformierten Zellen in Bezug auf die siKontrolle. In den Hek293-Zellen wurde bis auf die si2 ebenfalls eine hochsignifikante Runterregulation des *ADRBK1*-mRNS-Level erreicht. Die stärkste Repression von über 90% zeigte sich in den PaTu-8988T Zellen, die schlechteste siRNS2 in den Hek293 mit 74%. Besonders auffällig ist das hochvariable mRNS-Grundniveaus, erkennbar an den Fehlerbalken, in den unbehandelten Zellen (Abk. unb. Zellen) was sich gruppenübergreifend abzeichnet. Die Variable  $n$  gibt die Anzahl der unabhängigen Versuche an. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

#### 4.2.3 *ADRBK1*-Einfluss auf das Zellwachstum & Viabilität

Ausgehend von der belegten Überexpression der Kinase *ADRBK1* in Pankreastumorgewebe und in der Einleitung erörterten Beteiligung an zahlreichen zellulären Mechanismen wurden nun zur Ergründung funktionaler Effekte des *ADRBK1* in Tumorzelllinien zunächst eine Reihe Assays nach der transienten Repression des Gens in S2-028, PaTu-8988T und Kontrollzelllinie Hek293 durchgeführt. Die Zellen wurden transfiziert, 48 Stunden mit und ohne Serumentzug kultiviert und folgend ein BrdU-Assay zur Messung der Proliferation durchgeführt. Abbildung 20 stellt zusammenfassend die nach der siKontrolle normalisierten Ergebnisse der mindestens drei Durchläufe pro Zelllinie, mit und ohne Serumentzug dar. Der *knock down* des Kandidatengens führte

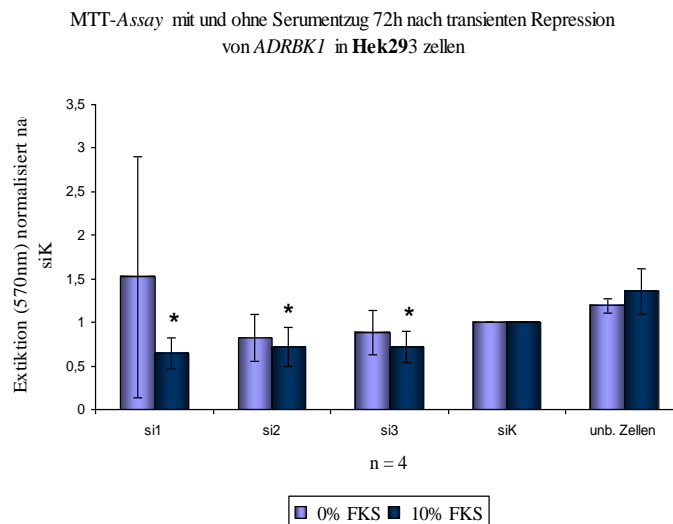
in den transformierten Zellen zur signifikanten Abnahme der Proliferationsraten. Die PaTu-8988T-Zellen zeigten für alle drei siRNS bei serumhaltiger Kultivierung eine signifikante Reduktion des Zellwachstums. Unter Serumentzug wurden ausschließlich für die siRNS3 signifikante Resultate verzeichnet. Es konnten in allen Ansätzen der Zelllinie PaTu-8988T im Vergleich zur siKontrolle ein Rückgang von mindestens 40% gemessen werden. Die doppeltransfizierte S2-028-Versuchsgruppe wies für die siRNS1-Behandlung keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen auf. Die siRNS 2 und 3 bewirken jedoch einen 40- bis 50-prozentige Senkung der Proliferationsraten unter Serumentzug. Bei Serumzugabe konnten ausschließlich für die siRNS2 hoch signifikante Ergebnisse erzielt werden. Es zeigte sich nach 48-stündiger Repression, dass *ADRBK1* unabhängig von der Serumbehandlung keinen Einfluss auf die Proliferation der nicht-transformierten Zellen (HEK293) hatte. Bis auf die siRNS2-Ausnahme mit 20% gab es keinen messbaren, signifikanten Proliferationsrückgang in Hek293 Zellen.

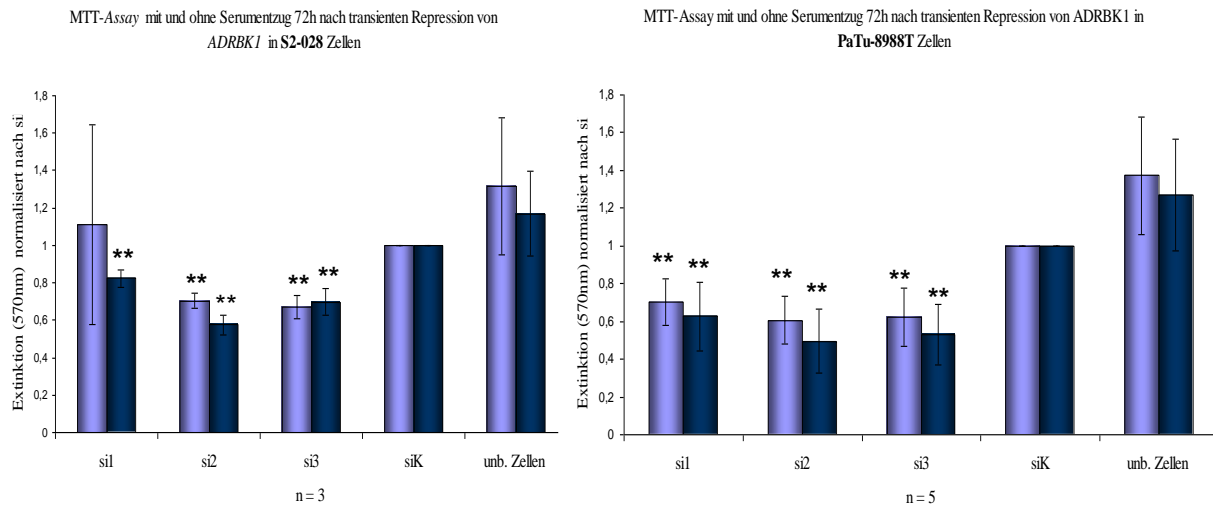


**Abbildung 20: Dokumentation der Proliferationseffekte basierend auf der transienten *ADRBK1*-Repression.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der BrdU-Assays nach der 48-stündigen Runterregulation des Kandidatengens durchgeführt in 3 verschiedenen Zelllinien mit (hellblau) und ohne (dunkelblau) Serumentzug dar. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch „n“ angegeben. Die Daten wurden nach dem Wert der siKontrolle normalisiert und gemittelt. Das obere Diagramm stellt die Ergebnisse für Kontrollzelllinie Hek293 dar. Es ist keine Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu siKontrolle festzustellen. Die transformierten Zelllinien insbesondere PaTu-8988T verzeichnen signifikante Rückgänge der Proliferationsraten jedoch mit einigen Ausnahmen. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

Ergänzend zur Untersuchung der proliferativen Effekte mittels BrdU-*Assays* wurde die Auswirkung der *ADRBK1*-Repression auf die Zellviabilität ermittelt. S2-028, PaTu-8988T und die Kontrollzelllinie Hek293 wurden transfiziert, 72 Stunden mit und ohne Serum kultiviert, anschließend ein MTT-Assay durchgeführt und gemessen. Abbildung 21 stellt zusammenfassend die Ergebnisse der mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchsdurchläufe nach der Transfektion mit siRNS1, 2, 3 sowie *non-sense* Kontrolle und un behandelter Zellen dar. Ähnlich wie die BrdU-*Assays* zeigen die Hek293 Zellen unter Serumentzug keine signifikante Veränderung der Zellviabilität. Die siRNS1 behandelte Ansätze weisen sogar einen Anstieg der vitalen Zellzahl auf, allerdings mit hohen Standardabweichungen. Für die serumkonditionierten Ansätze wurde eine signifikante Reduktion für alle drei siRNS im Vergleich zur siKontrolle gemessen.

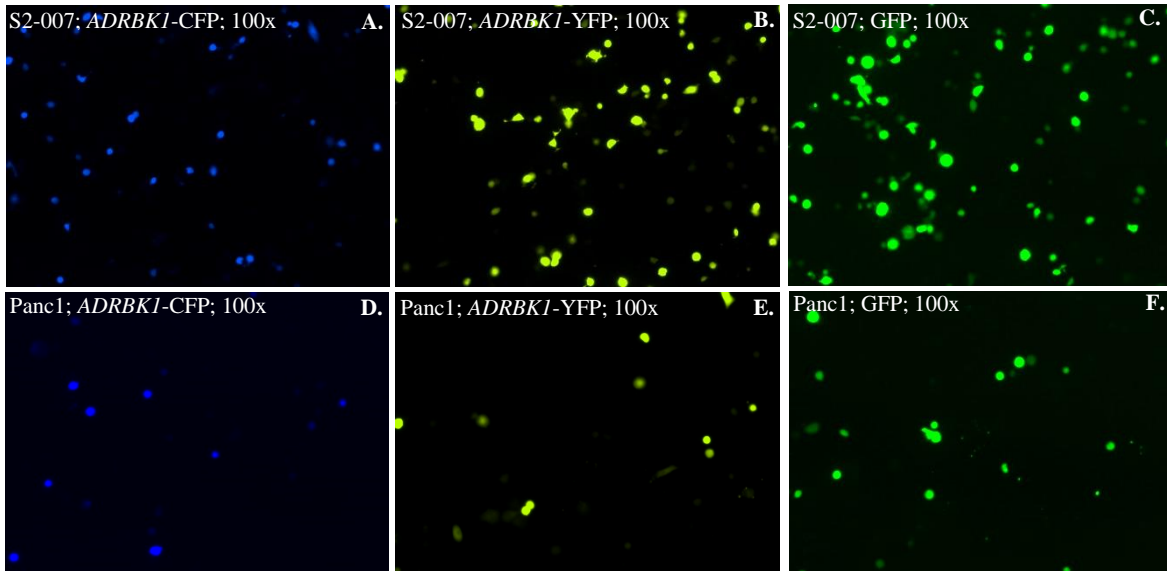
Tendenziell konnten die in BrdU-*Assays* für die transformierten Zelllinien ermittelten Trends bestätigt werden. So zeigte sich in den doppeltransfizierten S2-028 Zellen ein signifikanter Rückgang der Zellviabilität für alle drei siRNS im Vergleich zur siKontrolle unter Serumbehandlung, insbesondere für siRNS2 von bis zu >40 Prozent. Die serumfreien Tests zeigten ebenfalls einen signifikanten Rückgang für die siRNS2 und 3. Die siRNS1-Transfektion bewirkte, wie auch in Hek293 Zellen, einen im Vergleich zur siKontrolle mit großer Standardabweichung verbundenen Anstieg der Zellviabilität. Die stärksten Effekte mit über 50-prozentigem Rückgang wurden in den PaTu-8988T Zellen gemessen. Jeder Ansatz zeigte eine hochsignifikante behandlungsunabhängige Abnahme der Zellviabilität nach der 72-stündigen *ADRBK1*-Repression.





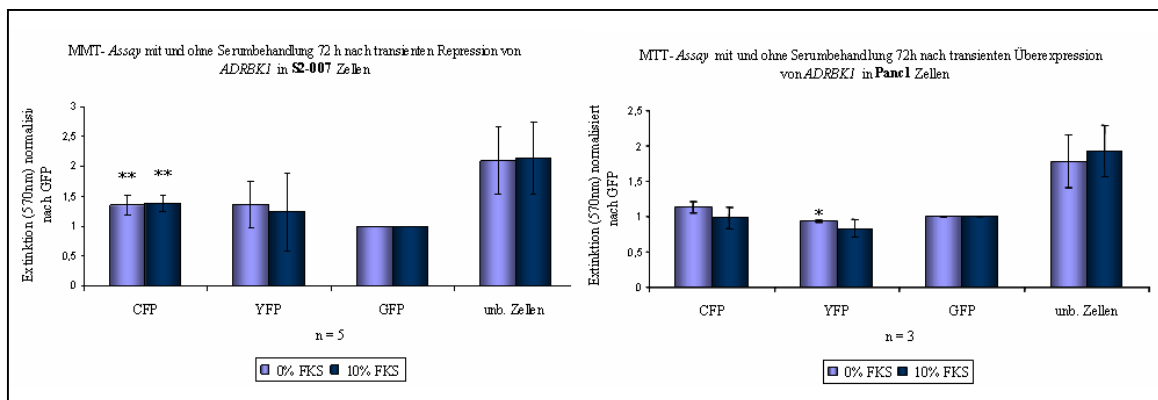
**Abbildung 21: Darstellung der Zellviabilität in Abhängigkeit von der transienten *ADRBK1*-Repression.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der MTT-Assays nach der 72-stündigen Runterregulation des Kandidatengens durchgeführt in 3 verschiedenen Zelllinien mit (hellblau) und ohne (dunkelblau) Serumentzug dar. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch „n“ angegeben. Die Daten wurden nach dem Wert der siKontrolle normalisiert und gemittelt. Das obere Diagramm stellt die Ergebnisse für Kontrollzelllinie Hek293 dar. In den serumbehandelten Ansätzen wurde eine signifikante Reduktion für alle 3 siRNS gemessen. Serumfreie Versuchsbedingungen bewirkten keine signifikante Abnahme. Die transformierten Zellen S2-028 und PaTu-8988T zeigten im Vergleich zu Hek293 stärkere und signifikantere Zellviabilitätsrückgänge in Abhängigkeit von der *ADRBK1* Repression. Eine Ausnahme wie auch schon in der Kontrollzelllinie bildet die siRNS1-Transfektion in S2-028 Zellen. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

Basierend auf den starken Effekten der MTT-Assays nach der Herunterregulation des Kandidaten *ADRBK1* wurde die Zellviabilität nach der Überexpression des Kandidaten in den Panc1 und S2-007 Zelllinien getestet. Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurden die Zellen transfiziert, 72 Stunden mit und ohne Serum kultiviert und folgend ein MTT-Assay durchgeführt und gemessen. Abbildung 22 dokumentiert die Transfektionseffizienzen für die Zelllinien S2-007 und Panc1 72 Stunden nach der Transfektion mit YFP- und CFP-Fusionskonstrukten sowie GFP als Kontrolle. Für die S2-007 Zellen konnten Transfektionseffizienzen von über 90% sowohl für YFP- und CFP-Konstrukte erzielt werden. Die Panc1 Zellen wiesen geringere, aber ausreichende 70-80% Effizienzen sowohl für *ADRBK1* aber auch für die GFP-Kontrolle auf.



**Abbildung 22: Übersichtsaufnahmen der *ADRBK1*-Transfektionseffizienzen der Panc1, S2-007 Zellen.** Die Darstellung beinhaltet die Aufnahmen einzelner CFP- (blau), YFP- (gelb) und GFP- (grün) Kanäle bei 100-facher Vergrößerung sowohl in Panc1 als auch in S2-007 Zellen. Die Aufnahmen von **A., B., C.** zeigen S2-007 Zellen mit über 90% Effizienzen sowohl für *ADRBK1*-Fusionskonstrukte als auch die GFP-Kontrolle. Die Bilder **D., E., F.** belegen geringere Effizienzen in den Panc1-Zellen für alle Ansätze.

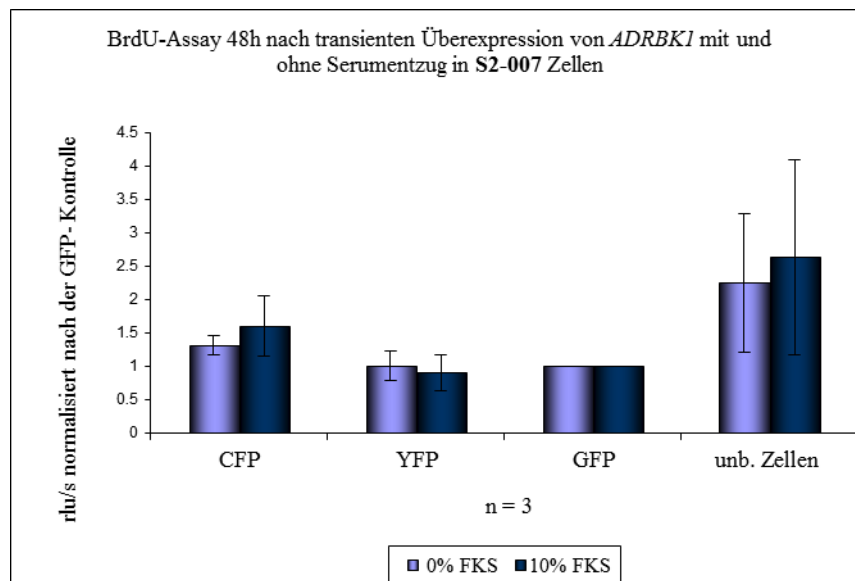
Die Ergebnisse der Überexpression in den Zelllinien ohne endogene *ADRBK1*-Expression sind zusammenfassend für mindestens drei unabhängig durchgeführte Versuchsdurchläufe normalisiert nach GFP in der Abbildung 23 dargestellt. Die Zelllinie S2-007 zeigte einen deutlichen Viabilitätsanstieg von 24 bis 38% sowohl für die CFP- als auch die YFP-transfizierten Ansätze für Serumbehandlung und -entzug. Statistische Signifikanz erreichten allerdings ausschließlich die *ADRBK1*-CFP-Konstrukte. Für die Zelllinien Panc1 zeigten sich nur geringfügige Abweichungen im Vergleich zu GFP-Kontrolle für beide Konditionen. Es ist zu bemerken, dass der Vergleich der GFP-Kontrolle mit unbehandelten Zellen in beiden Zelllinien eine sehr große Spannweite der Zellviabilität von 77 bis über 100% aufweist.





**Abbildung 23: Dokumentation der Zellviabilität in Abhängigkeit von der *ADRBK1*-Überexpression in Panc1 und S2-007 Zellen.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der MTT-Assays nach der 72-stündigen Überexpression des Kandidatengens durchgeführt in 2 verschiedenen Zelllinien mit (hellblau) und ohne (dunkelblau) Serumentzug dar. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch  $n$  angegeben. Die Daten wurden nach dem Wert der GFP-Kontrolle normalisiert und gemittelt. Das linke Diagramm stellt die Ergebnisse für die Zelllinie S2-007 wobei sowohl für serumbehandelte und serumfreie Versuchsbedingungen eine Zunahme der Zellviabilität zu verzeichnen ist. Allerdings führt ausschließlich die *ADRBK1*-CFP-Transfektion zu einem signifikanten Ergebnis. Die Panc1-Zellen zeigen in keinem Ansatz im Vergleich zur GFP-Kontrolle signifikante Änderungen der Zellviabilität. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

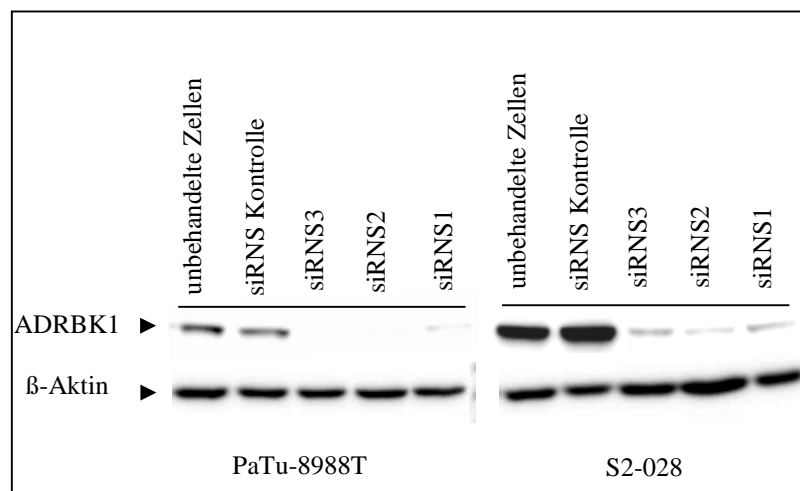
Ausgehend von den Ergebnissen der Viabilitätsmessung wurde eine Untersuchung der Überexpressionswirkung auf die Proliferationsraten in S2-007 Zellen via BrdU-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden transfiziert, 48 Stunden mit und ohne Serumentzug kultiviert und folgend ein BrdU-Assay zur Messung der Proliferation durchgeführt. Die Abbildung 24 stellt zusammenfassend die nach der GFP-Kontrolle normalisierten Ergebnisse der drei unabhängig durchgeführten Versuche, jeweils mit und ohne Serumentzug dar. Die Überexpression des Kandidatengens führte in den S2-007 Zellen zur Zunahme der Proliferationsraten von 30% bei Serumentzug und 60% bei Serumbehandlung in CFP-transfizierten Ansätzen im Vergleich zur GFP-Kontrolle, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Die YFP-transfizierten Ansätze zeigten keine Änderung. Auch hier gilt zu bemerken, dass der gemessene Proliferationsratenunterschied zwischen den GFP-kontrolltransfizierten und unbehandelten Zellen sehr hoch ausfällt, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert.



**Abbildung 24: Dokumentation der Proliferationseffekte nach transienter *ADRBK1*-Überexpression.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der BrdU-Assays nach der 48-stündigen Überexpression des Kandidatengens mit (hellblau) und ohne (dunkelblau) Serumentzug in der S2-007 Zelllinie dar. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch die Variable  $n$  angegeben. Die Daten wurden nach dem Wert der GFP-Kontrolle normalisiert und gemittelt. Es ist ein Anstieg der Proliferation in den CFP-Ansätzen, jedoch nicht in den YFP-transfizierten Zellen im Vergleich zur GFP-Kontrolle verzeichnet.

#### 4.2.4 Keine Detektion von *ADRBK1*-abhängiger Apoptoseinduktion

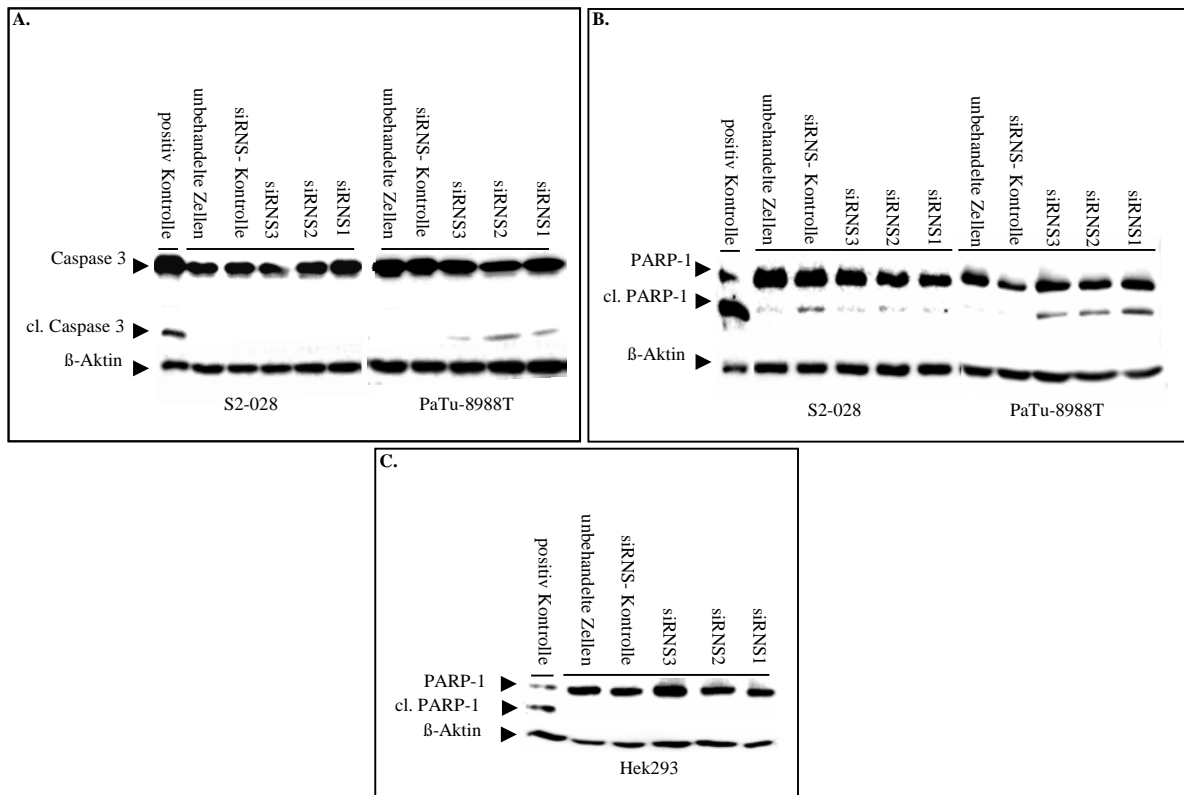
Die Reduktion der Proliferationsraten und insbesondere der Zellviabilität in Abhängigkeit der *ADRBK1*-Repression speziell in transformierten Zelllinien legten die Hypothese nahe, dass *ADRBK1* möglicherweise die Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden beeinflusst. Der Nachweis des programmierten Zelltodes erfolgte mittels der Detektion der PARP-1 und Caspase-3 Spaltprodukte im Western Blot-Verfahren. Neben der Prüfung der transienten *knock down* Effizienz des Kandidaten *ADRBK1* auf dem mRNA-Level wurde ebenfalls die Runterregulation auf der Proteinebene überprüft. Für diese Untersuchung wurden die Zellen entsprechend transfiziert. Nach 72-stündiger Kultivierung erfolgte die Gesamtzelllysaternte, Proteinmessung, Western Blot und immunologischer Nachweis. So wie bereits auf dem mRNA-Level konnte eine deutliche Reduktion der *ADRBK1*-Proteinmenge für alle drei verwendeten siRNS sowohl in S2-028 als auch in PaTu-8988T Zelllinien nachgewiesen werden, vgl. Abbildung 25.



**Abbildung 25: Dokumentation der *ADRBK1* Repressionseffizienz in PaTu-8988T und S2-028 Zellen.** Die Proteinextrakte wurden 72 Stunden nach Transfektion mit den siRNS isoliert. Aufgetragen sind 25µg des Gesamtproteinlysats von PaTu-8988T und S2-028 Zellen. Der Immunoblotnachweis wurde mittels des Anti-*ADRBK1*-Antikörpers durchgeführt. Es ist eine deutliche Reduktion des 80kD großen *ADRBK1*-Proteins in den siRNS behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollen in beiden Zelllinien zu erkennen. Zur Detektion der Ladekontrolle wurde Anti-β-Aktin-Antikörper benutzt. Dieses Ergebnis konnte in weiteren unabhängigen Experimenten erzielt werden.

Nach der Überprüfung der erfolgreichen *ADRBK1*-Repression wurden die Gesamtzelllysate beider Zelllinien hinsichtlich der Apoptosemarker untersucht. Als Positivkontrolle dienten 24 Stunden nach 10-minütiger UV-Lichtbehandlung geernteten PaTu-8988T Zellen. Die exemplarische Abbildung 26 zeigt einen positiven Nachweis für PARP-1 und Caspase-3 sowie ihre Spaltprodukte bei UV-behandelten Kontrollen. Die unbehandelten Zellen weisen keine Anzeichen der Aktivierung

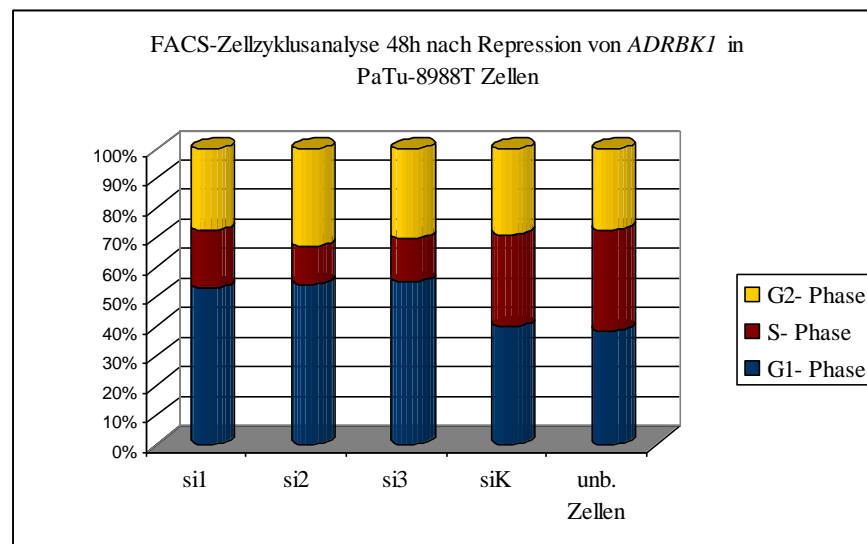
apoptotischer Signalkaskaden auf und dienen als Negativkontrolle. Leichte Banden sind für die PaTu-8988T Zelllinie sowohl für PARP-1- als auch für Caspase-3-Spaltung nach der 72-stündigen Repression des Kandidaten *ADRBK1* für alle drei verwendeten siRNS nachgewiesen. Die doppeltransfizierte Zelllinie S2-028 zeigte keine Spaltung der Caspase-3 und im Vergleich zur siRNS-Kontrolle kein Überschreiten des Grundlevels für PARP-1. Die Überprüfung der Kontrollzelllinie Hek293 ergab keine Veränderung in Abhängigkeit von der *ADRBK1*-Repression. Zusammenfassend wurde nur geringfügige und ausschließlich auf die Zelllinie PaTu-8988T beschränkte Aktivierung der Apoptose detektiert.



**Abbildung 26: Western Blot–Analysen der *ADRBK1* repressionsabhängigen Einleitung der Apoptose in PaTu-8988T, S2-028 und Hek293 Zelllinien.** Die Proteinextrakte wurden 72 Stunden nach Transfektion isoliert. Aufgetragen sind 25µg des Gesamtproteinlysats von PaTu-8988T, S2-028 und Hek293 Zellen. Die Bande bei 35kD kennzeichnet die Caspase-3 und das dazu gehörige Spaltprodukt (Abk. cl. = cleaved) erscheint bei 15-17kD. Der Nachweis von PARP-1 ist bei 116kD und das Spaltprodukt bei 89kD vorzufinden. Als Positivkontrollen verwendete Lysate der UV-Behandelten PaTu-8988T Zellen zeigen deutlich positive Nachweise für beide Apoptosemarker. In der Aufnahme **A.** sind die Caspase-3-Immunoblotanalysen abgebildet. Es zeigt sich für Caspase-3-Spaltprodukte ausschließlich leichte Banden für die Zelllinien PaTu-8988T für alle 3 verwendeten siRNS, jedoch nicht für S2-028 Zellen. Die Aufnahme **B.** belegt einen Nachweis der PARP-1-Spaltung ebenfalls in geringfügigem Maße für PaTu-8988T für alle drei verwendeten siRNS. Für die doppeltransfizierten S2-028 zeigte sich die stärkste Bande bei der siRNS-Kontrolle und somit keine das Grundniveau übersteigende Aktivierung der Apoptose in Abhängigkeit der *ADRBK1*-Repression. Die Aufnahme **C.** belegt einen PARP-1-Apoptosemarkernachweis. Die Kontrollzelllinie Hek293 zeigte keine Spaltung des PARP-1-Enzyms in Abhängigkeit von *ADRBK1*-Expression. Als Ladekontrolle wurde die 42kD große β-Aktin-Bande nachgewiesen. Diese Effekte wurden mindestens 3-mal in weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt.

#### 4.2.5 Durchflusszytometrische Identifikation des proliferativen Phänotyps in Pankreaskarzinomzellen

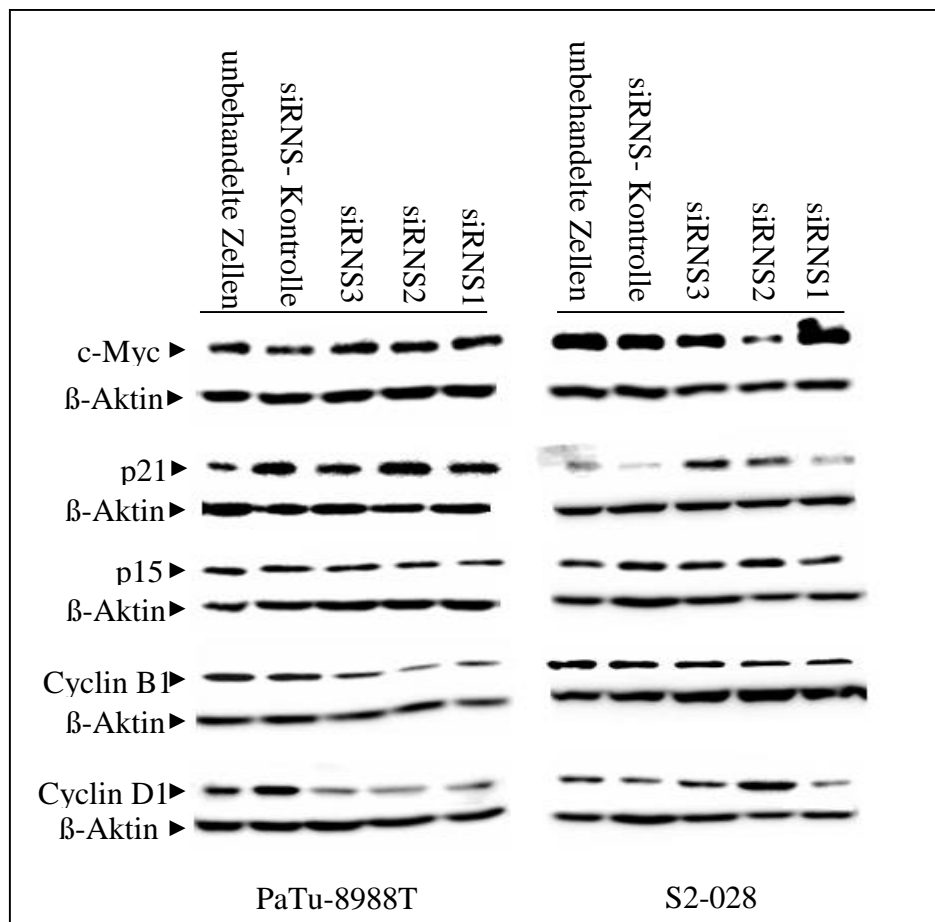
Die Western Blot-Untersuchung der Apoptoseinduktion zeigte keine besonders prägnanten Ergebnisse, die die vorangegangenen antiproliferativen und die Zellviabilität senkenden Effekte nach *ADRBK1*-Repression erklären könnten. Um den genaueren funktionellen wachstumsreduzierenden Ansatz des Gens präziser ermitteln zu können, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PaTu-8988T Zellen 48 Stunden nach der Transfektion aufgearbeitet und mit FxCycle™ Violet Stain angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert mit der DNS und erlaubt somit, den zellulären DNS-Gehalt durchflusszytometrisch zu erfassen. Die anschließende Rohdatenauswertung mit der ModFit LT™ Software ermöglichte die prozentuale Bestimmung der Zellen in den drei Zellzyklusphasen G1, S und G2. Die Abbildung 27 dokumentiert die Resultate der FACS-Zellzyklusanalysen in PaTu-8988T Zellen. Es ist ein deutlicher Rückgang der S-Phase für alle drei siRNS insbesondere aber für siRNS2 und 3 im Vergleich zu den Kontrollen zu erkennen. Des Weiteren zeichnet sich ein deutlicher G1-Phasen-Arrest ab. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits im BrdU-Assay gemessene Veränderung mit dem stärksten Proliferationsrückgang für siRNS2 und 3.



**Abbildung 27: Balkendiagramm der FACS-Zellzyklusanalyse von PaTu-8988T Zellen.** Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis der Durchflusszytometrieuntersuchung nach der 48-stündigen *ADRBK1*-Repression in PaTu-8988T Zellen. Abgebildet sind prozentualanteilig die G1-, die S- und die G2-Phase. Es ist keine Veränderung beim Vergleich der beiden Kontrollen festzustellen. Die transfizierten Ansätze zeigen eine deutliche Reduktion der Zellzahl in der S-Phase. Zugleich ist ein G1-Phasenarrest zu sehen. Diese Ergebnisse konnten in 3 unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

Basierend auf den Ergebnissen der Proliferations-, Zellviabilitäts- und Durchflusszytometrie-messung, die *ADRBK1* eine in den Zellzyklus involvierende Rolle bescheinigen, wurden weitere

Immunoblots zur Ermittlung des vermittelnden Mechanismus durchgeführt. Analysiert wurden zunächst speziell am Zellzyklus beteiligte Proteine wie die cyclinabhängige Kinasen Cyclin D1 und -B1 sowie den Tumorsuppressoren p15INK4B, CDK-Inhibitor-1 (p21) und das Protoonkogen c-Myc. Die Abbildung 28 stellt exemplarisch die Immunoblotergebnisse für die Zelllinien S2-028 sowie PaTu-8988T dar. Die Antikörperdetektion von c-Myc und p15 zeigten keine Veränderung der Bandenintensität in Abhängigkeit von der *ADRBK1*-Expression. Die p21-Banden zeigten eine Verstärkung für die siRNS2 und 3 Ansätze in der doppeltransfizierten Zelllinie S2-028, jedoch konnte dieses Ergebnis nicht reproduziert und auch nicht für die Zelllinien PaTu-8988T nachgewiesen werden. Lediglich Cyclin D1 und B1 zeigten einen nachweisbaren Rückgang in Zusammenhang mit der *ADRBK1*-Repression in PaTu-8988T Zellen, jedoch nicht in doppeltransfizierten S2-028 Zellen. Auch dieses Ergebnis konnte nicht eindeutig repliziert werden.



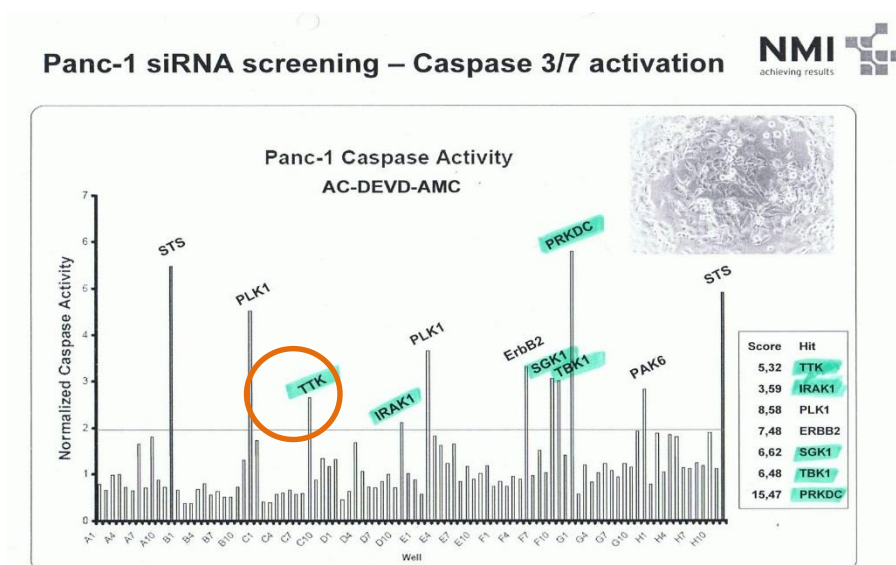
**Abbildung 28: Immunoblotanalysen der *ADRBK1*-repressionsabhängigen Effekte auf die Zellzyklus-komponenten in den Zelllinien S2-028 und PaTu-8988T.** Die Proteinextrakte wurden 72 Stunden nach Transfektion mit den siRNS isoliert. Aufgetragen sind 25µg des Gesamtproteinlysats von PaTu-8988T und S2-028 Zellen. Es konnte kein eindeutiger Effekt in Abhängigkeit der *ADRBK1*-Repression für c-Myc, p21 oder p15 detektiert werden. Ausschließlich für Cyclin B1 und D1 konnte eine Abnahme der Banden für alle 3

verwendeten siRNS für die Zelllinie PaTu-8998T, jedoch nicht für S2-028, nachgewiesen werden. Die Wiederholung der Immunoblotanalyse mit weiteren Lysaten zeigte kein eindeutig reproduzierbares Ergebnis. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin angefärbt.

### 4.3 TTK-Einzelgencharakterisierung

#### 4.3.1 Kinom-weites Screening identifiziert TTK als neuen potentiellen Kandidaten

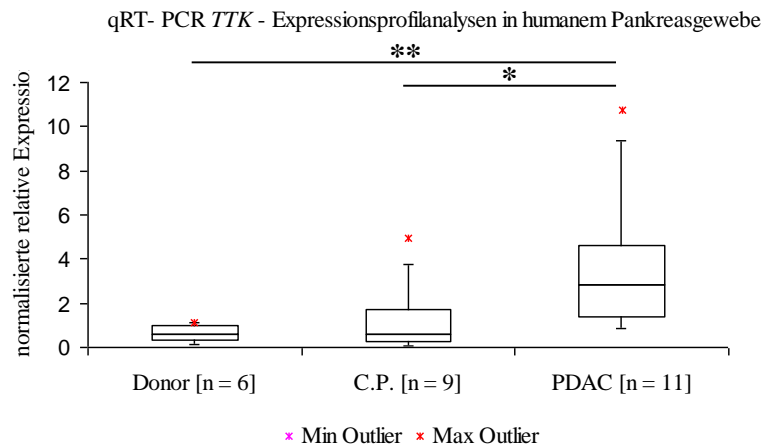
Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Kandidatengen-screensings wurde zur Identifizierung weiterer Kandidaten im Rahmen eines Kooperationsprojektes vom *natural and medical sciences* Institut (NMI) an der Tübinger Universität ein das gesamte Kinom umfassendes Screening durchgeführt. Unter Verwendung einer *Ambion® Silencer® Select kino-wide* siRNS Bibliothek wurden in vollautomatisiertem Format sowohl in transformierten Panc1 Zellen als auch in non-transformierten Hek293 Zellen alle Kinasen des gesamten Kinoms transient reprimiert und anschließend ein AC-DEVD-AMC Caspaseassay durchgeführt. Der Vergleich der Caspasespaltung zwischen der transformierten und nicht-transformierten Zelllinie nach der Herunterregulation der jeweiligen Kinase erlaubte die Identifikation für das Tumorüberleben spezifischer Kinasen, dargestellt in der Abbildung 29. Eine dieser Kinasen, die zur weiteren Einzelgenanalyse ausgewählt wurde, ist die dualspezifische Tyrosin/Serin-Threonin Kinase TTK.



**Abbildung 29: Ergebnisse des Kinom-wide screenings mittels AC-DEVD-AMC Caspaseassays.** Das Balkendiagramm stellt die normalisierten Werte der Caspase3/7 Aktivierung nach dem spezifischen *knock down* durch den siRNS-Pool in der Panc1 Zelllinie dar. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Kinasespaltung nach transienter Repression in Hek293 Zellen ermöglicht die Auswahl viel versprechender Kinasen, die für das tumorspezifische Überleben von Bedeutung sein könnten. Die grün markierten Gene *TTK*, *IRAK1*, *SGK1*, *TBK1*, *PRKDC* erfüllten die Voraussetzungen zur Selektion als Kandidaten für eine Einzelgencharakterisierung. STS = Staurosporin (Positivkontrolle). Knockdown von *Polo-like Kinase*, *PLK1*, diente ebenfalls als Positivkontrolle.

### 4.3.2 Spezifische *TTK*-Expression in humanem Pankreasgewebe

Zunächst erfolgte die Expressionsprofilanalyse von *TTK* auf der mRNA-Ebene in humanem Pankreasgewebe sowie Zelllinien. Entsprechend wurde die gesamtzelluläre RNS aus humanem Gewebe und Zelllinien extrahiert und in cDNA transkribiert. Die Abbildung 30 zeigt die *TTK*-Expression im gesunden, an chronischer Pankreatitis erkranktem und Tumorgewebe die anhand der quantitativen RT-PCR-Methode bestimmt wurde. Es wurde eine signifikant erhöhte *TTK*-Expression im Tumorgewebe sowohl gegenüber der chronischen Pankreatitis als auch dem gesundem Material festgestellt und somit erwies sich der Kandidat als geeignet zur weiteren Einzelgenanalyse.



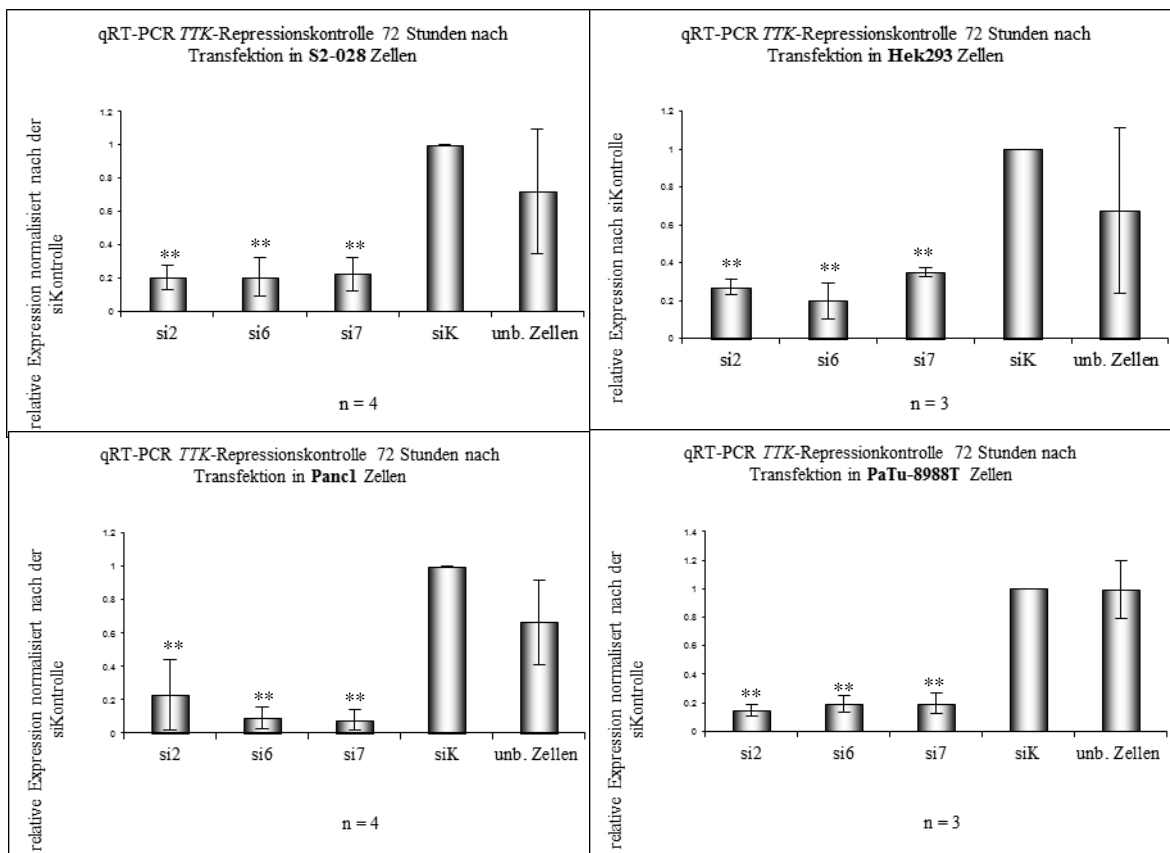
**Abbildung 30: Via quantitative RT-PCR ermittelte *TTK*-Expression in humanem Gewebe.** Anhand der qRT-PCR wurden Daten für Proben der chronischen Pankreatitis (CP), Pankreaskarzinom (PDAC) und gesundem Gewebe (Donor) generiert. Die Variable  $n$  gibt die Menge verwendeter Proben an. Die gemessenen Werte für die *TTK*-Expression wurden mit Hilfe des Haushaltgens *RPLP0* normalisiert. Die statistische Auswertung ergab eine signifikante Überexpression in den Tumorproben im Vergleich zu den Gruppen der chronischen Pankreatitis und gesundem Material. Mann-Whitney U-Statistiktest: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$

Zur Auswahl geeigneter Zelllinien erfolgte die Bestimmung des *TTK*-Expressionsniveaus anhand der qRT-PCR-Methode. Für folgende funktionelle Assays wurden die transformierten Zelllinien Panc1, S2-028, PaTu-8988T sowie non-transformierte Kontrollzellen Hek293 ausgewählt. Diese Daten sind hier nicht aufgeführt.

### 4.3.3 *TTK*-Repressionskontrolle

Um die Funktion des Kandidatengens *TTK* in Pankreaskarzinomzellen zu untersuchen, sollte die *TTK*-Expression sowohl in transformierten als auch nicht-transformierten Zelllinien inhibiert werden. Zunächst sollte ein signifikanter *knock down* des Gens in den Zelllinien etabliert und nachgewiesen werden. Für diese Versuchsansätze wurden drei siRNAs unterschiedlicher Sequenzen und als Kontrolle die non-sense siRNAs transfiziert. Nach 72 Stunden erfolgte die Gesamt-RNS-Ernte, Transkribierung in cDNA und die Messung des Expressionslevels anhand der quantitativen

RT-PCR. Abbildung 31 belegt die *TTK*-Repressionseffizienzen normalisiert und gemittelt in der Kontrollzelllinie Hek293 und Tumorzelllinien Panc1, S2-028, PaTu-8988T. Alle drei verwendeten siRNS ermöglichen in allen zu untersuchenden Zelllinien einen hochsignifikanten Rückgang der *TTK*-Expression. Die stärkste Repression von über 90% zeigte sich für die siRNS6- sowie -7-Behandlung in den Panc1 und die schlechteste für die siRNS7-Ansätze von 65% in den Hek293 Zellen. Der Repressionsdurchschnitt lag bei  $> 80\%$ . Besonders auffällig ist das hochvariable mRNA-Grundniveau, erkennbar an den Fehlerbalken, in den unbehandelten Zellen, was sich zelllinienübergreifend abzeichnet.



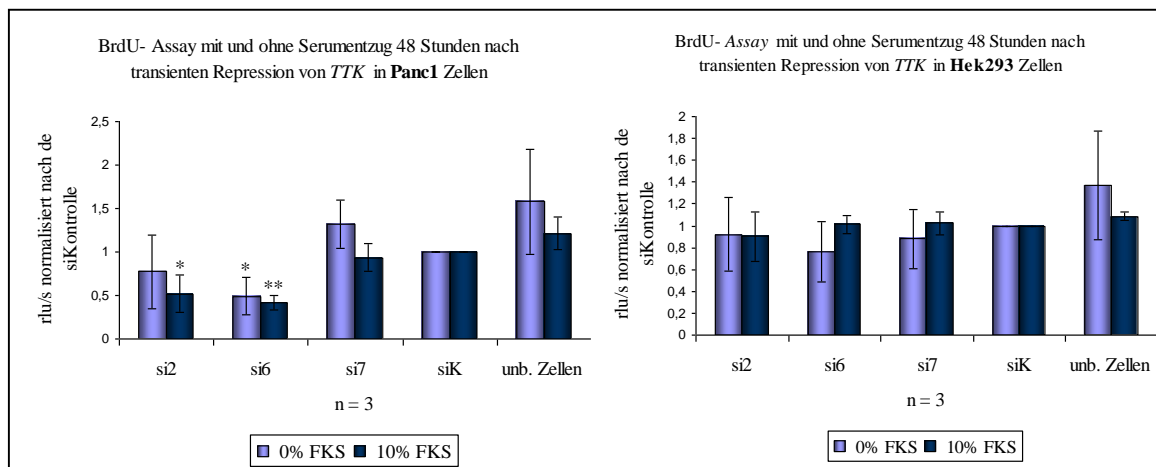
**Abbildung 31: *TTK* knock down in S2-028, PaTu-8988T, Panc1 und Hek293 Zelllinien.** Die Balkendiagramme zeigen die relative Expression des *TTK*-Gens 72 Stunden nach der Transfektion mit drei entsprechenden siRNS sowie Kontroll-siRNS (Abk. siK) in 4 verschiedenen Zelllinien. Jedes Diagramm umfasst mindestens 3 Versuche. Zur statistischen Auswertung wurden alle Werte auf die siKontrolle normalisiert. So ergab sich eine hohe Signifikanz für alle verwendeten siRNS in Vergleich zur siKontrolle in den transformierten Zellen und nicht-transformierten Zellen. Das Kürzel *unb.* steht für „unbehandelt“. Die Variable *n* gibt die Anzahl der unabhängigen Versuche an. \*\* =  $p < 0,01$ ;



#### 4.3.4 Einfluss von TTK auf die Zellproliferation

Zunächst wurden BrdU-Assays nach der transienten Repression des Gens in S2-028, PaTu-8988T, Panc1 und Hek293 Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden transfiziert, 48 Stunden mit und ohne Serumentzug kultiviert und folgend die Messung der Proliferation durchgeführt. Abbildung 32 stellt zusammenfassend die nach der siKontrolle normalisierten Ergebnisse der mindestens drei Durchläufe pro Zelllinie, mit und ohne Serumentzug dar. Die *TTK*-Runterregulation zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten der nicht-transformierten Zelllinie Hek293 in An- oder Abwesenheit von Serum. Ein geringer, jedoch nicht signifikanter Rückgang von 24% ergab sich im serumfreien siRNS6-behandelten Ansatz.

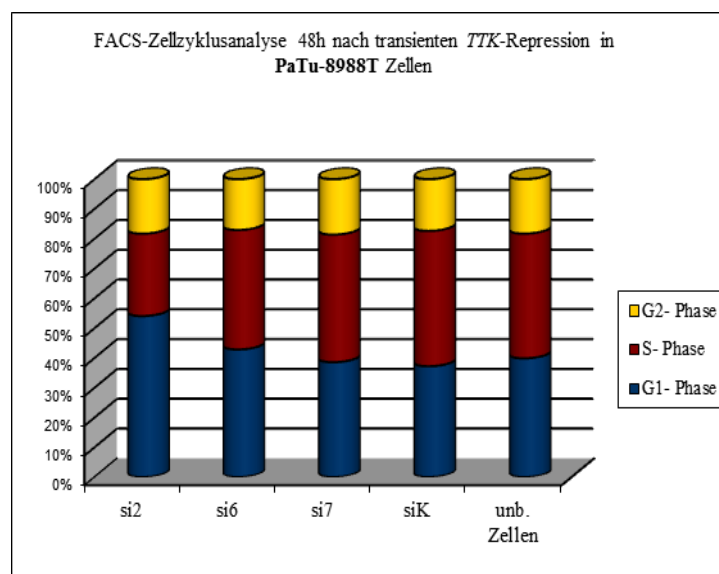
Eine signifikante Abnahme der Proliferation war in den Panc1 Zellen in Abhängigkeit von der *TTK*-Repression in den siRNS6-transfizierten Zellen unabhängig vom Serumentzug festzustellen. siRNS7-Behandelte Proben zeigten keinen Einfluss auf die Proliferationsraten unabhängig von der Kondition. Bei Serumzugabe konnten weitere signifikante Ergebnisse für die siRNS2 beobachtet werden. Weitere Untersuchungen des *TTK*-Einflusses auf die Proliferationseigenschaften wurden auch in Zelllinien S2-028 und PaTu-8988T durchgeführt. Beide Zelllinien zeigen einen signifikanten Rückgang der Proliferation in Abhängigkeit der transienten *TTK*-Repression für alle drei verwendeten siRNS. Diese Daten sind nicht hinterlegt.



**Abbildung 32: Präsentation der Proliferationseffekte nach transienter *TTK*-Repression.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der BrdU-Assays nach 48-stündiger Runterregulation des Kandidatengens durchgeführt in 2 verschiedenen Zelllinien mit (hellblau) und ohne (dunkelblau) Serumentzug dar. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch  $n$  angegeben. Die Daten wurden nach dem Wert der siKontrolle normalisiert und gemittelt. Das rechte Diagramm stellt die Ergebnisse für Kontrollzelllinie Hek293 dar. Ausschließlich für den serumfreien Ansatz der siRNS6 ist eine geringe jedoch nicht signifikante Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu siKontrollgruppe festzustellen. Die transformierte Zelllinie in der linken Abbildung verzeichnen signifikante Rückgänge der Proliferationsraten für Serumbehandlung von 49% für die siRNS1 und 59% für die siRNS2, jedoch stellt die siRNS3 eine Ausnahmen ohne Veränderung dar. Der Serumentzug führt bei der siRNS3 zu leicht erhöhtem Wachstum. Die serumfreien Ansätze der siRNS1 und 2 zeigen ebenfalls eine Reduktion insbesondere die siRNS2 mit 52% ein

signifikantes Ergebnis. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

Zur weiteren Charakterisierung der im BrdU-Assay gemessenen Abnahme der Zellteilungsrate in transformierten Zelllinien in Abhängigkeit von der transienten *TTK*-Runterregulation folgte eine durchflusszytometrische Untersuchung des Zellzyklus. Die Zelllinie PaTu-8988T wurde 48 Stunden nach der Transfektion aufgearbeitet, mit FxCycle™ Violet Stain angefärbt und der DNS-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch erfasst. Die Rohdatenauswertung mit der ModFit LT™ Software bestimmte die prozentualen Anteile der G1-, S- und G2-Phase der Zellpopulation. In der Abbildung 33 ist exemplarisch ein Resultat der FACS-Zellzyklusanalysen der PaTu-8988T Zellen dokumentiert. Es ist keine Änderung der Zellzyklusphasenverteilung der siRNS6 und 7 transfizierten Ansätze im Vergleich zu den Kontrollen messbar. Lediglich die siRNS2-Transfektion bewirkt eine Zunahme der Zellen in der G1-Phase, folglich einen G1-Phasen Arrest. Diese Ergebnisse lieferten keinen Erklärungsansatz für den im BrdU-Assay gemessenen signifikanten Proliferationsrückgang für alle drei verwendeten siRNS.

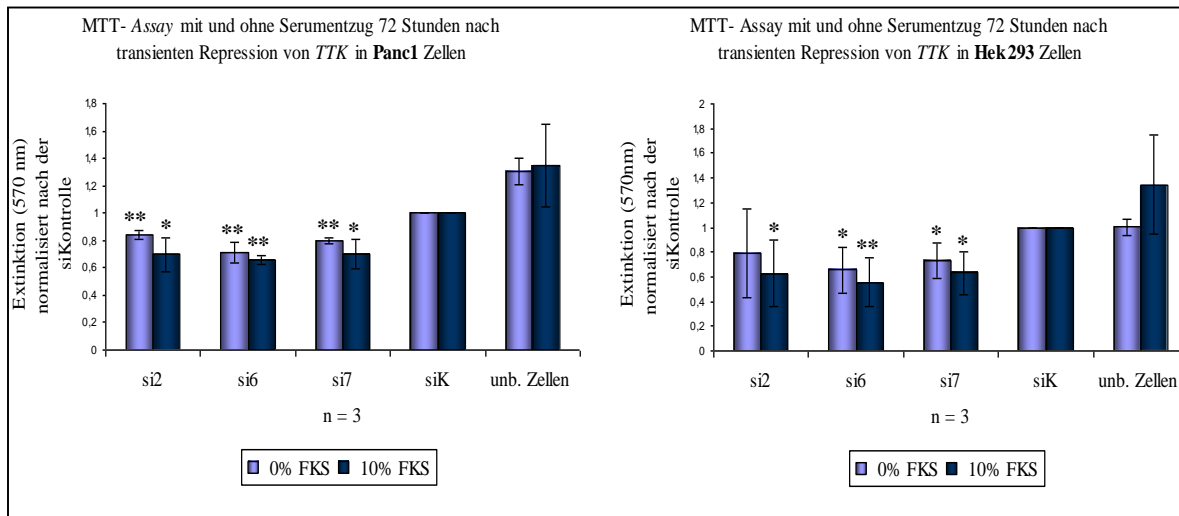


**Abbildung 33: Balkendiagramm der FACS-Zellzyklusanalyse in PaTu-8988T Zellen.** Der Graph stellt einen repräsentativen Versuch der Durchflusszytometrieuntersuchung nach 48-stündigen *TTK*-Repression in PaTu-8988T Zellen dar. Abgebildet sind Prozentanteile der G1-, S- und die G2-Phase. Es ist keine Veränderung beim Vergleich der beiden Kontrollen festzustellen. Die mit siRNS6 und -7 transfizierten Ansätze zeigten keine Veränderung der Phasen in Vergleich zur Kontrolle. Zugleich ist ein G1-Phasenarrest in dem siRNS2-Ansatz zu beobachten. Diese Ergebnisse konnten in 3 unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

#### 4.3.5 Zellviabilität in Abhängigkeit des *TTK*-Expressionsniveaus

Die Zellviabilität wurde in Panc1 und Hek293 Zellen 72 Stunden nach Transfektion mit und ohne Serumkultivierung im MTT-Assay gemessen. Die Abbildung 34 stellt zusammenfassend die

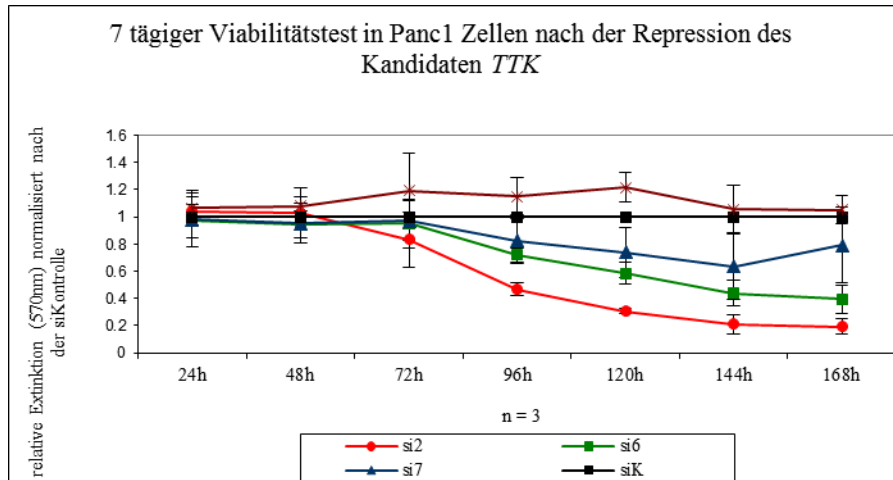
Ergebnisse der mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchsdurchläufe nach der Transfektion mit siRNS2, -6, -7 sowie *non-sense* Kontrolle, aber auch komplett unbehandelter Zellen normalisiert auf die siRNS-Kontrolle dar. Wie in den BrdU-Assays zeigen die Hek293 Zellen unabhängig der Kondition, mit der Ausnahme der siRNS2-behandelten Ansätze, eine signifikante Veränderung der Zellviabilität. Ein Rückgang, insbesondere serumkultivierter Zellen, von mindesten 37 bis 44% in Abhängigkeit von der transienten *TTK*-Repression wurde gemessen. Eine wesentlich höhere Abnahme vitaler Zellen wurde in der transformierten Panc1 Zelllinie in Abhängigkeit transienter *TTK*-Runterregulation verzeichnet. Ebenso bewirkt die Serumbehandlung einen stärkeren Effekt mit einem Rückgang der Zellviabilität von 30-34%. Weitere Untersuchungen des *TTK*-Einflusses auf die Zellviabilität wurden auch in den Tumorzelllinien S2-028 und PaTu-8988T durchgeführt. Beide Zelllinien zeigen einen signifikanten Rückgang vitaler Zellen in Abhängigkeit vom *TTK*-Expressionslevel, diese Daten sind nicht gezeigt.



**Abbildung 34: Darstellung der Zellviabilität in Abhängigkeit von der transienten *TTK*-Repression.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der MTT-Assays nach 72-stündigen Runterregulation des Kandidatengens durchgeführt in 2 verschiedenen Zelllinien mit (hellblau) und ohne (dunkelblau) Serumentzug dar. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch „n“ angegeben. Die Daten wurden auf den Wert der siKontrolle normalisiert und gemittelt. Das rechte Diagramm stellt die Ergebnisse der Kontrollzelllinie Hek293 dar. In allen Ansätzen mit Ausnahme der siRNS2 in serumfreiem Medium zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellviabilität. Die transformierten Zellen Panc1 zeigten im Vergleich zu den Hek293 signifikantere Zellviabilitätsrückgänge in Abhängigkeit von der *TTK*-Repression für alle siRNS und Konditionen. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

Zusätzlich zu der nach 72-stündiger *TTK*-Repression erhobenen Messungen der Zellviabilität wurde das Überleben der transfizierten PaTu-8988T Zellen und Kontrollen in Abständen von 24 Stunden sieben Tage anhand eines MTT-Assays beobachtet. Abbildung 35 zeigt zusammenfassend, die auf die siRNS-Kontrolle normalisierte Werte in Abhängigkeit der Zeit. Die Zellen wurden transfiziert und folgend in 24-stündigen Abständen sieben Tage lang eine Messung der Zellviabilität

durchgeführt. Den stärksten Rückgang von über 80% zeigen mit stetig abnehmender Kurve die siRNS2-transfizierten Ansätze. Die siRNS6-behandelten Zellen wiesen ebenfalls eine kontinuierliche Abnahme der Vitalität bis zu >60% auf. Die siRNS7-Gruppe zeigte die am schwächsten abfallende Kurve, die ihren Tiefstwert bei 144h erreichte.

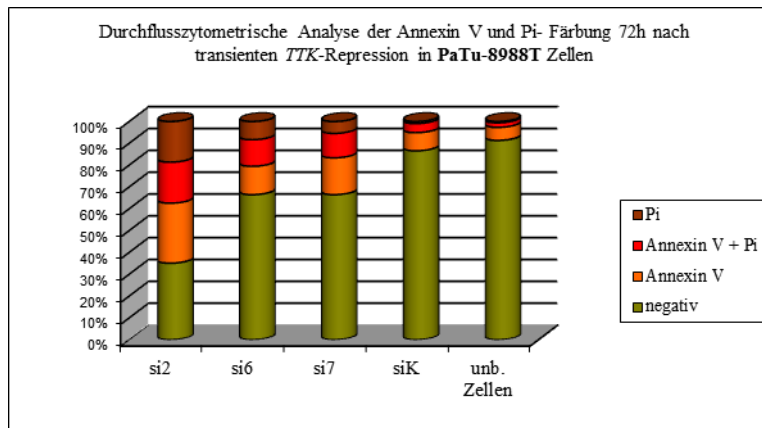


**Abbildung 35: 7-tägiger Viabilitätstests nach TTK-Repression in Panc1 Zellen.** Für diese Untersuchung wurden Panc1 Zellen ausgesät, transfiziert und folgend in 24-stündigen Abständen jeweils ein MTT-Assay durchgeführt. Das Liniendiagramm zeigt für jeden Transfektionsansatz und die Kontrollen jeweils 7 Messpunkte normalisiert nach der siKontrolle. Die Transfektion mit siRNS2 und -6 bedingte eine stetige Abnahme der vitalen Zellpopulation. Die siRNS7-behandelten Ansätze zeigen den schwächsten Effekt, der nach 144 Stunden bereits zur Zunahme der vitalen Zellen führt. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch die Variable  $n$  angegeben.

#### 4.3.6 TTK-knockdown-abhängige Apoptoseinduktion in Tumorzelllinien

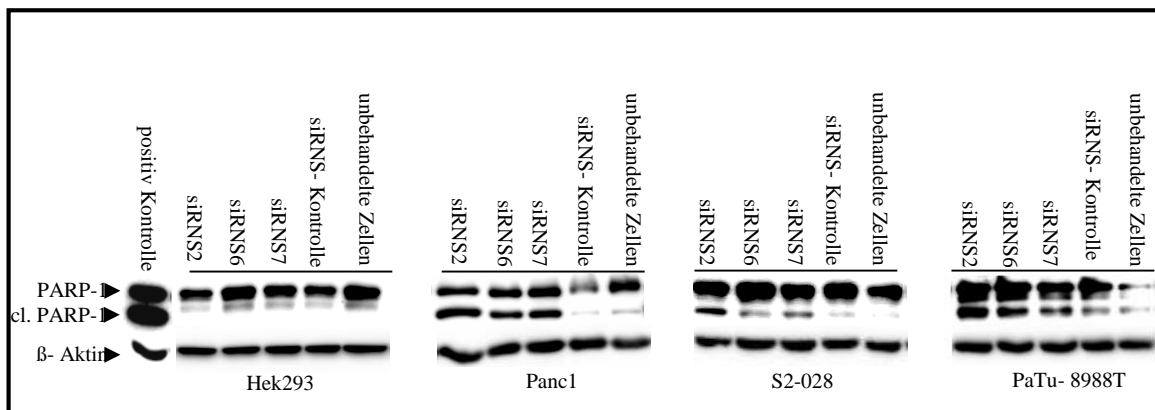
Zur Analyse potenzieller Effekte der TTK-Repression auf die Apoptoseraten der Zellen wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PaTu-8988T Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit Annexin V und/oder mit Propidiumiodid (PI)-Lösung angefärbt und anschließend am Durchflusszytometer analysiert. Das Annexin V erlaubt das Anfärben von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche als Zeichen der Induktion des programmierten Zelltodes. Nicht intakte Zelloberflächen nekrotischer Zellen ermöglichen den Durchlass des Farbstoffes Propidiumiodid, der an die DNS bindet. Abbildung 36 stellt exemplarisch die Durchflusszytometrieergebnisse der Annexin V- und Propidiumiodidfärbung nach 72-stündiger TTK-Repression dar. Das Säulendiagramm zeigt die relativen Anteile nicht gefärbter bzw. negativer Annexin V und Propidiumiodid und sowohl Annexin als auch Propidiumiodid gefärbter Subpopulationen der jeweiligen Ansätze. Bei den Kontrollen bildeten die ungefärbten bzw. als negativ bezeichnete Gruppe (=vitale Zellen) mit einem Prozentsatz von 87-91% die größte Fraktion. Die siRNS6- und -7-transfizierten Ansätze zeigten eine Reduktion vitaler Zellen auf 66%. Der stärkste Effekt wurde mit einem Rückgang auf 35% in dem siRNS2-Ansatz beobachtet. Die Gruppe

der Annexin V gefärbter Zellen stieg im Vergleich zur siKontrolle von 8 auf 13%, im siRNS6-behandelten Ansatz sogar bis auf 27,5 %. Die Annexin V und zusätzlich PI-gefärbte Zellpopulation zeigte einen mindestens dreifachen Anstieg von 4% in der siKontrolle und auf 12% in den siRNS6- und -7-behandelten Ansätzen. Die kleinste Subpopulation der siKontrolle bilden mit <1% die PI-gefärbten Zellen, die ebenfalls einen *TTK*-repressionsabhängigen Anstieg auf mindestens 5,4% und höchstens 18,6% zeigten.



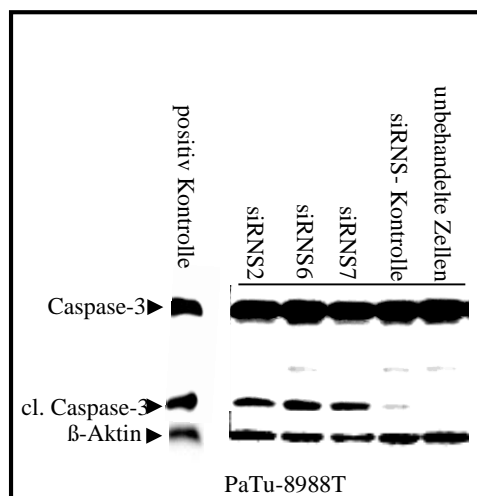
**Abbildung 36: Durchflusszytometrieanalyse der Annexin V- und/ oder PI- Färbung in PaTu-8988T Zellen.** Das Balkendiagramm stellt einen exemplarischen Versuch der Durchflusszytometrieuntersuchung nach 72-stündigen *TTK*-Repression in PaTu-8988T Zellen dar. Abgebildet sind prozentuale Anteile der negativen, PI-, Annexin V- und Annexin V / PI-doppeltgefärbten Subpopulationen. Es zeigt sich eine *TTK*-repressionsabhängige Reduktion der negativen Subpopulation (vitale Zellen). Gleichzeitig erfolgt eine Erhöhung der Annexin V und/oder Propidiumiodid gefärbten Zellen in den siRNS2, 6 und 7-behandelten Ansätzen. Diese Ergebnisse konnten in 3 unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

Zusätzlich zur detaillierten durchflusszytometrischen Untersuchung von PaTu-8988T Zellen wurden nicht-transformierte Hek293-Zellen sowie die transformierten Zelllinien Panc1, S2-028 und PaTu-8988T im Western Blot auf die Apoptose-Induktion hin untersucht. Als Positivkontrolle dienten 24 Stunden nach 10-minütiger UV- Lichtbehandlung geerntete PaTu-8988T Zellen. Die Abbildungen 37 und 38 dokumentieren die Immunoblotnachweise für PARP-1 und Caspase-3 sowie ihrer Spaltprodukte. Die Kontrollzelllinie Hek293 zeigt im Vergleich zu den Kontrollen keine über das Grundniveau steigende PARP-1-Spaltung. Wie bereits die Durchflusszytometrieuntersuchung aufzeigte, belegt die Überprüfung der transformierten Zellen einen eindeutigen Anstieg der PARP-1 Spaltung für alle drei siRNS und die stärksten Zunahme speziell für die siRNS2.



**Abbildung 37: Western Blot-Analysen der Apoptose-Induktion nach *TTK*-knock down.** Die PARP-1 Bande ist bei 116kD und das Spaltprodukt bei 89kD lokalisiert. Als Positivkontrolle verwendete Lysate der UV-Behandelten PaTu-8988T Zellen zeigen deutlich positive Nachweise für den Apoptosemarker. Aufgetragen wurden 10 µg Gesamtzelllysate für alle 4 Zelllinien. Die Nachweise der PARP-1 Spaltung wurden insbesondere für Panc1, S2-028 und PaTu-8988T für alle drei verwendeten siRNS nachgewiesen. Die Kontrollzelllinie Hek293 zeigte keine Spaltung des PARP-1-Enzyms im Vergleich zur siKontrolle in Abhängigkeit von *TTK*-Expression. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (42 kD).

Für die Zelllinie PaTu-8988T konnte zusätzlich ein Western Blot-Nachweis der Caspase-3-Spaltung erbracht werden.

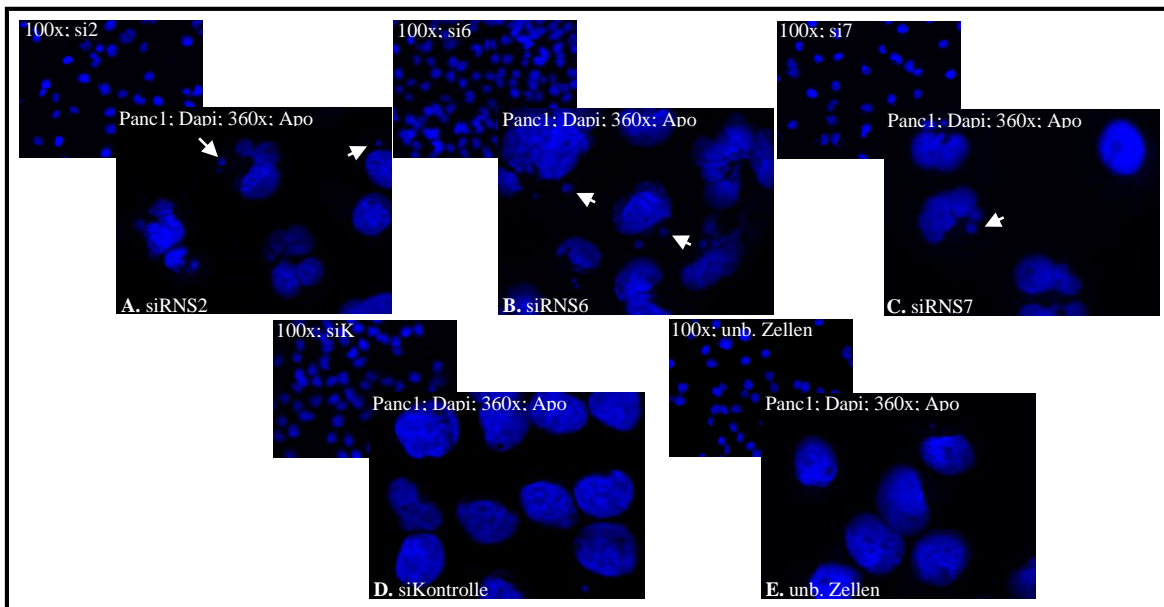


**Abbildung 38: Immunoblotnachweis der Caspase-3-Spaltung nach *TTK*-knock down.** Die Caspase-3-Banden erscheint bei 35kD und das dazu gehörige Spaltprodukt (Abk. cl. = cleaved) bei 15-17kD. Die Proteinextrakte wurden 72 Stunden nach der Transfektion der PaTu-8988T Zellen isoliert. Aufgetragen sind 10µg des Gesamtproteinlysats. Als Positivkontrolle verwendete Lysate der UV-Behandelten PaTu-8988T Zellen zeigen deutlich positive Nachweise dieses Apoptosemarkers. Gleichzeitig ist eine deutliche Spaltung der Caspase-3 im Vergleich zur siKontrolle in Abhängigkeit von der *TTK*-Repression zu erkennen. Als Ladekontrolle diente β-Aktin (42 kD). Diese Effekte wurden mindestens 3-mal in weiteren unabhängigen Versuchen bestätigt.

#### 4.3.7 *TTK* beeinflusst die genomische Stabilität der Tumorzelllinien

Einige Literaturhinweise belegen, wie bereits in der Einleitung erläutert, eine essentielle *TTK*-Rolle während der Überwachung der Zentrosomenduplikation und des Mikrotubuli-organisierenden

Zentrums. Es lag daher nahe anzunehmen, dass die Aktivierung des programmierten Zelltodes auf eine durch die *TTK*-Repression ausgelöste erhöhte genomische Instabilität zurück zu führen sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurden die Panc1 und PaTu-8988T Zellen mit siRNS transfiziert, 72 Stunden kultiviert und anschließend fixiert. Die Ergebnisse der DAPI-Färbung der zellulären DNS und darauf folgende Auswertung im Mikroskop sind in der Abbildung 39 zusammengetragen. Die siKontrolle und unbehandelte Zellen lassen runde bis ovale intakte Zellkerne erkennen. Die siRNS2, -6, -7, behandelten Proben zeigen drastischen Strukturverlust, Fragmentierung der Kerne sowie eine ausgeprägte Bildung sogenannter Mikronuklei. Die Ergebnisse für die Zelllinie PaTu-8988T dokumentieren den gleichen Effekt, jedoch mit etwas geringerem Kontrast zwischen den Kontrollen und den *TTK*-repremierten Ansätzen, was auf die bereits im Grundzustand unregelmäßigere Morphologie der Zellkerne dieser Zelllinie zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

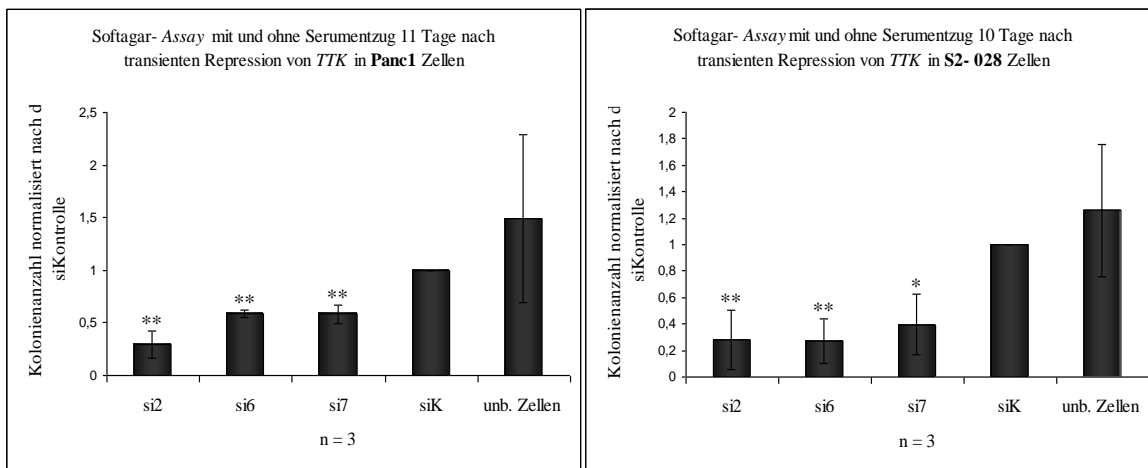


**Abbildung 39: Darstellung des *TTK*-Repressionseffektes auf die genomische Stabilität.** Die Bilder A. bis E. zeigen 360-fach und 100-fach vergrößerte DAPI-Kanalaufnahmen (blau) der Panc1 Zellen 72h nach der Transfektion mit der jeweiligen siRNS. Die unbehandelten Zellen in der Abbildung E. und die mit non-sense siRNS behandelte Gruppe in der Darstellung D. zeigen **große, runde, wohlgeformte Zellkerne der Kontrollgruppen.** Im Vergleich zu diesen Kontrollen zeigen die *TTK*-runterregulierten Ansätze in den Aufnahmen A. bis C. für alle drei siRNS stark verformte Kerne und eine große Menge Micronuclei, gekennzeichnet durch die weißen Pfeile.

#### 4.3.6 *TTK*-Einfluss auf das substratunabhängige Wachstum der Tumorzelllinien

Die Analyse des substratunabhängigen Wachstums wurde anhand der Koloniebildung im sogenannten *Soft-Agar-Assay* durchgeführt. Anschließend an die *TTK*-Repression wurden die

Zelllinien S2-208 und Panc1 in 0,4-prozentigem Soft-Agar-Medium-Mix 10-11 Tage ohne die Möglichkeit, an die feste Oberflächen anlagern zu können, kultiviert. Folgend wurden die gebildeten Kolonien mikroskopisch ausgezählt. Abb. 40 dokumentiert zusammenfassend die normalisierten, gemittelten Ergebnisse der drei unabhängigen Versuchsdurchläufe in den beiden transformierten Zelllinien. Es ist eine deutliche und statistisch signifikante Inhibition der Kolonienbildung in *TTK*-reprimierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen. Den stärksten Effekt zeigte siRNS2 in Panc1 Zellen mit einer Reduktion von 70% sowie siRNS2 und -6- in der S2-028 Zelllinie mit einer Abnahme von 71 bis 73%.

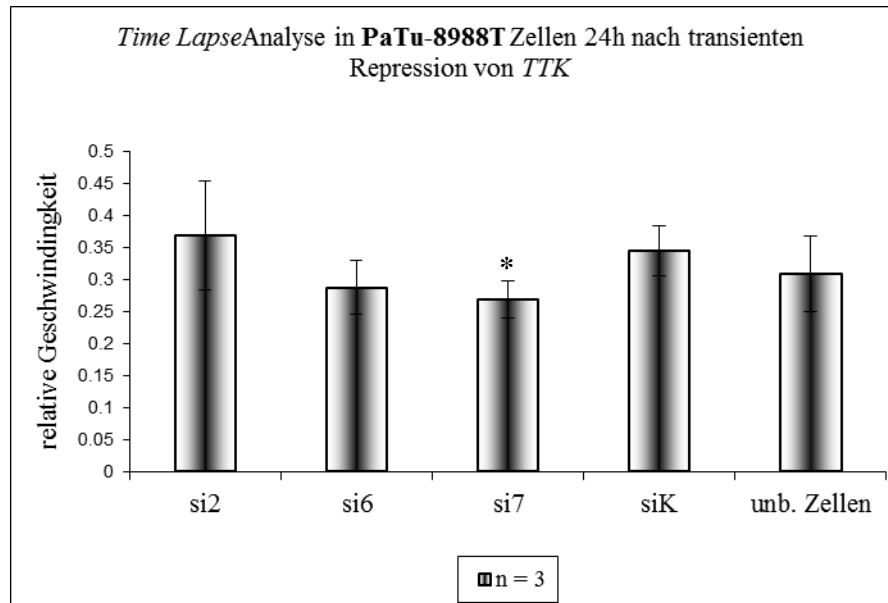


**Abbildung 40: Graphische Darstellung des substratunabhängigen Wachstums nach der *TTK*-Runterregulation in S2-028 und Panc1 Zelllinien.** Die Balkendiagramme stellen eine Zusammenfassung der Softagar-Assays 7 Tage nach der Transfektion mit 3 verschiedenen siRNS in Panc1 (links) und S2-028 (rechts) Zellen dar. Es konnte für beide Zelllinien eine starke, statistisch signifikante Reduktion der Kolonienzahl in Abhängigkeit des *TTK*-Expressionslevels nachgewiesen werden. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch die Variable  $n$  angegeben. \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ ;

#### 4.3.7 Zellmotilitätsmessung nach *TTK*-knock down

Zur Prüfung der ungerichteten Zellbewegung wurden 24 Stunden nach der Transfektion 24.000 Zellen pro Vertiefung auf kollagenisierte Platten ausgesät und 20 Stunden mit Hilfe des Cell Observer® Mikroskopsystems automatisch im Zeitrafferverfahren aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *Time Lapse Analyzer open source software* und ist in Abb. 41 zusammenfassend dokumentiert. Im Vergleich zur siKontrolle zeigen ausschließlich siRNS6-transfizierte Zellen einen 16%- und siRNS7-transfizierte Zellen einen 21-prozentigen Rückgang der durchschnittlichen Geschwindigkeit in der ungerichteten Migration. Jedoch erreichte ausschließlich der siRNS7-behandelte Ansatz statistische Signifikanz.





**Abbildung 41: Dokumentation der Zellmotilität in Abhängigkeit von der TTK-Runterregulation in PaTu-8988T Zellen.** Das Balkendiagramm zeigt die relative Geschwindigkeit transfizierter Zellen und Kontrollen 24h nach der Repression des Kandidatengens. Die Zellmigration wurde für 20h mittels Cell Observer® Mikroskopsystem dokumentiert. Wie im Methodenteil (3.2.4) beschrieben wurden in 10-minütigen Abständen Aufnahmen der Zellpositionen getätigt, die Einzelaufnahmen anschließend zu einem Film zusammengefügt und mit Hilfe der Time Lapse Analyzer open source software, die ein automatisches *tracking* jeder einzelnen Zelle im Bild erlaubte, statistisch ausgewertet. Eine geringe Reduktion der Zellmotilität wurde in den siRNS6- sowie -7- behandelten Proben im Vergleich zu Kontrollen gemessen. Die Anzahl der unabhängigen Versuchsdurchläufe ist durch die Variable „n“ angegeben. \* =  $p < 0,05$ ;

---

## 5. Diskussion

### 5.1 Hochdurchsatzanalysen in Form von reverser Transfektion

Die Ergebnisse des humanen Genomprojekts und ähnlicher Initiativen ermöglichen eine schnelle Erfassung und Klonierung von Genen, jedoch können funktionelle Zusammenhänge nur in (langwierigen) funktionellen Untersuchungen ermittelt werden. Die 2001 von Junaid Ziauddin und David M. Sabatini vorgestellte Methode der *reverse transfection arrays* (auch als *live cell microarrays* bezeichnet) ermöglicht eine parallele Analyse vieler Genprodukte und ihrer physiologischer Funktionen unter gewöhnlichen Laborbedingungen. (Ziauddin und Sabatini 2001) Zur Identifikation transfizierter Zellen auf dem Zellrasen sowie der Bestimmung der subzellulären Lokalisation der Genprodukte unter verschiedenen Kulturkonditionen wurden die von uns vorausgewählten Kandidatengene als YFP- sowie CFP-Fusionskonstrukte subkloniert. (Simpson, et al. 2000) Diverse Forschungsarbeiten unterschiedlicher Disziplinen belegen einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation eines Genproduktes und seiner Funktion. Ein Musterbeispiel ist der Transkriptionsfaktor NFATc2, *Nuclear Factor Of Activated T-Cells 2*. Es ist ein gut beschriebener und in diverse Vorgänge wie Apoptoseprävention und Wachstumsförderung in Tumorzellen (u.a. Pankreaskarzinomzellen) involvierter Akteur. Dieser Faktor wechselt seine subzelluläre Lokalisation in Abhängigkeit der Serumbehandlung oder anderer pro-proliferativer Signale vom Zytosol in den Zellkern. (Baumgart, et al. 2012, Köinig, et al. 2010) Ein wichtiger Punkt in unseren Untersuchungen war die N-terminale Fusion des CFP-Proteins und C-terminale Fusion bei der YFP-Markierung der Kandidatengen-cDNS zur Vermeidung der Überlagerung wichtiger Signal- und Transportsequenzen und somit fehleranfälliger Datensätze. Die Effizienz der reversen Transfektion ist ein wichtiger Kontrollpunkt, der sowohl für die Qualität als auch den richtigen Ablauf der Auswertung bürgt. Einerseits garantieren gute Transfektionsergebnisse die Reproduzierbarkeit der Versuche und ebenfalls die Zuverlässigkeit der Effekte, ausgehend von einer Zellpopulation und nicht von Einzelzellen. Des Weiteren dienen einzelne *Spots*, immobilisiert durch die verwendete 0,2% Gelatine-Lösung, der räumlichen Orientierung auf dem Objektträger und somit der eindeutigen Identifikation des jeweiligen Genproduktes und genauen Abgrenzung von anderen Kandidaten. Ein fluoreszenzabhängiger Störfaktor war das Phänomen der Photobleichung, wobei das Anregungslicht ausreichend ist, um das Fluorophor zu zerstören und dadurch jegliches Signal auszulöschen. Dieses in unseren Versuchen speziell das CFP-Protein betreffende Problem lässt sich durch gute Transfektionseffizienzen nicht beheben, jedoch etwas umgehen. Von uns ertestete Transfektionsansätze mit 4µg DNS und 2 µL Lipofectamine® 2000 erreichten eine minimale Transfektionseffizienz von 50% und machten somit die Auswertung möglich. Gleichzeitig führten

sie durch hohe Expressionsraten teilweise zu falsch positiven Ergebnissen. In einigen Fällen kam es zum Auslösen von Apoptose nicht als natürliche Funktion dieser Gene, sondern als Reaktion auf unnatürlich hohe Mengen an rekombinanten Genprodukten. Exemplarisch zeigte der Kandidat *COPEB* sowohl einen pro-proliferativen als auch pro-apoptischen, jedoch nicht immer reproduzierbaren Effekt. Weitere Artefakte verursachten zu schwache oder zu starke Fluoreszenzen, die zu lange Belichtungszeiten bzw. ein Überstrahlen in andere Kanäle zur Folge hatten. Trotz eingeschränkter Sensitivität und einiger falsch positiver oder/und negativer Ergebnisse, einiger Artefakte und Störfaktoren, die nicht behoben, aber durch die Anzahl unabhängiger Versuche minimiert wurden, konnten insgesamt 14 von 79 ursprünglichen Kandidaten mit starken reproduzierbaren Effekten bei subzellulären Lokalisationsänderungen sowie unterschiedlichen funktionalen *Assays* nach einer Überexpression in den Modellzelllinien identifiziert werden. Die Liste der Kandidaten wurde um 12 PaCaNet-Gene erweitert und im *forward* Transfektionsformat auf der Überexpression basierende Daten gesammelt. Zusätzlich lieferten die Repressionsversuche der insgesamt 91 Gene weitere bemerkenswerte, reproduzierbare Resultate. So konnten nach den Validierungsversuchen 11 der 14 im Format der reversen Transfektion ausgewählten Gene für die Einzelgencharakterisierung bestimmt werden. Zusätzlich wurde diese Liste durch zwei Gene aus den Repressionsexperimenten und fünf Gene der PaCaNet-Kandidatengenliste erweitert. Zusammenfassend zeigten 18 von 91 Kandidatengen funktionell relevante und experimentell reproduzierbare Ergebnisse, die eine weitergehende Analyse im Einzelgen-Format rechtfertigen.

Die hier angewendete Methodik ist insbesondere gekennzeichnet durch die große Zeitersparnis und den geringen Materialaufwand im Vergleich zu Einzelanalysen. Gleichzeitig bietet der Einsatz diverser Antikörper ein breites Spektrum an zu untersuchenden Merkmalen in parallelisiertem Ansatz und somit einen Bezug zur physiologischen Funktion einzelner Kandidaten. Die Gültigkeit dieser Anwendung konnte während der Literaturrecherche zum Ausschluss der bereits publizierten bzw. erforschten Thematiken bestätigt werden. Der Kandidat *TM4SF1* ist in unseren *Screenings* durch positive Signale der Ki67- und E-Cadherin inklusive der Colokalisation vermerkt. Eine Übereinstimmung ergab sich mit den Veröffentlichungen über *TM4SF1*-Assoziation mit dem Tumorwachstum, -invasion und Metastasierung, Angiogenese und Endothelzellenfunktion einschließlich der E-Cadherin-Interaktion. (Shih, et al. 2009) Das Gen *NFATc1* zeigte einen serumabhängigen Lokalisationswechsel von Zytoplasma in den Zellkern, auch dieses Resultat konnte im Literaturabgleich bestätigt werden. Ein starker Apoptoseeffekt konnte beispielhaft für *SPINT2* überexpressionsabhängig detektiert werden, wobei auch dieser Zusammenhang bereits beschrieben wurde. (Dong, et al. 2010)

Unsere ursprüngliche Planung sah vor, die Repressionsexperimente ebenfalls im reversen Transfektionsformat durchzuführen. Der für die Überexpressionskonstrukte eingesetzter Tecan Miniprep 75 Roboter war auf Grund hoher Mengen für den *Microarray*-Druck benötigter siRNS, die im Gegenzug zu den Plasmiden nicht nachproduziert werden konnten, ungeeignet. Zu diesem Zweck sollte daher ein TopSpot® E-Microarrayer der Firma BioFluidix verwendet werden. Dieser Apparat arbeitet nach dem Piezo-Prinzip kontaktlos, schnell, hochpräzise und mit freiwählbaren Volumina. Für die erfolgreiche *Microarray*-Herstellung galt es zwei Probleme zu überwinden. Die von uns eingesetzten siRNS waren aus Kostengründen nicht markiert. Das bedeutete zum einen, dass wir die einzelnen Spots nicht gut eingrenzen und zum zweiten die siRNS-transfizierten Zellen von der restlichen Population nicht unterscheiden konnten, was die Bestimmung der Transfektionseffizienzen erschwerte. Direkt fluorchrommarkierten siRNS sind eine sehr kostenintensive Anschaffung und kamen für unsere 106 Kandidaten mit einem Pool aus jeweils vier unterschiedlichen siRNS pro Gen nicht in Betracht. Es bestünde die Möglichkeit den Transfektionsansatz mit Farbstoffen zu markieren und somit zwar die *Spots* gut auffindbar zu machen, jedoch keine Angaben zur Transfektionseffizienzen in diesem Format machen zu können. Das zweite Problem betraf die Verschlüsse der Kapillarleitungen aufgrund der viskosen Gelatine und konnte weder unsererseits noch durch das *Supportteam* des Herstellers behoben werden. Aufgrund dieser Problematik haben wir die Methodik der reversen Transfektion zu diesem Zeitpunkt für die siRNS-Anwendung als ungeeignet eingestuft und die vorgesehenen Assays im *forward* Transfektionsformat ausgeführt.

## 5.2 Der Hochdurchsatzkandidat *ADRBK1*

Die Kinase *ADRBK1* ist eines der 18 aus der ursprünglichen Kandidatengruppe zur Einzelcharakterisierung ausgewählten Gene. Die Selektion beruhte auf der Detektion des Lokalisationswechsels in Abhängigkeit von der Serumbehandlung. Dieses Protein war in der Literatur ausschließlich als im Zytosol vorliegendes Enzym beschrieben. (Kohout und Lefkowitz 2003) Die Validierung der Ergebnisse bestätigte den Lokalisationswechsel sowohl für die CFP- als auch die YFP-Konstrukte, jedoch primär nicht abhängig von der Serumbehandlung sondern in Abhängigkeit von der Zeit nach Transfektion. Dieses erste Indiz bereitete die Plattform für tiefergehende Untersuchungen. Eine spezifische Rolle von *ADRBK1* im Pankreaskarzinom ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Überprüfung der Expression in humanem pankreatischem Gewebe belegte eine höchst signifikante Überexpression des Gens im Adenokarzinom im Vergleich zum gesunden oder von chronischer Pankreatitis betroffenen Gewebe. Die Untersuchung der *ADRBK1*-Expression in etablierten Zelllinien deckte sowohl exprimierende als auch nicht-

exprimierende Linien auf. Dies ermöglichte die funktionelle Untersuchung in Abhängigkeit der Überexpression und der Herunterregulation.

Die *ADRBK1*-Kinase hat eine besondere Bedeutung bei der Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, die ihrerseits diverse Signalkaskaden initiieren und somit potenziell die Regulation des Zellzyklus mit beeinflussen. In der Folge der Herunterregulation der Kinase zeigte sich in unseren Experimenten eine Abnahme und mittels Überexpression eine Zunahme der Proliferation in transformierten Zelllinien. Technisch betrachtet erreichte der Überexpressionseffekt ausschließlich in S2-007 Zellen statistische Signifikanz, was eventuell neben den zur Verfügung stehenden Zelllinien ein Mangel des Transfektionsreagenz oder auch des -protokolls darstellen kann. Wie bereits das für die Artefaktenbildung des Hochdurchsatzverfahrens beschriebene Phänomen der Apoptoseinduktion durch unnatürlich hohe Mengen an rekombinantem Protein, könnte angesichts der starken Differenz zwischen unbehandelten und GFP-transfizierten Zellen sowohl in den MTT- als auch *BrdU-Assay* dieser Effekt auch für die hier beobachtete geringe Zunahme an Zellproliferation mit verantwortlich sein. Somit bedarf es für eine fundiertere Aussage über die proliferativen Effekte der *ADRBK1*-Überexpression weiterer Untersuchungen. Nach dem jetzigen Stand der publizierten Forschungsergebnisse wird der *ADRBK1*-Expression ein Einfluss auf die Proliferation, jedoch mit unterschiedlicher Auswirkung in Abhängigkeit von Zelltypus und mitogenen Stimuli nachgewiesen. So zeigte eine schweizer Arbeitsgruppe eine Überlappung der kardioprotektiven und tumorwachstumsfördernden Signalinduktion, ausgelöst durch die *ADRBK1*-Inhibition. Dabei resultierte eine Repression des Gens in der Aktivierung wachstumsstimulierender *MAPK*-Signalwege, die in Kardiomyocyten Apoptose-protektiv wirkte. Ein Ausschalten des *ADRBK1* und der *RAF/MAPK*-Aktivierung führte zur Apoptose und belegte damit diesen funktionellen Zusammenhang. (Carman und Benovic, G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn offs. 1998) Parallel wurde im Xenograftmodell anhand *ADRBK1*-insuffizienter Zellklone, aber auch durch den Einsatz spezifischer Kinaseinhibitoren, ein reduziertes Tumorwachstum festgestellt. (Fu, Koller und Abd Alla 2013) Andere Arbeitsgruppen bescheinigen der *ADRBK1*-Überexpression eine antiproliferative Wirkung. Die Überexpression von *ADRBK1* induziert in HCC- (hepatozelluläres Karzinom) Zellen eine Wachstumshemmung. Es konnte in der Folge kein Aktivierung der Apoptosesignalkaskade, allerdings ein Zellzyklus G2/M-Phasenarrest detektiert werden. Zusätzlich wurde eine Zunahme des an Serin15 phosphorylierten p53 und Cyclin B1 gemessen. (Wei, et al. 2012) Eine Überexpression zeigte ebenfalls sowohl in malignen als auch in benignen Schilddrüsenzellen eine proliferationshemmende Wirkung. (Métayé, et al. 2008) Eine Erklärung bietet eine Publikation, die eine natürliche transiente G2/M-Phase Herunterregulation aufgrund der CDK2 Serin670-Phosphorylierung in humanen Leber-Zelllinien beschreibt. Dies

förderte die *ADRBK1*-Bindung an die Propylisomerase Pin1 und resultierte in der Degradierung des Proteins. Die Prevention des *ADRBK1*-Abbaus rief eine p53-Antwort und eine Apoptoseinduktion hervor. (Penela, et al. 2010) Allerdings ergaben all diese Erkenntnisse keine direkte Konformität mit unseren Resultaten. Eine Übereinstimmung konnte mit der von Ho et al. in der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion beschriebenen antagonistischen Eigenschaft der Kinase beobachtet werden. Sie zeigten in Leber-Zelllinien eine *ADRBK1*-abhängige Inhibierung des TGF- $\beta$ -vermittelten Zellarrests und Apoptoseinduktion. (Ho, et al. 2005, Lefkowitz und Whalen, Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. 2004) TGF- $\beta$  ist ein besonderer Akteur im Pankreaskarzinom und weist sowohl suppressive als auch progressionsfördernde Eigenschaften auf. Die duale Funktionalität besteht zum Einem darin, dass Tumorzellen empfänglich für die TGF- $\beta$  vermittelte Förderung der Metastasierung, Immunsuppression und Angiogenese, jedoch nicht mehr sensitiv für proapoptotische und antiproliferative TGF- $\beta$ -Signale sind. Zusammenfassend legen diese Arbeiten nahe, dass *ADRBK1* ein Teil der komplexen Netzwerke ist, die die Regulation des Zellzyklus steuern. Diese Hypothese konnten wir auf das Pankreaskarzinom bezogen sowohl im BrdU-*Assay* als auch anhand der durchflusszytometrischen Analyse *ADRBK1*-repressionabhängigen G1-Phasen-Arrest bestätigen. Auch hier wäre ein möglicher Zusammenhang mit TGF- $\beta$  Signalkaskaden, die in Verbindung mit dem Verlust der TGF- $\beta$ -Sensitivität der transformierten Zellen eine Deregulation der Cycline, Cyclin-abhängiger Kinasen und ihrer Inhibitoren bewirken, vorstellbar. (Hocevar und Howe 1998, Zhang, et al. 2002) Ein weiterer *ADRBK1*-abhängiger Effekt betrifft die Abnahme vitaler Zellen nach *knock down* des Gens. Da eine durch *ADRBK1*-Verlust ausgelöste Apoptoseinduktion nicht beobachtet werden konnte, kann auch dieser Effekt der Inhibition von Proliferation zugeordnet werden. Ins Detail gehende Untersuchung am Zellzyklus beteiligter Proteine wie Cyclin-abhängige Kinasen, Cycline D1, -B1 sowie des Tumorsuppressor p15INK4B, CDK-Inhibitor-1 p21 und des Protoonkogen c-Myc zeigte ausschließlich eine Reduktion des Cyclin D1 und -B1 für die PaTu-8988T Zellen, jedoch konnten diese Resultate nicht sicher reproduziert werden. Die Frage nach genauen Mechanismen, die diese Effekte vermitteln, bleibt daher zunächst ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

### **5.3 Onkogenes Potenzial der dualspezifischen Kinase *TTK* im Pankreaskarzinom**

Die kinomweite Untersuchung anhand des AC-DEVD-AMC *Caspaseassays* identifizierte *TTK* als eine in transformierten Zellen repressionsabhängig apoptoseinduzierende Kinase. Die anfängliche Überprüfung der Expression in humanem Gewebe zeigte interessanterweise eine signifikante pankreastumorspezifische Dysregulation der *TTK*-Expression. In der Literaturrecherche fiel in diesem Zusammenhang eine Arbeit über die Hochdurchsatzanalyse CHASM, *cancer-specific high-*

*throughput annotation of somatic mutations*, auf, in der zusätzlich zu den bereits bekannten Genen, hoch sensitiv und spezifisch 15 neue *driver* Mutationen einschließlich der Kinase *TTK* im Pankreaskarzinom identifiziert werden konnten. (Carter, et al. 2010) Unabhängig von Pankreasneoplasien zeigte eine finnländische Forschungsgruppe eine hochfrequente *TTK*-Mutation in kolorektalem Karzinom. (Niittymäki, et al. 2011) Die Aufgabe der dualen Kinase besteht aus der Rekrutierung von Faktoren wie Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Bub3 und Rod-Zw-Zwilch-Komplex zu den nicht an Mikrotubuli angedockten Kinetochoren. Damit ist die *TTK* eine wichtige Komponente des SAC, *mitotic spindle assembly checkpoint*, eines eukaryotenweit konservierten Signaltransduktionsmechanismus, dessen Effektor der MCC, *mitotic checkpoint komplex*, bestehend aus den SAC-Proteinen Mad2/Mad3, Bub3 und CDC20, ist. Die Aufgabe des MCC besteht in der direkten Bindung an den APC/C- (*anaphase-promoting complex or cyclosome*) Komplex. Die dadurch verursachte Hemmung des *cell-division cycle Protein 20*, CDC20, verhindert die Ubiquitinierung des Schlüsselregulators Cyclin B und Securin durch den APC/C. Dies würde andernfalls zur Degradation von Cyclin B1 und Securin führen, was einen irreversiblen Anstoß für die Anaphaseneinleitung darstellt. (Herzog, et al. 2009, Hewitt, et al. 2010, Maciejowski, et al. 2010, Wei, et al. 2005) Einige Studien belegen jedoch, dass funktionierende mitotische Kontrollpunkte zwar zur Wahrung der genomischen Integrität beitragen, jedoch nicht essentiell sind für einen erfolgreichen Mitoseverlauf. Zwar beweisen *knock out* Mausversuche, dass nicht funktionsfähige SAC-Komponenten, wie Mad2 oder Bub3, bereits embryonal letal sind. (Dobles, et al. 2000, Kalitsis, et al. 2001) Auf der Ebene einzelner Zellen sind solche Defekte jedoch selten tödlich, aber sie führen zu genetisch instabilen Nachkommen. Unsere Resultate der Viabilitätsprüfung, die eine starke und statistisch signifikante Senkung der Anzahl lebender Zellen in Abhängigkeit der *TTK*-Expression in Tumorzelllinien belegen und sowohl via Immunoblotnachweise als auch mittels durchflusszytometrischen Analysen eine Apoptoseinduktion beweisen, ermöglichen eine Einordnung der *TTK*-Funktion im Einklang mit bereits vorhandenen Daten. Diverse Arbeitsgruppen schreiben *TTK* unterschiedliche Aufgaben beim Prozess der Rekrutierung von Mikrotubuli an die Kinetochore zu, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist. Hewitt und Kollegen belegen die Notwendigkeit von *TTK* zur Rekrutierung von O-Mad2 an freiliegende Kinetochore zur stabilen Bindung an den bereits angedockten Mad1-C-Mad2-Komplex. (Hewitt, et al. 2010) Maciejowski belegte die *TTK*-Rolle bei der Organisation des CDC20-APC/C-Komplexes und dessen Erhalt. (Maciejowski, et al. 2010) Andere Forschungsarbeiten legen nahe, dass *TTK* die BURB1: CDC20 und/oder CDC20/Mad2 Interaktionen beeinflusst. (Cahill, et al. 1998, Wei, et al. 2005) Analog zu vorangegangenen Arbeiten, die Mad2 als ein Hauptsignalmolekül des SAC beschrieben haben, zeigten Tipton und seine Kollegen, dass eine Hemmung der Kinase *TTK* zum Verlust der Mad2-

Bindung an den MCC führte. Dies bewirkte, dass der APC/C-Komplex nicht effektiv inhibiert werden konnte, obwohl CDC20 an BubR1 gebunden blieb, weil für eine APC/C-inhibierende Wirkung ein vollständiger MCC-Komplex erforderlich ist. (Cahill, et al. 1998, Dobles, et al. 2000, Kalitsis, et al. 2001, Tipton, Ji, et al. 2013, Tipton, Tipton, et al. 2011, Xia, et al. 2004)

Eine Reihe von Forschungsarbeiten zeigen auf, dass mutierte bzw. gestörte SAC-Mechanismen in diversen Tumorzellen mit dem Verlust der Fähigkeit der Zellen einhergeht, für eine längere Zeit während der Mitose zu arrestieren, um Defekte in der Chromosomen-Anheftung zu beheben. (Cahill, et al. 1998, Ojajärvi, et al. 2001, Rieder und Maiato 2004, Saeki, et al. 2002, Takahashi, et al. 1999, Weitzel und Vandr  2000) Eine Hemmung von *TTK* unterbricht die Bindung zwischen BubR1:Mad2 und Cdc20 sowie Mad2 und verursacht damit eine vorschnelle Aktivierung des anaphasen-promotenden Komplexes/Cyclosom (APC/C). (Tipton, Tipton, et al. 2011) Einen weiteren Hinweis auf den genauen Mechanismus bieten die DAPI-Färbungen der *TTK*-reprimierten Zellen, die eine radikale Veränderung der Kernmorphologie und zahlreiche Mikronuklei aufweisen. Die Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet belegen in Abwesenheit von funktionsfähigen SAC sowie auftretender Störung der Spindelorganisation einen vorschnellen Eintritt in die Mitose und folgend eine fehlerhafte Zytokinese, gekennzeichnet durch Bildung zahlreicher Mikronuklei und sogenannter 4N (tetraploid) „Restitutions-Nuklei“ (*restitution nuclei*). (Rieder und Maiato 2004, Taylor und McKeon 1997) Die Mikronuklei, bekannt auch als Howell-Jolly-Körperchen, sind kleine vom Zellkern abstammende exonukleare Körperchen, die Fragmente, Bruchstücke und/oder ganze Chromosomen enthalten. Diese können beispielsweise durch eine defekte DNS-Reparaturmaschinerie, Fehler der Mitosespindel, geschädigte Kinetochore, Defekte der Zellzykluskontrollsysteme, zentromerischen DNS-Hypomethylation, chromosomale Abberation, genotoxische Substanzen und Strahlung verursacht werden. (Luzhna, Kathiria und Kovalchuk 2013, Sears und Udden 2012, Mateuca, et al. 2006) Experimente unter Gebrauch von Spindelorganisation hemmenden Substanzen in H261, einem Abkommeling der HeLa-Zelllinie, bewirkten zunächst einen Übergang in die D-Mitose und anschließend in die Apoptose. Eine Unterdrückung der SAC-Funktionsfähigkeit mittels Bub1-Inhibitoren dieser behandelten H261 Zellen verursachten einen rapiden Übergang der D-Mitose und den Beginn eines neuen Zellzyklus. Dies belegt unter anderem die Bedeutung von Bub1 für die Apoptoseinduktion während der G1-Phase, aber auch die bereits erwähnte Entbehrlichkeit des funktionsfähigen SAC für den Mitoseverlauf, jedoch nicht für die chromosomale Integrität. (Dobles, et al. 2000, Taylor und McKeon 1997, Dai, et al. 2004, Ouyang, et al. 2002)

Wie in der Einleitung bereits erläutert weisen ca. 4% der Pankreasneoplasien instabile Genome auf, die über verschiedene Mechanismen zustande kommen, die zusammenfassend als Mikrosatelliten-



Instabilität bezeichnet werden. Darüber hinaus sind Chromosomenlängenanomalien, die u.a. durch Telomersequenzenverkürzungen provoziert werden können, sehr frühe Ereignisse in der Pankreas-Karzinogenese, die in 90% der PanIN Stadien vorzufinden sind. (Goggins, et al. 1998) Im Hinblick auf diesen genetischen Hintergrund erscheint das Auftreten von Mikronuklei eine plausible Reaktion auf den Verlust des SAC-Einflusses. Die Durchflusszytometriestudien der HeLa- und U2OS-Zellen wiesen ebenfalls einen Übergang in der G1-Phase in die Apoptose bei nicht funktionsfähigem SAC auf. In der Literatur lassen sich diverse Beispiele in unterschiedlichen Zellmodellen mit einer Bandbreite an möglichen Reaktionen bei Missfunktion vom SAC von der Zellzyklusprogression bis hin zur Apoptose ableiten. (Rieder und Maiato 2004, WHO, Hamilton und Aaltonen, Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. 2000) Für Pankreaskarzinomzelllinien deutet sich eine anhand der *TTK*-Repression ausgelöste Reduktion der Viabilität, bedingt durch genomische Instabilität, die letztendlich in Apoptose resultiert, an. Eine Überprüfung der Zellzyklusdynamik anhand der Durchflusszytometrie zeigte keine Auffälligkeiten oder zusammenhängende Veränderungen, obwohl diese duale Kinase eine wichtige Komponente des mitotischen Kontrollpunktes ist. Die aufgrund des gestörten SACs verursachte genomische Instabilität, die während der G1-Phase in die Apoptose führt, erklärt somit wahrscheinlich auch die im BrdU-Assay gemessenen niedrigen Proliferationsraten in den *TTK*-reprimierten Ansätzen, die nicht auf eine Zellzyklus-Blockade sondern auf die stark verminderte Anwesenheit vitaler Zellen zurückzuführen war.

Die Untersuchung des substratunabhängigen Wachstums mittels Softagar-Kolonienbildung-Assays offenbarte ebenfalls einen starken Effekt in Zusammenhang mit der *TTK*-Expression. Die Reduktion vitaler Kolonien im Vergleich zu kontrollbehandelten Populationen fiel hier prozentual noch deutlich stärker aus als in den BrdU- und MTT-Assays in adhärenter Kultur. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine nochmals verstärkte Wirkung der *TTK*-Inhibition unter nicht-adhärennten Bedingungen, die sich beispielsweise durch die zusätzliche Aktivierung Anoikis-induzierender Signale erklären könnte. Dies ist insbesondere im Hinblick auf Mechanismen der Metastasierung interessant, da die Ablösung von Zellen oder Zellverbänden vom Primärtumor und das Überleben der Zellen im Blut- oder Lymphstrom eine notwendige Voraussetzung zur Bildung von Metastasen darstellt. Wie unsere 7-tägigen Langzeit-MTT-Assays belegen, ist der durch die transiente *TTK*-Runterregulation ausgelöste Effekt irreversibel oder zumindest über lange Zeiträume stabil. Dies unterstreicht die Validität der Softagar-Assay-Ergebnisse, bei denen eine Zählung der entstandenen Kolonien 10-11 Tage nach Behandlung und Aussaat durchgeführt wird.

Auch die Untersuchung der Zellmotilität anhand der *time lapse*-Analysen zeigte einen geringen Rückgang der Motilität als Folge der *TTK*-Repression. Dieser Effekt fiel jedoch eher moderat aus,

so dass im Hinblick auf die deutlich stärkeren Effekte auf die Vitalität der Zellen anzunehmen ist, dass *TTK* keine kausale Rolle in der Zellmotilität innehat und die beobachteten Effekte Epiphänomene des induzierten apoptotischen und nekrotischen Zelltods waren.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

| <u>Abkürzung:</u> | <u>vollständige Bezeichnung:</u>                          |
|-------------------|---|
| Abb.              | Abbildung   |
| Abk.              | Abkürzung   |
| APC/C             | <i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>               |
| APS               | Ammoniumperoxodisulfat                                    |
| ATP               | Adenosintriphosphat                                       |
| Bidest.           | bidestilliertes   |
| BLM               | <i>bloom syndrome protein</i>                             |
| BMI               | <i>Body Mass Index</i>                                    |
| <i>BRCA2</i>      | <i>breast cancer type 2 susceptibility protein</i>        |
| BSA               | bovines Serumalbumin                                      |
| C.P.              | chronische Pankreatitis                                   |
| CDC20             | <i>cell- division cycle Protein 20</i>                    |
| Cdc               | <i>cell division cycle</i>                                |
| CDK(x)            | <i>cylin- dependent kinase (x)</i>                        |
| <i>CDKN2A</i>     | cyclin-abhängige Kinase 2A                                |
| cDNS              | <i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure               |
| CFP               | <i>cyan fluorescent protein</i>                           |
| cl.               | <i>cleaved</i>  |
| CPC               | <i>chromosomal passenger complex</i>                      |
| CT96              | <i>cancer/testis Antigene 96</i>                          |
| DAPI              | 4,6-Diamidin-2-phenylindol                                |
| DMEM              | Dulbecco`s Modified Eagle Medium                          |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid  |
| dNPTs             | Desoxyribonukleosidtriphosphate                           |
| DNS               | Desoxyribonukleinsäure                                    |
| <i>DPC4</i>       | <i>Deleted In Pancreatic Carcinoma Locus 4</i>            |
| DREAM             | <i>downstream regulatory element antagonist modulator</i> |
| DTT               | Dithiothreitol  |
| EC-               | <i>enzyme commission numbers</i>                          |
| ECL               | <i>Enhanced chemiluminescence substrate</i>               |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure                              |
| EGF               | epidermalen Wachstumsfaktor                               |
| EGFR              | epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor                       |
| ELISA             | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                         |
| EMT               | epithelial- mesenchymale Transition                       |
| ERK               | <i>extracellular- signal regulated Kinase</i>             |
| ESK               | <i>embryonal carcinoma STY Kinase</i>                     |
| EST               | <i>expressed sequence tag</i>                             |
| evtl.             | eventuell   |
| F                 | <i>forward</i>  |

|              |   |
|--------------|---|
| FACS         | <i>fluorescence- activated cell sorting</i>                                 |
| FAMMM        | familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom               |
| FKS          | fetales Kälberserum   |
| forw.        | <i>forward</i>  |
| GDP          | Guanosindiphosphat  |
| GFP          | grün fluoreszierendes Protein   |
| GPCR         | G-Protein gekoppelten Rezeptor  |
| GRK          | G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase   |
| GTP          | Guanosintriphosphat   |
| H1F1a        | <i>H1 Histone Family, Member 1</i>  |
| HCC          | <i>Hepatocellular carcinoma cell line</i>                                   |
| Her2/neu     | <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>                             |
| HGP          | international Humangenomprojekt   |
| <i>hMLH1</i> | human Mutl homolog 1  |
| <i>hMSH2</i> | human Mutl homolog 2  |
| IF           | Immunfluoreszenz  |
| IGF-1        | <i>Insulin-like growth factor</i>   |
| IL6          | Interleukin 6   |
| INCENP       | Inner centromere protein  |
| <i>INK4A</i> | <i>Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4</i>                            |
| IPMN         | intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie                                    |
| <i>K-Ras</i> | <i>Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog</i>                           |
| k.d.         | <i>knock down</i>   |
| KOC          | <i>KH-domain containing protein over expressed in cancer</i>                |
| LB           | Luria-Broth   |
| Mad 2,       | <i>mitotic arrest deficient 2</i>   |
| MAPK         | <i>mitogen- activated protein kinase</i>                                    |
| MCC          | <i>mitotic checkpoint komplex</i>   |
| MCN          | muzinös zystische Neoplasie   |
| MDM2         | <i>Mouse Double Minute 2, Human Homolog of P53-Binding Protein1</i>         |
| MPCS         | Melanom-Pankreaskarzinom-Syndrom  |
| Mph1         | <i>Mps1-p like pombe homolog</i>  |
| MSI          | Mikrosatelliteninstabilität   |
| MSP1         | <i>Monopolar Spindle 1</i>  |
| MTT          | (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)             |
| NETs         | <i>neuroexocrine tumors</i>   |
| NFκB         | <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i> |
| OD           | optische Dichte   |
| Oligo-dT     | oligo-Desoxythymidine   |
| OPK          | <i>other Protein kinases</i>  |
| P2           | ribosomales Protein 2   |
| PanIN        | pankreatische intraepitheliale Neoplasien                                   |
| PBS          | <i>Phosphate-Buffered Saline</i>  |

## 6. Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| PCR           | <i>polymerase chain reaction</i>                          |
| PDAC          | <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>                   |
| PDGF          | <i>Platelet-derived growth factor</i>                     |
| PET           | <i>pancreatic endocrine tumors</i>                        |
| PH-Domäne     | <i>pleckstrine homology</i>                               |
| PIP2          | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat                      |
| PKA           | Proteinkinase A   |
| PKC           | Proteinkinase C   |
| PLK1          | <i>Polo like kinase 1</i>                                 |
| <i>PLK1</i> , | <i>Polo-like Kinase</i>                                   |
| <i>PRSS1</i>  | Protease, Serine, 1 (Trypsin 1)                           |
| PVDF          | Polyvinylidenfluorid                                      |
| qRT-PCR       | <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>   |
| R             | <i>real</i>   |
| rev.          | <i>reverse</i>  |
| RH-Domäne     | <i>regulator of G-Protein signaling homology</i>          |
| RKIP          | Raf-Kinase-Inhibitorprotein                               |
| RNS           | ribonukleinsäure  |
| RT            | Raumtemperatur  |
| SAC,          | <i>mitotic spindle assembly checkpoint</i>                |
| SDS           | Sodium-Dodecyl-Sulfat                                     |
| SDS-PAGE      | Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese     |
| siK           | siKontrolle   |
| siRNS         | <i>small interfering ribonucleic acid</i>                 |
| Smad4         | <i>Deleted In Pancreatic Carcinoma Locus 4</i>            |
| <i>SPINK1</i> | <i>serine peptidase inhibitor, Kazal type 1</i>           |
| STAT3         | <i>signal transducer and activator of transcription 3</i> |
| <i>STK 11</i> | Serin-Threonin-Kinase 11                                  |
| STS           | Staurosporin  |
| TBS           | <i>Tris Buffered saline</i>                               |
| TEMED         | Tetramethylethylendiamin                                  |
| TGF- $\beta$  | <i>Transforming growth factor, beta 1</i>                 |
| TNF $\alpha$  | <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>                        |
| TRIS          | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                          |
| u.a.          | unter anderem   |
| UE            | unterexpremiert   |
| ÜE            | überexpremiert  |
| unb.          | unbehandelt   |
| UV            | Ultraviolett  |
| VGEF-1        | <i>vascular endothelial growth factor-1</i>               |
| vgl.          | vergleiche  |
| WB            | Western Blot  |
| WHO           | <i>world health organization</i>                          |

---

YFP

*Yellow Fluorescent Protein*

## 7. Literaturverzeichnis

- Abrieu, A, et al. „Msp1 is as kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint.“ *Cell*, July 2001: 13;106(1):83-93.
- Alexakis, N, C Halloran, M Raraty, P Ghaneh, R Sutton, und JP Neoptolemos. „Current standards of surgery for pancreatic cancer.“ *Br J Surg.*, Nov. 2004: 91(11):1410-27.
- Algül, H, M Treiber, M Lesina, und RM Schmid. „Mechanisms of disease: chronic inflammation and cancer in the pancreas--a potential role for pancreatic stellate cells?“ *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* , Aug. 2007: 4(8):454-62.
- Almoguera, C, D Shibata, K Forrester, J Martin, N Arnheim, und M Perucho. „Most human catcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes.“ *Cell*, 1988: 53:549-544.
- Bachem, MG, et al. „Identification, culture, and characterisation of pancreatic stellates cells in rats and humans.“ *Gastroenterology*, 1998: 115:421-432.
- Bailey, SN, RZ Wu, und DM. Sabatini. „Application of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery.“ *Drug Discov. Today*, 2002: 7:S113-18.
- Bardeesy, N, und RA DePinho. „Pancreatic cancer biology and genetics.“ *Nat Rev Cancer.* , Dec. 2002: 2(12):897-909.
- Bartsch, D, und M Rothmund. „Das familiäre exokrine Pankreaskarzinom.“ *Dtsch Med Wochenschr.*, 1997: 122: 378–382.
- Baumgart, S, et al. „Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer.“ *Gastroenterology*, Feb. 2012: 142(2):388-98.e1-7.
- Baylin, SB, und JG Herman. „DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.“ *Trends Genet.*, 2000: 16:168-174.
- Benovic, J. L, R. H Strasser, M. G Caron, und R. J Lefkowitz. „Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor.“ *Proc Natl Acad Sci*, May 1986: 83:2797-801.
- Benovic, JL, et al. „Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family.“ *J Biol Chem.*, Aug. 1991: 15:266(23):14939-46.
- Biankin, AV, et al. „Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia.“ *Cancer Res.*, 2001: 61:8830-8837.
- Bogovski, P, und S Bogovski. „Animal Species in which N-nitroso compounds induce cancer.“ *Int J Cancer*, 1981: 27(4):471-4.
- Boyle, P, et al. „Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC.“ *Int J Cancer*, Jul. 1996: 3:67(1):63-71.
- Bradford, MM. „A rapid sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding.“ *Analytical Biochemistry*, May 1976: 7:72:248-54.
- Buchholz, M, et al. „SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo.“ *Cancer Res.*, Aug. 2003: 63(16):4945-51.
- Buell, P, und J Dunn. „Cancer morortality among Japanese Issei and Nisei of California.“ *Cancer*, 1965: 18:656-64.

- Cahill, DP, et al. „Mutation of mitotic checkpoint genes in human cancers.“ *Nature*, Mar. 1998: 392(6673):300-3.
- Calle, EE, und MJ Thun. „Obesity and cancer.“ *Oncogene*, Aug. 2004: 23(38):6365-78.
- Calle, EE, und R Kaaks. „Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms.“ *Nat Rev Cancer*, Aug. 2004: 4(8):579-91.
- Carman, CV, et al. „Mutational analysis of Gbetagamma and phospholipids interaction with G protein-coupled receptor kinase 2.“ *J Biol Chem.*, Apr. 2000: 275(14):10443-52.
- Carman, CV, und JL Benovic. „G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn offs.“ *Curr Opin Neurobiol.*, Jun. 1998: 8(3):335-44.
- Carpenter, AE, et al. „Cell Profiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes.“ *Genome Biol.*, 2006: 7(10):R100.
- Carpenter, AE, und DM Sabatini. „Systematic genome-wide screens of gene function.“ *Nat. Rev. Genet.*, 2004: 5:11-22.
- Carter, H, J Samayoa, RH Hruban, und R Karchin. „Priorization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM).“ *Cancer Biol Ther.*, Sep. 2010: 15:10(6):582-7.
- Cascinu, S, M Falconi, V Valentini, und S Jelic. „Pancreatic cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.“ *Ann Oncol.*, Oct. 2010: 21 Suppl 5:v 55-8.
- Chartier, M, T Chénard, J Barker, und R Najmanovich. „Kinome Render: a stand-alone and web-accessible tool to annotate the human protein kinome tree.“ *PeerJ.*, Aug. 2013: 1:e126.
- Chen, J, et al. „Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells.“ *J Biol Chem.*, Jan. 2003: 278(1):486-90.
- Chua, YJ, und D Cunningham. „Adjuvant treatment for resectable pancreatic cancer.“ *Clin Oncol.*, Jul. 2005: 23(20):4532-7.
- Coss, A, KP Cantor, JS Reif, CF Lynch, und MH Ward. „Pancreatic cancer and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite.“ *Am J Epidemiol.*, Apr. 2004: 159(7):693-701.
- Dai, W, et al. „Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with Rub1 haploinsufficiency.“ *Cancer Res.*, Jan. 2004: 64(2):4405.
- Day, J D, et al. „Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu oncogene expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasm.“ *Hum. Pathol.*, 1996: 27:119-124.
- De Blasi, A, G Parruti, M Sallese, und Sud Consorzio Mario Negri. „Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes.“ *J Clin Invest.*, Jan. 1995: 95(1):203-10.
- Dobles, M, V Liberal, ML Scott, R Benezra, und PK Sorger. „Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2.“ *Cell*, Jun. 2000: 101(6):635-46.
- Dong, M, et al. „Ki-ras point mutation and p53 expression in human pancreatic cancer: a comparative study among Chinese, Japanese, and Western patients.“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, Mar. 2000: 9(3):279-84.
- Dong, W, X Chen, J Xie, P Sun, und Y Wu. „Epigenetic inactivation and tumor suppressor activity of HAI-2/SPINT2 in gastric cancer.“ *Int J Cancer*, Jan. 2010: 127(7):1526-34.



- Dorsam, Robert T., und J. Silvio Gutkind. „G-protein-coupled receptors and cancer.“ *Nature Reviews Cancer* 7, Feb. 2007: 79-94.
- Dou, Z, A Sawagechi, J Zhang, H Luo, L Brako, und XB Yao. „Dynamic distribution of TTK in HeLa cells: insights from an ultrastructural study.“ *Cell Res.*, Dec. 2003: 13(6):443-9.
- Douville, EM, et al. „Multiple cDNAs encoding the esk kinase predict transmembrane and intracellular enzyme isoforms.“ *Mol Cell Biol.*, Jun. 1992: 12(6):2681-9.
- Eguchi, H, et al. „Patients with pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms are high risk of colorectal cancer development.“ *Surgery*, 2006: 139(6):749-54.
- Elsässer, HP, U Lehr, B Agricola, und HF Kern. „Establishment and characterisation of two cell lines different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma.“ *Virchows Arch B Cell Pathology* , 1992: 61(5):295-306.
- Engelhardt, M, K Mackenzie, P Drullinsky, R T Silver, und M A Moore. „Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture.“ *Cancer Res.*, 2000: 60:610-617.
- Ferlay, J, P Autier, M Boniol, M Heanue, M Colombet, und P Boyle. „Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006.“ *Ann Oncol.*, Mar. 2006: 18(3):581-92.
- Fisher, GH, et al. „Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes.“ *Genes Dev.*, 2001: 15:3249-3262.
- Fogh, J, JM Fogh, und T Orfeo. „One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.“ *J Natl Cancer Inst.* , Jul. 1977: 59(1):221-6.
- Fountzilas, G, H Gratzner, LO Lim, und AA Yunis. „Comparative effects of selected drug combinations on the growth of a human pancreatic carcinoma cell line (MIA PaCa-2).“ *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986: 76:37-43.
- Fu, X, S Koller, und J Abd Alla. „Inhibition of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) triggers the growth-promoting mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.“ *J. Biol Chem.*, Mar. 2013: 288(11):7738-55.
- Furukawa, T, W.P. Duguid, L. Rosenberg, J. Viallet, D.A. Galloway, und M.S. Tsao. „Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus16.“ *Am J Pathol.*, Jun. 1996: 148(6):1763-1770.
- Garkavtsev, IV, N Kley, IA Grigorian, und AV Gudkov. „The Bloom syndrome protein interacts and cooperates with p53 in regulation of transcription and cell growth control.“ *Oncogene*, Dec. 2001: 20(57):8276-80.
- Gerdes, B, R Kreß, H Rieder, und M Sina-Frey. „ Familiäres Pankreaskarzinom: Studienkonzept einer Nationalen Fallsammlung mit Früherkennungsprogramm für Hochrisikopersonen.“ *Z Arztl Fortbild Qualitätssicherung*, 2002: 96: 251–255.
- Giardiello, FM, et al. „Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome.“ *Gastroenterology*, Dec. 2000: 199(6):1447-53.
- Goggins, M, et al. „Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER\*.“ *Am. J Pathol.*, 1998: 152:1501-1507.

- Goodman, O.B, J.G Krupnick, F Santini, V.V Gurevich, R.B Penn, und A.W Gagnon. „Beta-arrestin acts as a clathrin adapter in endocytosis of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor.“ *Nature*, 1996: 383:447-450.
- Graham, FL, J Smiley, WC Russell, und R Nairn. „Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.“ *J Gen Virol.*, Jul. 1977: 36(1):59-74.
- Gress, TM, et al. „A pancreatic cancer-specific expression profile.“ *Oncogene*, 1996: 13(8):1819-1830.
- Hahn, SA, et al. „BRCA 2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma.“ *J Natl Cancer Inst.*, Feb. 2003: 95(3):214-21.
- Hanks, SK. „Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective.“ *Genome Biol.*, 2003: 4(5):111.
- Hanks, SK, und T Hunter. „Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.“ *FASEB J.*, May 1995: 9(8):576-96.
- Harden, TK. „Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase.“ *Pharmacol. Rev.*, Mar. 1983: 35:5-32.
- He, X, MH Jones, und M Winey. „Mph1, a member of the Msp1-like family of dual specificity protein kinases, is required for the spindle checkpoint in *S. pombe*.“ *J Cell Sci.*, Jun. 1998: 111(Pt12):1635-47.
- Heasley, LE. „Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer.“ *Oncogene*, Mar. 2001: 26:20(13):1563-9.
- Heldin, CH, K Miyazono, und P ten Dijke. „TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.“ *Nature*, Dec. 1997: 390(6659):465-71.
- Herzog, F, et al. „Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex.“ *Science*, Mar. 2009: 323(5920):1477-81.
- Hewitt, L, et al. „Sustained Msp1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex.“ *J Cell Biol.*, Jun. 2010: 12:190(1):25-34.
- Hingorani, SR, et al. „Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.“ *Cancer Cell*, Dec. 2003: 4:437-450.
- Hisatomi, O, S Matsuda, T Satoh, S Kotaka, Y Imanishi, und F Tokunaga. „A novel subtype of G-protein-coupled receptor kinase, GRK7, in teleost cone photoreceptors.“ *FEBS Lett*, 1998: 424(3):159-64.
- Ho, J, E Cocolakis, VM Dumas, BI Posner, SA Laporte, und JJ Lebrun. „The G protein coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction.“ *EMBO J.*, Sep. 2005: 24:3247-3258.
- Hocevar, BA, und PH Howe. „Mechanisms of TGF-beta-induced cell cycle arrest.“ *Miner Electrolyte Metab.*, 1998: 24(2-3):131-5.
- Honda, R, R Körner, und EA Nigg. „Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis.“ *Mol Biol Cell*, Aug. 2003: 14(8):3325-41.
- Hotamisligil, G. S. „Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte.“ *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 2002: 24 (Suppl 4), 23- 27.
- Howes, N, et al. „Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe.“ *Clin Gastroenterol. Hepatol.*, Mar. 2004: 2(3):252-61.
- Hrubá, RH, RE Wlantz, und SE Kern. „Genetics progression in the pancreatic ducts.“ *Am J Pathol.*, 2000: 156(6):1821-5.

- Hruban, Ralph H., Anirban Maitra, Scott E. Kern, und Michael Goggins. „Precursors to Pancreatic Cancer.“ *Gastroenterol Clin North Am.*, Dec. 2007: 36(4): 831–vi.
- Hruban, RH, et al. „K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization.“ *Am J Pathol.*, Aug. 1993: 143:545-554.
- „Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): A new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesion.“ *Am J Surg Pathol*, May 2001: 25(5):579-86.
- „Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations.“ *Cancer Res.*, Jan. 2006: 66:95-106.
- Hulst, SPL. „Zur Kenntnis der Genese des Adenokarzinoms und Karzinoms des Pankreas.“ *Virchows Arch (B)*, 1905: 180:288-316.
- Huth, J, et al. „TimeLapseAnalyzer: multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy.“ *Comput Methods Programs Biomed.*, Nov. 2011: 104(2):227-34.
- Huxley, R, A Ansary-Moghaddam, Berrington de González A, F Barzi, und M Woodward. „Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies.“ *Br J Cancer*, Jun. 2005: 6;92(11):2076-83.
- Inglese, J, WJ Koch, MG Caron, und RJ Lefkowitz. „Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases.“ *Nature*, Sep. 1992: 359(6391):147-50.
- International Agency for research on cancer; WHO; GLOBOCAN. *Factsheets*. 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> (Zugriff am 2013).
- Iwamura, T, T Katsuki, und K Ide. „Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing cardioembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9.“ *Jpn J Cancer Res.*, Jan. 1987: 78(1):54-62.
- Jelluma, N, et al. „Msp1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment.“ *Cell*, Jan. 2008: 132(2):233-46.
- Jemal, A, MM Center, C DeSantis, und EM Ward. „Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends.“ *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, Aug. 2010: 19(8):1893-907.
- Kahn, B. B, und J. S Flier. „Obesity and insulin resistance.“ *J. Clin. Invest.*, 2000: 106:473-481.
- Kalitsis, P, E Earle, KJ Fowler, und KH Choo Murdoch. „Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis.“ *Genes Dev.*, Sep. 2001: 14(18):2277-82.
- Klimstra, D.S, und D.S Longnecker. „K-ras mutation in pancreatic ductal proliferative lesions.“ *Am. J. Pathol.*, 1994: 145:1547-1550.
- Klimstra, DS, IR Modlin, D Coppola, RV Lloyd, und S Suster. „The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems.“ *Pancreas.*, Aug. 2010: 39(6):707-12.
- Köenig, A, et al. „NFAT-induced histone acetylation relay switch promotes c-Myc-dependent growth in pancreatic cancer cells.“ *Gastroenterology*, Mar. 2010: 138(3):1189-99.
- Kohout, TA, und RJ Lefkowitz. „Regulation of G protein-coupled receptor kinase and arrestins during receptor desensitization.“ *Mol Pharmacol.*, Jan. 2003: 63(1):9-18.

- Kolonel, L, und L Wilkens. „Migrant studies. Cancer epidemiology and prevention.“ *Oxford University Press.*, 2006: 189-201.
- Kong, G, R Penn, und J.L Benovic. „A beta-adrenergic receptor kinase dominant negative mutant attenuates desensitization of the beta 2-adrenergic receptor.“ *J Biol Chem.*, 1994: 269:13084-13087.
- Konrad, A, R Jochmann, E Kuhn, E Naschberger, P Chudasama, und M Stürzl. „Reverse transfection microarray in infectious disease research.“ *Methods Mol. Biol.*, 2011: 706:107-118.
- Koorstra, JB, G Feldmann, N Habbe, und A Maitra. „Morphogenesis of pancreatic cancer: role of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanINs).“ *Langenbecks Arch Surg.*, Jul. 2008: 393(4):561-70.
- Korc, M, B Chandrasekar, Y Yamanaka, H Friess, Buchier, M, und HG Beger. „Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increased in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. “ *J. Clin. Invest.*, 1992: 90:1352-1360.
- Krupnick, JG, und JL Benovic. „The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation.“ *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 1998: 38:289-319.
- Kunapuli, P, und JL Benovic. „Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family.“ *Proc. Natl Acad Sci USA*, Jun. 1993: 90(12):5588-92.
- Kushner, S.R, H.W Boyer, und S Nicosia. „An improved method for transformation of Escherichia coli with Co/EI derived plasmid.“ *Genetic Engineering*, 1978: 17-23.
- Lal, G, et al. „Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germline p16, BRCA1, and BRCA2 mutations.“ *Cancer Res.*, Jan. 2000: 60(2):409-416.
- Le Maréchal, C, et al. „Two novel severe mutations in the pancreatic secretory trypsin inhibition gene (SPINK1) cause familial and/or hereditary pancreatitis.“ *Hum Mutat.*, Feb. 2004: 23(2):205.
- Lefkowitz, RJ, MJ Stadel, und MG Caron. „Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization.“ *Annu Rev Biochem.*, 1983: 52:159-86.
- Lefkowitz, RJ, und EJ Whalen. „Beta-arrestins: traffic cops of cell signaling.“ *Curr Opin Cell Biol*, Apr. 2004: 16(2):162-8.
- Lehrach, H, et al. „Hybridization fingerprinting in genome mapping and sequencing.“ In *Genome Analysis Vol 1: Genetic and Physical Mapping.*, pp39-81. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press., 1990.
- Leng, M, DW Chan, H Luo, C Zhu, und J Qin. „MSP1-dependent mitotic BLM phosphorylation is important for chromosome stability.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, Aug. 2006: 103(31):11485-90.
- Lieber, M, J Mazzeita, W Nelson-Rees, M Kaplan, und G Todaro. „Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas.“ *Int J Cancer.*, May 1975: 15(5):741-7.
- Lippicott-Schwartz, J, und GH Patterson. „Development and use of fluorescent protein markers in living cells.“ *Science*, 2003: 300:87-91.
- Liu, ST, GK Chan, JC Hittle, G Fujii, E Lees, und TJ Yen. „Human Msp1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores.“ *Mol Biol Cell*, Apr. 2003: 14(4):163851.

- Livak, KJ, und TD Schmittgen. „Analysis of relativ gene expression data using real-Time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method.“ *Methods*, Dec. 2001: 25(4):402-8.
- Lodowski, DT, JA Pitcher, WD Capel, RJ Lefkowitz, und JJ Tesmer. „Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma.“ *Science*, May 2003: 23:300(5623):1256-62.
- Lohr, M, G Kloppel, P Maisonneuve, AB Lowenfels, und J Luttges. „Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis.“ *Neoplasia*, Jan. 2005: 7:17-23.
- Lohse, MJ. „Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization.“ *Biochim Biophys Acta*, Nov. 1993: 1179(2):171-88.
- Lombillo, VA, C Nislow, TJ Yen, VI Gelfand, und JR McIntosh. „Antibodies to the kinesin motor domain and CENP-E inhibit microtubule depolymerization-dependent motion of chromosomes in vitro.“ *J Cell Biol.*, Jan. 1995: 128(1-2):107-15.
- Lowenfels, AB, et al. „Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer.“ *J Natl Cancer Inst.*, Mar. 1997: 89(6):442-6.
- Lowenfels, AB, und P Maisonneuve. „Epidemiology and prevention of pancreatic cancer.“ *Jpn J Clin Oncol.*, May 2004: 34(5):238-44.
- Luo, J, WB Isaacs, JM Trent, und DJ Duggan. „Looking beyond morphology: cancer gene expression profiling using DNA microarrays.“ *Cancer Invest.*, 2003: 21(6):937-49.
- Luzhna, L, P Kathiria, und O Kovalchuk. „Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond.“ *Front Genet.*, Jul. 2013: 4:131.
- Lymperopoulos, A, G Rengo, und WJ Koch. „Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy.“ *Circ Res.*, Aug. 2013: 113(6):739-53.
- Lynch HT, Brand, RE, et al. „Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic syndrome.“ *Cancer*, Jan. 2002: 94(1):84-96.
- Maciejowski, J, KA George, ME Terret, C Zhang, KM Shokat, und PV Jallepalli. „Msp1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complex during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling.“ *J Cell Biol.*, Jul. 2010: 190(1):89-100.
- Magdalena, Szumilas. „Explaining Odds Ratio.“ *J Can Acad*, Aug. 2010: 19(3):227-229.
- Maitra, A, et al. „Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray.“ *Mod Pathol.*, Sep. 2003: 16(9):902-12.
- Malvezzi, M, P Bertuccio, F Levi, C La Vecchia, und E Negri. „European cancer mortality predictions for the year 2013.“ *Ann Oncol.*, Mar. 2013: 24(3):792-800.
- Mannherz, Otto, Daniel Mertens, Meinhard Hahn, und Peter Lichter. „Functional screening for proapoptotic genes by reverse transfection cell array technology.“ *Genomic*, May 2006: 665-672.
- Manning, G, DB Whyte, R Martinez, T Hunter, und S Sudarsanam. „The protein kinase complement of the human genome.“ *Science*, Dec. 2002: 298(5600):1912-34.
- Mantovan, i A, P Allavena, A Sica, und F Balkwill. „Cancer-related inflammation.“ *Nature*, Jul. 2008: 24:454(7203):436-44.

- Mapelli, M, und A Musaccio. „MAD contortions: conformational dimerization boost spindle checkpoint signaling.“ *Curr Opin Struct Biol.*, Dec. 2007: 17(6):716-25.
- Maser, R S, und DePinho R A. „Connecting chromosomes, crisis, and cancer.“ *Science*, 2002: 297:565-569.
- Massagué, J, SW Blain, und RS Lo. „TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders.“ *Cell*, Oct. 2000: 103(2):295-309.
- Mateuca, R, N Lombaert, PV Aka, I Decordier, und M Kirsch-Volders. „Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring.“ *Biochemistry*, Nov. 2006: 88(1):1515-31.
- Matuzany-Ruban, A, M Golan, N Miroshnik, G Schreiber, und S Avissar. „Normalization of GRK2 protein and mRNA measures in patients with depression predict response to antidepressants.“ *Int J Neuropsychopharmacol.*, Feb. 2010: 13(1):83-91.
- Métayé, T, P Levillain, JL Kraimps, und R Perdrisot. „Immunohistochemical detection, regulation and antiproliferative function of G-protein-coupled receptor kinase 2 in thyroidcarcinomas.“ *J Endocrinol.*, 2008: 198(1):101-10.
- Michl, P, et al. „Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin.“ *Gastroenterology*, Sep. 2001: 121(3):678-84.
- Mills, GB, et al. „Expression of TTK, anovel human protein kinase, is associated with cell proliferation.“ *J. Biol. Chem.*, Aug. 1992: 267(22):16000-6.
- Moore, PS, et al. „Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4.“ *Virchows Arch.*, Dec. 2001: 439(6):798-802.
- Mossmann, T. „Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. “ *J Immunol Methods*, Dec. 1983: 65(1-2):55-63.
- Mueller, F, et al. „KOC is a novel molecular indicator of malignancy.“ *British Journal of Cancer*, Mar. 2003: 88:699-701.
- Neessee, A, M Wagner, V Ellenrieder, M Bachem, TM Gress, und M Buchholz. „Pancreatic stellates cells potentiate proinvasive effects of Serpine 2 expression in pancreatic xenografts tumors.“ *Pancreatology*, Aug 2007: 7(4) 380-385.
- Neves, SR, TP Ram, und R Iyengar. „G protein pathways.“ *Science*, May 2002: 296(5573):1636-9.
- Niittymäki, I, et al. „High frequency of TTK mutations in microsatellite-unstable colorectal cancer and evaluation oh theri effect on spindle assembly checkpoint.“ *Carcinogenesis*, Mar. 2011: 32(3):305-11.
- Nijenhuis, W, et al. „A TPR domain-containing N-terminal module of Msp1 is required for its kinetochore localization by Aurora B.“ *J Cell Biol.*, Apr. 2013: 201(2):217-31.
- Ojajärvi, A, et al. „Risk of Pancreatic Cancer in Workers Exposed to Chlorinated Hydrocarbon Solvents and Related Compound: A Meta-Analysis.“ *Am J Epidemiol.*, May 2001: 153(9):841-50.
- Ouyang, B, JA Knauf, K Ain, B Nacev, und JA Fagin. „Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BUBR1.“ *Clin Endocrinol (Oxf).*, Mar. 2002: 56(3):341-50.
- Overholser, JP, MC Prewett, AT Hooper, HW Waksal, und DJ Hicklin. „Epidermal growth factor receptor blockade by antibody IMC-C225 inhibits growth of a human pancreatic carcinoma xenograft in nude mice.“ *Cancer*, Jul. 2000: 89(1):74-82.

- Palmer, Ella, und Tom Freeman. „Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays.“ *Comparative and Functional Genomics*, March 2004: 5:342-353.
- Parkin, DM, L Boyd, und LC Walker. „The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010.“ *Br J Cancer*, Dec. 2010: 105 Suppl 2:S77-81.
- Penela, P, V Rivas, A Salcedo, und F Jr Mayor. „G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) modulation and cell cycle progression.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, Jan. 2010: 107(3):1118-23.
- Perbal, B. *A practical guide to molecular cloning*. New York: John Wiley and Sonc Inc, 1988.
- Pickartz, T, J Mayerle, und MM Lerch. „Autoimmune pancreatitis.“ *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* , Jun. 2007: 4(6):314-23.
- Pitcher, J, M J Lohse, J Codina, M G Caron, und R J Lefkowitz. „Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase c occurs via distinct molecular mechanisms.“ *Biochemistry*, 1992: 31:3193-7.
- Pitcher, J.A, N.J Freedman, und R.J Lefkowitz. „G protein-coupled receptors kinases.“ *Annu Rev Biochem.*, 1998: 67:653-692.
- Pitcher, JA, et al. „Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate(PIP2)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure and regulation of the PIP2 binding site distinguishes the GRK subfamilies.“ *J Biol Chem.*, 1996: 271:24907.
- Portsmann, T, und T, Ayrameas, S Ternynck. „Quantitation of 5-bromo-2-deoxyridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response.“ *J Immunol Methods*, Sep. 1985: 82(1):169-79.
- Pour, PM, et al. „Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease.“ *Cancer*, 1981: 47:1573-87.
- Premont, RT, et al. „Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants.“ *J Biol Chem*, Mar. 1996: 15:271(11):6403-10.
- Rajala, M.W, und P.E Scherer. „Minireview: the adipocyte - at the crossroads of energy homeostasis, infammation, and atherosclerosis.“ *Endocrinology*, 2003: 144:3765-3773.
- Reiter, E, und RJ Lefkowitz. „GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling.“ *Trends Endocrinol Metab.*, 2006: 17(4):159-65.
- Ribas, C, et al. „The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling.“ *Biochem Biophys Acta*, Apr. 2007: 1768(4):913-22.
- Rieder, CL, und H Maiato. „Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint.“ *Dev. Cell*, Nov. 2004: 7(5):637-51.
- Rigby, AS. „Statistical methods in epidemiology. III. The odds ratio as an approximation to the relative risk.“ *Disabbil Rehabil.*, Apr. 1999: 21(4):145-51.
- Rockman, HA, et al. „Control of myocardial contractile fundtion by the level of beta-adrenergic receptor kinasel in gene-targeted mice.“ *J Biol Chem.*, Jul. 1998: 273:18180-18184.

- Roth, N. S, P. T. Campbell, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, und M. J. Lohse. „Comparativ rates of desensitization of beta-adrenergic receptor kinase and the cyclin AMP-dependent protein kinase.“ *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991: 88:6201-4.
- Rozenblum, E, et al. „Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.“ *Cancer Res.*, May 1997: 57:1731-1734.
- Saeki, A, et al. „Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma.“ *Cancer*, Apr. 2002: 94(7):2047-54.
- Santaguida, S, A Tighe, AM D'Alise, SS Taylor, und A Musacchio. „Dissecting the role of MSP1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibition reversine.“ *J Cell Biol.*, Jul. 2010: 190(1):73-87.
- Santaguida, S, C Vernieri, F Villa, A Ciliberto, und A Musacchio. „Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signaling independently of error correlation.“ *EMBO J*, Apr. 2011: 30(8):1508-19.
- Santaguida, S, und A Mussachio. „The life and miracles of kinetochores.“ *EMBO J*, Sep. 2009: 28(17):2511-31.
- Sato, N, N Fukushima, RH Hrubá, und M Goggins. „CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia.“ *Mod Pathol.*, Mar. 2008: 21(3):238-44.
- Saurin, AT, MS van der Waal, RH Medema, SM Lens, und GJ Kops. „Aurora B potentiates Msp1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis.“ *at Nat Commun.*, kein Datum: 2:316.
- Schena, M, D Shalon, RW Davis, und PO Brown. „Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.“ *Science*, Oct. 1995: 270(5235):467-70.
- Schmitt, CA, et al. „A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy.“ *Cell*, Mar. 2002: 109(3):335-46.
- Schutte, M, et al. „DPC4 gene in various tumor types.“ *Cancer Res.*, 1996: 56:2527-2530.
- Sears, DA, und MM Udden. „Howeell-Jolly bodies: a brief historical review.“ *Am J Med Sci.*, May 2012: 343(5):407-9.
- Sengupta, S, et al. „BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination.“ *EMBO J*, Mar. 2011: 22(5):1210-22.
- Shan, Q, et al. „A cancer/testis antigen microarray to screen autoantibody biomarkers of non-small cell lung cancer.“ *Cancer Lett.*, Jan. 2013: 328(1):160-7.
- Shih, SC, et al. „The L6 protein TM4SF1 is critical for endothelial cell function and tumor angiogenesis.“ *Cancer Res.*, Apr. 2009: 69(8):3272-7.
- Sibilia, M, et al. „The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development.“ *Cell*, 2000: 102:211-220.
- Sihn, C.-R., E.-J. Suh, K.-H. Lee, T.-Y. Kim, und S.-H Kim. „p55CDC/hCD20 mutant induces mitotic catastrophe by inhibiting the Mad-2-dependent spindle checkpoint activity in tumor cells.“ *Cancer Lett.*, 2003: 2001:203-210.
- Silverman, D T, et al. „Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer.“ *Br J Cancer.*, Aug. 1999: 80(11): 1830–1837.
- Simpson, J.C., R. Wellenreuther, A. Poustka, R Pepperkok, und Wiemann, S. „Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large scale cDNA sequencing.“ *EMBO Rep.*, 2000: 1:287-292.



- Sliedrecht, T, C Zhang, KM Shokat, und GJ Kops. „Chemical genetic inhibition of Msp1 in stable human cell lines reveal aspects of Msp1 function in mitosis.“ *Plos One*, Apr. 2010: 5(4):e10251.
- Stiewe, T. „The p53 family in differentiation and tumorigenesis.“ *Nat Rev Cancer*, Mar. 2007: 7(3):165-8.
- Stoffel, RH, RR Randall, RT Premont, RJ Lefkowitz, und J Inglese. „Palmitoylation of G protein-coupled receptors kinase, GRK6. Lipid modification diversity in the GRK family.“ *J Biol Chem.*, 1994: 269(45):27791-4.
- Stony, Brook. „Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors.“ *Front Biosci.*, May 2004: 9:1048-58.
- Suo, WZ, und L Li. „Dysfunction of G protein-coupled receptors kinase in Alzheimer`s disease.“ *Scientific World Journal*, Aug. 2010: 10:1667-78.
- Takahashi, T, et al. „Identification of frequent impaired of the mitotic checkpoint and molecular analysis of the mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and p55CDC, in human lung cancers.“ *Oncogene*, Jul. 1999: 18(30)4295-300.
- Tan, MH, et al. „Characterization of a new primary human pancreatic tumor line.“ *Cancer Invest.* , 1986: 4(1):15-23.
- Tanaka, M, et al. „International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of pancreas.“ *Pancreatology*, 2006: 6(1-2)17-32.
- Taylor, SS, und F McKeon. „Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage.“ *Cell*, May 1997: 89(5):727-35.
- Tesmer, JJ. „Structure and function of regulator of G protein signaling homology domains.“ *Prog Mol Biol Transl Sci.*, 2009: 86:75-113.
- Tipton, AR, et al. „Monopolar Spindle 1 (Msp1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) and assembly of the Mitotic Checkpoint Complex.“ *J Biol Chem.*, Oct. 2013: M113.522375.
- Tipton, AR, M Tipton, T Yen, und ST Liu. „Closed MAD2 (C-MAD2) is selectively incorporated into the mitotic checkpoint complex (MCC).“ *Cell Cycle*, Nov. 2011: 10(21):3740-50.
- Ungerer, M, M Böhm, JS Elce, E Erdmann, und MJ Lohse. „Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart.“ *Circulation*, Feb. 1993: 87(2):454-63.
- van der Waal, MS, et al. „Msp1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B.“ *EMBO Rep.*, Sep. 2012: 13(9):847-54.
- Van Heek, NT, et al. „Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia.“ *Am j Pathol.*, 2002: 161:1541-1547.
- Venter, JG, et al. „The sequence of the human genome.“ *Science*, Feb. 2001: 292(5523):1304-1351.
- Vilá, MR, J Lloreta, MH Schüssler, G Berrozpe, S Welt, und F.X Real. „New pancreas cancer lines that represent distinct stages of ductal differentiation.“ *Lab. Invest.*, Apr. 1995: 72(4):395-404.
- Vinge, L. E., E. Oie, Y. Andersson, H. K. Groggaard, G. Andersen, und H. Attramadal. „Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats.“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2001: 281:H2490-9.

- Wagner, M, et al. „Expression of a truncated EGF receptor is associated with inhibition of pancreatic cancer cell growth and enhanced sensitivity to cisplatinum.“ *Int J Cancer*. , Dec. 1996: 11;68(6):782-7.
- Wang, F, NP Ulyanova, MS van der Waal, D Patnaik, SM Lens, und JM Higgins. „A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis.“ *Curr Biol.*, Jun. 2011: 21(12):1061-9.
- Wang, W, et al. „Structural and mechnistic insights into Msp1 kinase activation.“ *J Cell Mol Med.*, Aug. 2009: 13(8b):1679-94.
- Wang, XW, et al. „Functional interaction of p53 and BLM DNA helicase in apoptosis.“ *J Biol Chem.* 2001 Aug , Aug. 2001: 276(35):32948-55.
- Wang, Y, JY Shyy, und S Chien. „Fluorescence protein, live-cell imaging, and mechanobiology: seeing is believing.“ *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2008: 10:1-38.
- Watanabe, M, A Nobuta, J Tanaka, und M Asaka. „An effect of K-ras gene mutation on epidermal growth factor receptor signal transduction in PANC-1 pancreatic carcinoma cells.“ *Int. J. Cancer*, 1996: 67:264-268.
- Wei, JH, et al. „TTK/hMsp1 participates in the regulation of ddamage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonin 68.“ *J Biol Chem.*, Mar. 2005: 280(9):7748-57.
- Wei, Z, R Hurtt, M Ciccarelli, WJ Koch, und C Doria. „Growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by overexpression of G-protein-coupled receptor kinase 2.“ *J Cell Physiol.*, Jun. 2012: 227(6):2371-7.
- Weiss, ER, et al. „The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas.“ *Mol Vis*, 1998: 4:27.
- Weitzel, DH, und DD Vandr . „Differential spindle assembly checkpoint response in human lung adenocarcinoma cells.“ *Cell Tissue Res.*, Apr. 2000: 300(1):57-65.
- Whelan, AJ, D Bartsch, und PJ Goodfellow. „Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene.“ *N Engl J Med.*, Oct. 1995: 333(15):975-7.
- WHO, IARC, und FT Bosman. *WHO classification of tumours of the degistive system*. France, Lyon: IARC Press, 2010.
- WHO, S.R Hamilton, und L.A Aaltonen. *Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. France, Lyon: IARC Press, 2000.
- Wilentz, RE, et al. „Immunohistochemical labeling for dpc4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas : a new marker of DPC4 inactivation.“ *Am J Pathol.* , Jan. 2000: 156(1):37-43.
- . „Inactivation of the p16 (INK4A) tumor supressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression.“ *Cancer Res.*, 1998: 58:4740-4.
- Winey, M, L Goetsch, P Baum, und B Byers. „MSP1 and MSP2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication.“ *J Cell Biol.*, Aug. 1991: 114(4):745-54.
- World Health Organization. *Ten statistical highlights in global public health. World health statistics 2007*. Geneva: WHO, 2007.
- Xia, G, X Luo, T Habu, J Rizo, T Matsumoto, und H Yu. „Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint.“ *EMBO J*, Aug. 2004: 23(15):3133-43.

- 
- Yamaguchi, K, K Yokohata, H Noshiro, K Chijiwa, und M Tanaka. „Mucinous cystic neoplasm of the pancreas or intraductal papillary-mucinous tumour of the pancreas.“ *Eur J Surg.*, 2000: 166(2):141-8.
- Yamamoto, H, et al. „Genetic and clinical features of human pancreatic ductal adenocarcinomas with widespread microsatellite instability.“ *Cancer Res.*, Apr. 2001: 61(7):3139-44.
- Young, D, G Waitches, C Birchmeier, O Fasano, und M Wigler. „Isolation and characterization of new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains.“ *Cell*, Jun. 1986: 45(5):711-9.
- Zaiuddin, Junaid, und David M Sabatini. „Microarray of cells expressing defined cDNAs.“ *Nature*, May 2001: 411:107-110.
- Zamboni, G, K Hirabayashi, P Castelli, und AM Lennon. „Precancerous lesions of the pancreas.“ *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* , Apr. 2013: 27(2):299-322.
- Zhang, F, M Mönkkönen, S Roth, und M Laiho. „TGF-induced G(1) cell cycle arrest requires the activity of the proteasome pathway.“ *Exp. Cell Res.*, Dec. 2002: 281(2):190-6.
- Zhang, Jie, Chuanhai Fu, Yong Miao, Zhen Dou, und Xuebiao Yao. „Protein kinase TTK interacts and co-localizes with CENP-E to the kinetochore of human cells.“ *Sci Bull*, 2002: 27:213-9.
- Zur Hausen, H. „Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells.“ *J. Virol.*, 1967: 1(6):1174-85.

## 8. Anhang

**Tabelle 7: Liste der 79 Kandidatengene und Kontrollen inklusive der 12 PaCa/Net-Kandidaten sortiert nach dem Expressionsmuster im Pankreasgewebe.**

|   | <b>Genkurzzeichen:</b> | <b>Bezeichnung:</b>  | <b>Gen ID (RefSeq):</b> |
|---|------------------------|--|-------------------------|
| <b>überexprimiert im Pankreaskarzinom</b> | <i>ADRBK1</i>          | <i>adrenergic, beta, receptor kinase 1</i>                                       | NM_001619               |
|   | <i>AMF/GPI</i>         | <i>glucose phosphate isomerase</i>   | NM_000175               |
|   | <i>AMFR</i>            | <i>autocrine motility factor receptor</i>  | NM_001144               |
|   | <i>Amplaxin/CTTN</i>   | <i>cortactin</i>   | NM_005231               |
|   | <i>ANXA2</i>           | <i>Lipocortin 2, ANXA2, annexin A2</i>   | NM_004039               |
|   | <i>CCL14</i>           | <i>chemokine (C-C motif) ligand 14</i>   | NM_004166               |
|   | <i>CFL1</i>            | <i>cofilin 1 (non-muscle)</i>  | NM_005507               |
|   | <i>CLDN7</i>           | <i>Claudin 7</i>   | NM_001307               |
|   | <i>CNK/CNKSR1</i>      | <i>connector enhancer of kinase suppressor of Ras 1</i>                          | NM_006314               |
|   | <i>CNR2</i>            | <i>cannabinoid receptor 2 (macrophage)</i>                                       | NM_001841               |
|   | <i>COPEB/KLF6</i>      | <i>Kruppel-like factor 6</i>   | NM_001300               |
|   | <i>CPNE1</i>           | <i>copine 1</i>  | NM_003915               |
|   | <i>CRABP1</i>          | <i>cellular retinoic acid binding protein 1</i>                                  | NM_004378               |
|   | <i>CTSE</i>            | <i>Cathepsin E</i>   | NM_001910               |
|   | <i>DDR1</i>            | <i>discoidin domain receptor family, member 1</i>                                | NM_001954               |
|   | <i>EDNRA</i>           | <i>endothelin receptor type A</i>  | NM_001957               |
|   | <i>ELF3</i>            | <i>E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial)</i>           | NM_004433               |
|   | <i>FASTK</i>           | <i>Fas-activated serine/threonine kinase</i>                                     | NM_006712               |
|   | <i>G2AN/GANAB</i>      | <i>glucosidase, alpha; neutral AB</i>  | NM_198334               |
|   | <i>GSPT1</i>           | <i>G1 to S phase transition 1</i>  | NM_002094               |
|   | <i>H1F0</i>            | <i>H1 histone family, member 0</i>   | NM_005318               |
|   | <i>LGALS3</i>          | <i>lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)</i>                      | NM_002306               |
|   | <i>MAP3K11</i>         | <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11</i>                         | NM_002419               |
|   | <i>MARVELD1</i>        | <i>MARVEL domain containing 1</i>  | NM_031484               |
|   | <i>NFATC1</i>          | <i>nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1</i> | NM_006162               |
|   | <i>NKX2-5</i>          | <i>NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)</i>                    | NM_004387               |
|   | <i>PCTK1</i>           | <i>PCTAIRE protein kinase 1</i>  | NM_033018               |
|   | <i>PPM1G</i>           | <i>protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent</i>                 | NM_002707               |

|   |  |   |           |
|---|--|---|-----------|
|   | <i>PPP2R1A</i>                         | <i>protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform</i>   | NM_014225 |
|   | <i>PPP2R4</i>                          | <i>protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53)</i>                              | NM_021131 |
|   | <i>PROC</i>                            | <i>protein C (inactivator of coagulation factors Va and VIIIa)</i>                        | NM_000312 |
|   | <i>PRSS25/HTRA2</i>                    | <i>HtrA serine peptidase 2</i>  | NM_013247 |
|   | <i>SDC1</i>                            | <i>syndecan 1</i>   | NM_002997 |
|   | <i>SPINT2</i>                          | <i>serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2</i>   | NM_021102 |
|   | <i>TAPBP</i>                           | <i>TAP binding protein (tapasin)</i>  | NM_003190 |
|   | <i>TM4SF1</i>                          | <i>transmembrane 4 L six family member 1</i>  | NM_014220 |
|   | <i>UNC84B</i>                          | <i>unc-84 homolog B (C. elegans)</i>  | NM_015374 |
|   | <i>UNG</i>                             | <i>uracil-DNA glycosylase</i>   | NM_003362 |
| unterexprimiert im Pankreaskarzinom     | <i>ATF3</i>                            | <i>activating transcription factor 3</i>  | NM_001674 |
|   | <i>BCKD/BCKDK</i>                      | <i>branched chain ketoacid dehydrogenase kinase</i>                                       | NM_005881 |
|   | <i>CCL2</i>                            | <i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>   | NM_002982 |
|   | <i>CHUK</i>                            | <i>conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>                                       | NM_001278 |
|   | <i>DUSP1</i>                           | <i>dual specificity phosphatase 1</i>   | NM_004417 |
|   | <i>EBI2</i>                            | <i>Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)</i> | NM_004951 |
|   | <i>EDG6</i>                            | <i>endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 6</i>   | NM_003775 |
|   | <i>FRA-2, FOSL2</i>                    | <i>FOS-like antigen 2</i>   | NM_005253 |
|   | <i>GTF2F2</i>                          | <i>general transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa</i>                             | NM_004128 |
|   | <i>PTPN2</i>                           | <i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2</i>                                  | NM_002828 |
|   | <i>STK12/AURKB</i>                     | <i>aurora kinase B</i>  | NM_004217 |
| <i>ZNF22</i>                            | <i>zinc finger protein 22 (KOX 15)</i> | NM_006963   |           |
| spezifisch exprimiert in PanIN-Läsionen | <i>AGR2</i>                            | <i>anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)</i>                                       | NM_006408 |
|   | <i>C8orf20/REEP4</i>                   | <i>receptor accessory protein 4</i>   | NM_025232 |
|   | <i>CDC37</i>                           | <i>CDC37 cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)</i>                               | NM_007065 |
|   | <i>CST3</i>                            | <i>cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)</i>                            | NM_000099 |
|   | <i>CYP4F12</i>                         | <i>cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12</i>                             | NM_023944 |
|   | <i>FOXA3</i>                           | <i>forkhead box A3</i>  | NM_004497 |
|   | <i>GPRC5A</i>                          | <i>G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A</i>                            | NM_003979 |
|   | <i>IFI27</i>                           | <i>interferon, alpha-inducible protein 27</i>   | NM_005532 |
|   | <i>IL13RA1</i>                         | <i>interleukin 13 receptor, alpha 1</i>   | NM_001560 |
|   | <i>LGALS4</i>                          | <i>lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)</i>                               | NM_006149 |
|   | <i>PLAC8</i>                           | <i>placenta-specific 8</i>  | NM_016619 |

|   |                       |  |                    |
|---|-----------------------|--|--------------------|
|   | <i>POLR3K</i>         | <i>polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa</i>                                   | NM_016310          |
|   | <i>RAB34</i>          | <i>RAB34, member RAS oncogene family</i>   | NM_031934          |
|   | <i>RABAC1</i>         | <i>Rab acceptor 1 (prenylated)</i>   | NM_006423          |
|   | <i>S100P</i>          | <i>S100 calcium binding protein P</i>  | NM_005980          |
|   | <i>SQLE</i>           | <i>squalene epoxidase</i>  | NM_003129          |
|   | <i>TFF1</i>           | <i>trefoil factor 1</i>  | NM_003225          |
| <b>Kontrollgene mit bekannter Funktion</b>              | <i>BCL-10</i>         | <i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>  | NM_003921          |
|   | <i>BIRC5</i>          | <i>baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)</i>  | NM_001168          |
|   | <i>CCND1</i>          | <i>CyclinD1</i>  | NM_053056          |
|   | <i>CLDN4</i>          | <i>Claudin 4</i>   | NM_001305          |
|   | <i>KCMF1</i>          | <i>potassium channel modulatory factor 1</i>   | NM_020122          |
|   | <i>MMP2</i>           | <i>matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)</i>        | NM_004530          |
|   | <i>PAI-1/SERPINE1</i> | <i>serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i> | NM_000602          |
|   | <i>PLAU</i>           | <i>plasminogen activator, urokinase</i>  | NM_002658          |
|   | <i>Rab20</i>          | <i>RAB20, member RAS oncogene family</i>   | NM_017817          |
|   | <i>Smac/DIA BLO</i>   | <i>diablo homolog (Drosophila)</i>   | NM_019887          |
|   | <i>TGFBR1 (c.a.)</i>  | <i>transforming growth factor, beta receptor I (constitutive active)</i>                             | mutant             |
|   | <i>TGFBR2 (d.n.)</i>  | <i>transforming growth factor, beta receptor II (dominant negative)</i>                              | mutant             |
|   | <i>TIMP2</i>          | <i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>  | NM_003255          |
|   | <i>XIAP/BIRC4</i>     | <i>baculoviral IAP repeat-containing 4</i>   | NM_001167          |
| <b>PaCaNet- Gene Überexprimiert im Pankreaskarzinom</b> | <i>CDC20</i>          | <i>cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i>  | NM_001255.2        |
|   | <i>MAPRE2</i>         | <i>microtubuli-associated protein, RP/EB family, member 2</i>  | NM_00114382<br>6.1 |
|   | <i>PKM2</i>           | <i>pyruvate kinase, muscle 2</i>   | NM_00120679<br>6.1 |
|   | <i>TSG101</i>         | <i>tumor susceptibility gene 101</i>   | NM_006292.3        |
|   | <i>NT5E</i>           | <i>5'-nucleotidase, ecto (CD73)</i>  | NM_00120481<br>3.1 |
|   | <i>EZH2</i>           | <i>enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>  | NM_00120324<br>7.1 |
|   | <i>MRE11A</i>         | <i>MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>                                      | NM_005590.3        |
|   | <i>SUV39H1</i>        | <i>suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)</i>  | NM_003173.2        |
|   | <i>RALB</i>           | <i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)</i>             | NM_002881.2        |
|   | <i>SRPK1</i>          | <i>SRSF protein kinase 1</i>   | NM_003137.4        |
|   | <i>PRKCZ</i>          | <i>protein kinase C, zeta</i>  | NM_00103358<br>1.1 |

|      |   |             |
|------|---|-------------|
| RRAS | <i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog</i> | NM_006270.3 |
|------|---|-------------|

**Tabelle 8: Liste der Kandidatengen-siRNS-Sequenzen geordnet entsprechend dem Expressionsmuster im Pankreasgewebe.**

| Gruppe: | Genebezeichnung: | Gene ID (RefSeq) | # siRNA: | Sequenz:             | Gruppe: | Genebezeichnung: | Gene ID (RefSeq) | # siRNA: | Sequenz:            |
|---------|------------------|------------------|----------|----------------------|---------|------------------|------------------|----------|---------------------|
| ÜE      | ADRBK1           | NM_001619        | 1        | GCAGUGUCAUGCAGAAGUA  | PanIN   | CYP4F12          | NM_023944        | 1        | GCACAUGGACUUUCUGUAU |
|         |                  |                  | 2        | GCUGGAGGCUCGCAAGAAA  |         |                  |                  | 2        | GAAUGUAGGCUUGCAGUGA |
|         |                  |                  | 3        | GCAAGUGCCUCUCCUCAAA  |         |                  |                  | 3        | CCAUUGCACCCAAGGAUAA |
|         |                  |                  | 4        | CAGCGUGCAUCGCAUCAUU  |         |                  |                  | 4        | UCCCAGGGCUUUACGGUAU |
| ÜE      | GPI              | NM_000175        | 1        | GGAAAUAUCAACCAAAUC   | PanIN   | FOXA3            | NM_004497        | 1        | CAGGGAACAUGUUUGAGAA |
|         |                  |                  | 2        | CAACCAAAGUGAAGGAGUU  |         |                  |                  | 2        | CCUCUAAGCUCUCCCUAUC |
|         |                  |                  | 3        | GAUGAUACCCUGUGACUUC  |         |                  |                  | 3        | GACCUUGAGUGAAAUCUAC |
|         |                  |                  | 4        | UCACGACGCUUCUACCAAU  |         |                  |                  | 4        | UAUUCCCGCUCUUUGCUUA |
| ÜE      | AMFR             | NM_001144        | 1        | GCAAGGAUCGAUUUGAAUA  | PanIN   | RAI3             | NM_003979        | 1        | GCAAUGGCUGAAAUCCAA  |
|         |                  |                  | 2        | GGAGCUGGCUGUCAACAAU  |         |                  |                  | 2        | CAAAGACUAUGAAGUAAAG |
|         |                  |                  | 3        | GAGGACUGCUC AUGUGAUU |         |                  |                  | 3        | GCUCAUGCUCUCCGACUUU |
|         |                  |                  | 4        | CGAGCUGGCUGCCGAGUUU  |         |                  |                  | 4        | GCGCUGACCUUCCUCAUGU |
| ÜE      | CTTN             | NM_005231        | 1        | GAACAAGACCGAAUGGAUA  | PanIN   | IFI27            | NM_005532        | 1        | AGUUGUGAUUGGAGGAGUU |
|         |                  |                  | 2        | GAAUAUCAGUCGAAACUUU  |         |                  |                  | 2        | CAACUGGACUCUCCGGAUU |
|         |                  |                  | 3        | GGACAGAGUUGAUCAGUCU  |         |                  |                  | 3        | CGGCUGUCAUUGCGAGGUU |
|         |                  |                  | 4        | ACAGAGAGAUUACUCCAAA  |         |                  |                  | 4        | GGCCAGGAUUGCUACAGUU |
| ÜE      | ANXA2            | NM_004039        | 1        | AGACCAAAGGUGUGGAUGA  | PanIN   | IL13RA1          | NM_001560        | 1        | GAAUACAUCUUGUUUCAUG |
|         |                  |                  | 2        | CUGUCAAAAGCCUAUACUAA |         |                  |                  | 2        | GGAAACUCGUCGUUCAUUA |
|         |                  |                  | 3        | CGACGAGGACUCUCUCAUU  |         |                  |                  | 3        | CCACAAUGAUGACCUAUAU |
|         |                  |                  | 4        | AUACUAACUUUGAUGCUGA  |         |                  |                  | 4        | CAAGAAAUGAGUAUAGGUA |
| ÜE      | CCL14            | NM_004166        | 1        | ACAAGUGGGUCCAGGACUA  | PanIN   | LGALS4           | NM_006149        | 1        | ACAUAGCUCUGCACAUUAA |
|         |                  |                  | 2        | UGGAUUACUAUGAGACCAA  |         |                  |                  | 2        | GCGAGCACAUGAAGCGGUU |
|         |                  |                  | 3        | CCUACAAGAUGCCGCGUCA  |         |                  |                  | 3        | GCUCGAAGAACCAUCAUCA |
|         |                  |                  | 4        | CGUCAGCGGAUUUGGAUU   |         |                  |                  | 4        | ACCCGACGCGCCUUACUA  |
| ÜE      | CFL1             | NM_005507        | 1        | UGACAGGGAUCAAGCAUGA  | PanIN   | PLAC8            | NM_016619        | 1        | GAACAAGCGUCGCAAUGAG |
|         |                  |                  | 2        | GCGGUGCUCUUCUGCCUGA  |         |                  |                  | 2        | GGAGAGCCAUUGCUACUUU |
|         |                  |                  | 3        | GUCAAGAUGCUGCCAGUAU  |         |                  |                  | 3        | CAGCUGAUUUGAAUGAUG  |
|         |                  |                  | 4        | GCUAUGCCCUUAUGAUGC   |         |                  |                  | 4        | UGCCAAAUCAAGAGAGUAU |
| ÜE      | CLDN7            | NM_001307        | 1        | UCCCUGCACUCCAUGUAUA  | PanIN   | POLR3K           | NM_016310        | 1        | GCGAACAUCCUCGUGCUUA |
|         |                  |                  | 2        | GCCAUCAGAUUGUCACAGA  |         |                  |                  | 2        | AGAAGUGGAUGAUGGCUU  |
|         |                  |                  | 3        | GUAGCUUGCUCUGGUAUG   |         |                  |                  | 3        | GCAGAUGAGCCGAUGACCA |
|         |                  |                  | 4        | UUUGAUCCCUACCAACAUU  |         |                  |                  | 4        | GCAAGGUAACAAAUCGGAA |
| ÜE      | CNKSR1           | NM_006314        | 1        | GACACACGCUCUACUGGUA  | PanIN   | RAB34            | NM_031934        | 1        | AGACUUGCCUCAUUAAUAG |
|         |                  |                  | 2        | GAGACGAGGUUGUCCAGAU  |         |                  |                  | 2        | AGAAGAAGCCCAUGUUG   |

|    |        |           |   |                      |           |           |              |   |                     |
|----|--------|-----------|---|----------------------|-----------|-----------|--------------|---|---------------------|
| ÜE | GSPT1  | NM_002094 | 1 | UGUAGAGACUGAUACCGUA  | Kontrolle | SERPIN E1 | NM_000602    | 1 | GCUAUGGGAUUCAAGAUUG |
|    |        |           | 2 | GGAUUACCGUUUAUCCAU   |           |           |              | 2 | GGAGCACGGUCAAGCAAGU |
| ÜE | GANAB  | NM_198334 | 1 | GAAGAUCUCUAUCCUAUG   | Kontrolle | MMP2      | NM_004530    | 1 | UACAACAGCGCACUGAUA  |
|    |        |           | 2 | CAUAUCGCCUCUACAAUUU  |           |           |              | 2 | GCAAACAGGACAUUGUAUU |
|    |        |           | 3 | GAUAGAAGCAACUUUAAGA  |           |           |              | 3 | ACAAGAACCAGAUACAUA  |
|    |        |           | 4 | GGGCUAACAUUGUACGCUA  |           |           |              | 4 | GACCAGAAUACCAUCGAGA |
| ÜE | FASTK  | NM_006712 | 1 | GCAAGGUGGUACAGAAGUU  | Kontrolle | KCMF1     | NM_020122    | 1 | GCUAUGGGCUGUGUAGAUA |
|    |        |           | 2 | GUUGGAAGCUGCUCUAAGC  |           |           |              | 2 | GCUCGUAGAUAACAUCGC  |
|    |        |           | 3 | CUUCAGAGCCCGCACUUU   |           |           |              | 3 | UCGCAGAUUAAGUGUUUA  |
|    |        |           | 4 | AAACGCAACUCAGCAGCAA  |           |           |              | 4 | GAGGCGAUCCUAUAUGU   |
| ÜE | ELF3   | NM_004433 | 1 | GAGCUCAGUUGGAUCAUUG  | Kontrolle | CLDN4     | NM_001305    | 1 | GGCUACAGGUAUUGGGCAU |
|    |        |           | 2 | GAAAGCUGAGCAAAGAGUA  |           |           |              | 2 | CCAUGGGGCUACAGGUAAU |
|    |        |           | 3 | GAACAAGUACGACGCAAGC  |           |           |              | 3 | GUACCAACUGCCUGGAGGA |
|    |        |           | 4 | GGACCAAACUCACGGACCA  |           |           |              | 4 | CAACAUCAUCCAAGACUUC |
| ÜE | EDNRA  | NM_001957 | 1 | GAACCGAUGUGAAUUAUUU  | Kontrolle | CCND1     | NM_053056    | 1 | GUUCGUGGCCUCUAAGAUG |
|    |        |           | 2 | GAAACCAGAAGGAUAUUUA  |           |           |              | 2 | CCGAGAAGCUGUGCAUCUA |
|    |        |           | 3 | GAACUGACCACCCUUAGAA  |           |           |              | 3 | GAACAGAAGUCGAGGAGG  |
|    |        |           | 4 | UCACAAGACUUUGGCGUA   |           |           |              | 4 | ACAACUUCUGUCCUACUA  |
| ÜE | DDR1   | NM_013994 | 1 | UGAAAGAGGUGAAGAUAU   | Kontrolle | BIRC5     | NM_001012270 | 1 | CAAAGGAAACCAACAAUAA |
|    |        |           | 2 | GGGACACCCUUUGCUGGUA  |           |           |              | 2 | GCAAAGGAAACCAACAAUA |
|    |        |           | 3 | GAAUGUCGCUUCCGGCGUG  |           |           |              | 3 | CACCGCAUCUCUACAUAUC |
|    |        |           | 4 | UGGUUACUCUUCAGCGAAA  |           |           |              | 4 | CCACUGAGAACGAGCCAGA |
| ÜE | CTSE   | NM_001910 | 1 | CAAGCUUACUGGCAGAUUG  | Kontrolle | BCL10     | NM_003921    | 1 | GCCACCAGAUCUACAGUUA |
|    |        |           | 2 | GAGCUUGUCCGGGAUCAUU  |           |           |              | 2 | GAAGAUUACAGAUGAAGUG |
|    |        |           | 3 | CCAAGUCUCUGUGGAAGGA  |           |           |              | 3 | GAAAUUCUUGUCGAAACAU |
|    |        |           | 4 | GAAUAACCGUGUGGGACUG  |           |           |              | 4 | GGGCAUCCACUGUCAUGUA |
| ÜE | CRABPI | NM_004378 | 1 | GAUCAGUUCUACAUCAAGA  | PanIN     | TFF1      | NM_003225    | 1 | AGAAGAGGAGUGUAAUUU  |
|    |        |           | 2 | GAAUUUAUGUCCGGGAAUG  |           |           |              | 2 | CCUCCAGUGUGCAAUAUA  |
|    |        |           | 3 | GGCCAACGAUGAACUUAUC  |           |           |              | 3 | GCCAGACAGAGACGUGUA  |
|    |        |           | 4 | GCAGGAGUUAGCCACUUG   |           |           |              | 4 | CAACACAGAUUGACUGCUC |
| ÜE | CPNE1  | NM_003915 | 1 | GAUCUGAGGUCAUCAAGAA  | PanIN     | SQLE      | NM_003129    | 1 | UAUUGAAGGUGUUGUGUUA |
|    |        |           | 2 | GGUCUCAGCUCAGGAAUUA  |           |           |              | 2 | UUUCAAAUCUGGUGGCGAA |
|    |        |           | 3 | CCAGAAACCUAGAUAAAGAA |           |           |              | 3 | CAAACUUGGUGGCGAAUGU |
|    |        |           | 4 | GGACAAUCGUGUAGUAACC  |           |           |              | 4 | GAGAUACAGUGGAAGGUCU |
| ÜE | COPEB  | NM_001300 | 1 | GCCUAGAGCUGGAACGUUA  | PanIN     | S100P     | NM_005980    | 1 | GGACUUCAGUGAGUUCAUC |
|    |        |           | 2 | GCAGGAAAGUUACACCAA   |           |           |              | 2 | ACAAGGAUGCCGUGGAUAA |
|    |        |           | 3 | UGCAAGAAGUGAUGAGUUA  |           |           |              | 3 | GCACGCAGACCCUGACCAA |
|    |        |           | 4 | AAAUUGAGCUCUCUGUCA   |           |           |              | 4 | GAAGGCAGACUCAAAUGA  |
| ÜE | CNR2   | NM_001841 | 1 | GAACGUGGUCUGUCUUAU   | PanIN     | RABAC1    | NM_006423    | 1 | CCUGUUACAUCUCUUAUCU |
|    |        |           | 2 | GGAAUCAUCUACACCUAUG  |           |           |              | 2 | GCAGAUGGAACCCGUGUGA |
|    |        |           | 3 | GCAUGCAGCUUUGUGAAUU  |           |           |              | 3 | GCAGAAGGACCAGCAGAAA |
|    |        |           | 4 | CCAACCCUAUGAAGGAUUA  |           |           |              | 4 | UACGCAACGUGGAGUACUA |
| ÜE | ÜE     | ÜE        | 3 | UGACAGAUCUGAGCAUGUG  | ÜE        | ÜE        | ÜE           | 3 | CAGGAGAGGUUCAAAUGCA |
|    |        |           | 4 | GGAGAGAAGUCCGCCAGU   |           |           |              | 4 | AGAAUGACCCUCCAGUGU  |



|    |         |           |   |                      |           |        |           |   |                      |
|----|---------|-----------|---|----------------------|-----------|--------|-----------|---|----------------------|
| ÜE | PRSS25  | NM_145074 | 1 | GAGCAUGCCUGACGUCUGG  | ÜE        | ITCH   | NM_031483 | 1 | GAAACUACAUGUUCAGAAA  |
|    |         |           | 2 | GAAGAAUUCUCCUCCGGA   |           |        |           | 2 | GAGAAGAAGGUUAGAUUA   |
| ÜE | PROC    | NM_000312 | 1 | GAAGCGCAGUACCCUGAAA  | ÜE        | EZH2   | NM_152998 | 1 | CAAAGAAUCUAGCAUCAUA  |
|    |         |           | 2 | GCAGUGAAGUCCCUUGUG   |           |        |           | 2 | GAGGACGGCUCCCAAUUA   |
|    |         |           | 3 | GCAGCGAGGUCAUGAGCAA  |           |        |           | 3 | GCUGAAGCCUCAUGUUUA   |
|    |         |           | 4 | GCAUAGAGGAGAUUCUGUGA |           |        |           | 4 | GAAUGGAAACAGCGAAGGA  |
| ÜE | PPP2R4  | NM_178003 | 1 | GAUGAAGACUGGCCCAUUU  | ÜE        | DAPK3  | NM_001348 | 1 | GAACAUUCCUGGAUUAAAG  |
|    |         |           | 2 | GAGUGUAUCCUGUUUAUUA  |           |        |           | 2 | CCACGCGUCUGAAGGAGUA  |
|    |         |           | 3 | CCACACAGUCCAGACAUG   |           |        |           | 3 | GAGCCAGGCCCGUAAAGUUC |
|    |         |           | 4 | GCGCAUUGACUACGGCACA  |           |        |           | 4 | GAGGAGUACUUCAGCAACA  |
| ÜE | PPP2R1A | NM_014225 | 1 | UAGACGAACUCCGCAUGA   | ÜE        | CDC20  | NM_001255 | 1 | GCACAGUUCGCGUUCGAGA  |
|    |         |           | 2 | AGGCCGAACUUCGACAGUA  |           |        |           | 2 | GGGCCGAACUCCUGGCAAA  |
|    |         |           | 3 | UCAAGGAGCUGGUGUCCGA  |           |        |           | 3 | GCAGAAACGGCUUCGAAAU  |
|    |         |           | 4 | UCAUAGACGAACUCCGCAA  |           |        |           | 4 | CGGAAGACCUGCCGUUACA  |
| ÜE | PPM1G   | NM_002707 | 1 | GAACUAGCACGCAUCAAGA  | Kontrolle | BIRC4  | NM_001167 | 1 | GAGGAGGGCUAACUGAUUG  |
|    |         |           | 2 | GGAGGAAGUUGCCUUGUAC  |           |        |           | 2 | GAGGAACCCUGCCAUUGAU  |
|    |         |           | 3 | GAGGGAAGCAGUUGAUUGU  |           |        |           | 3 | GCACGGAUCUUUACUUUUG  |
|    |         |           | 4 | GCUAUUGACGCCAAAUUGA  |           |        |           | 4 | GAACUGGGCAGGUUGUAGA  |
| ÜE | PCTK1   | NM_006201 | 1 | UGACACUACUCCAUUUUU   | Kontrolle | TIMP2  | NM_003255 | 1 | GAAGGAAUAUCUCAUUGCA  |
|    |         |           | 2 | UCACCAAGCUGUUGCAGUU  |           |        |           | 2 | CGACAUCGAGGACCCAUAA  |
|    |         |           | 3 | UAAAGGAGAUUCAGCUACA  |           |        |           | 3 | UAUGAGAUAACAGCAUAA   |
|    |         |           | 4 | CAUGAAAACUCCAUCUUC   |           |        |           | 4 | GUAAAAGUAAAACUGACGAU |
| ÜE | NKX2-5  | NM_004387 | 1 | ACAACAACUUCGUGAACUU  | Kontrolle | TGFB2  | NM_003242 | 1 | GAAUGACAUCUCGCUGUA   |
|    |         |           | 2 | CCUCAAUCCUACGGUUUAU  |           |        |           | 2 | GAACAUACACUAGAGACA   |
|    |         |           | 3 | CCGGGAUUCGCAGAGCAA   |           |        |           | 3 | CAACAACGGUGCAGUCAAG  |
|    |         |           | 4 | GCUACAAGUGCAAGCGGCA  |           |        |           | 4 | CGCGGAAGCUCAUGGAGUU  |
| ÜE | NFATC1  | NM_172390 | 1 | UCAGAAACUCCGACAUUGA  | Kontrolle | TGFB1  | NM_004612 | 1 | GGAGUUGGAUUGCUGAAUU  |
|    |         |           | 2 | GGACAGCUAUCCGGUCGUG  |           |        |           | 2 | GCUGAAAGUCUCUAUGUUA  |
|    |         |           | 3 | GUUGAGAUCGCCCAUUUC   |           |        |           | 3 | CAGCUAGGCUUACAGCAUU  |
|    |         |           | 4 | AGGAAGAACACCGGUUAC   |           |        |           | 4 | CUGAAAGUCUCUAUGUUA   |
| ÜE | MAP3K11 | NM_002419 | 1 | GCAUGCCACUCGACUUCAA  | Kontrolle | DIABLO | NM_019887 | 1 | UAGAAGAGCUCCGUCAGAA  |
|    |         |           | 2 | CUGGAGGACUCAAGCAAUG  |           |        |           | 2 | GCAGAUACAGGCCUCUAUAA |
|    |         |           | 3 | GAAGCCAGAAGCCAAAUAA  |           |        |           | 3 | CCGACAAUAUACAAGUUUA  |
|    |         |           | 4 | ACACUACACUGCACAGGAA  |           |        |           | 4 | GGAAACCACUUGGAUGACU  |
| ÜE | LGALS3  | NM_002306 | 1 | GAAGAAAGACAGUCGGUUU  | Kontrolle | RAB20  |           | 1 | GUGGAUAUACCAGUCAUA   |
|    |         |           | 2 | GCAAUACAAAGCUGGAUAA  |           |        |           | 2 | GAGCAAUUGUCUUUGAGA   |
|    |         |           | 3 | GUACAAUCAUCGGGUUAAA  |           |        |           | 3 | AUAAAAAGAUCUCAAGUA   |
|    |         |           | 4 | CAGUACAAUCAUCGGGUUA  |           |        |           | 4 | GGGACAUGAACGUGGGGAA  |
| ÜE | HIF0    | NM_005318 | 1 | CCAAGACUGUCAAGCCAA   | Kontrolle | PLAU   | NM_002658 | 1 | GCUCAAGGUUAACUCCAA   |
|    |         |           | 2 | UGUUACUUGGCCGGGAAA   |           |        |           | 2 | GAAAAUGACUGUUGUGAAG  |
|    |         |           | 3 | AGAAGGUAGCCACGCCAAA  |           |        |           | 3 | ACACACUGCUUCAUUGAUU  |
|    |         |           | 4 | UCGAUUUGGGAUUUGCUAA  |           |        |           | 4 | UGAGAUCACUGGCUUUGGA  |
| ÜE | 3       |           | 3 | GAGGAAAUCCCAAACCUA   | ÜE        |        |           | 3 | CUAGAGAACCUGGGAAUGA  |
|    |         |           | 4 | CUCAAAGAGCAGUCGGAUU  |           |        |           | 4 | CGACAUGUUCAGACAGUUU  |

|    |        |              |   |                      |    |         |              |   |                     |
|----|--------|--------------|---|----------------------|----|---------|--------------|---|---------------------|
|    |        |              | 3 | AGUACAACUUAUCGCAGA   |    |         |              | 3 | CAACAUGGGACGUUUUUU  |
|    |        |              | 4 | GCUAAGCGGGACACGUUU   |    |         |              | 4 | GAAUUUAAGAGUCAUGAUC |
| ÜE | SDCI   | NM_002997    | 1 | GAGCAGGACUUCACCUUUG  | ÜE | JARIDIB | NM_006618    | 1 | CCACAGAGCUUGUUGAGAA |
|    |        |              | 2 | GGAGAAUACGGCUGUAGUG  |    |         |              | 2 | GCAGAGGCCAUGAAUUUA  |
|    |        |              | 3 | CCAAACAGGAGGAAUUCUA  |    |         |              | 3 | CAACAGAACCUCUAUUUUG |
|    |        |              | 4 | CGCAAUUGUGGCUACUAA   |    |         |              | 4 | GGAGAUGCACUUCGAUUA  |
| ÜE | SPINT2 | NM_021102    | 1 | GAAGACCACUCCAGCGAUA  | ÜE | KIF20A  | NM_005733    | 1 | GCAAGAACCUGCUAUCAGA |
|    |        |              | 2 | GCAAUAACUUAUCUAUGG   |    |         |              | 2 | GAAGAGGGCCAGAAGAAUA |
|    |        |              | 3 | CCUGCCAGCUGUUUGUGUA  |    |         |              | 3 | GCAAUGAGAUGGUAGAACA |
|    |        |              | 4 | CAGCAGGAAUGCAGCGGAU  |    |         |              | 4 | CUGAAGAGUUGCAUAAGUA |
| ÜE | TAPBP  | NM_172208    | 1 | GCACCACACUGCGAGAUGA  | ÜE | MAPRE2  | NM_014268    | 1 | GAAUGGCGGUCAAUGUGUA |
|    |        |              | 2 | GCACCUAUCUGGCCACCAU  |    |         |              | 2 | GAACGUUGUAAGGUAAUU  |
|    |        |              | 3 | GAAUUGGGACCUUCUGGCU  |    |         |              | 3 | GGAGUAUGAUCCUGUAGAG |
|    |        |              | 4 | GCCUACAGUUAACCCUUU   |    |         |              | 4 | UGCAUGGGUUAUAGACAU  |
| ÜE | TM4SF1 | NM_014220    | 1 | GGACCACUAUGUCUUGAAU  | ÜE | MELK    | NM_014791    | 1 | GACUAAAGCUUCACUAUAA |
|    |        |              | 2 | GAUGC UUUCUUCUGUAUUG |    |         |              | 2 | UCACUACGCCAAAUCGUUA |
|    |        |              | 3 | GGAUCUGGCUACUGUGUCA  |    |         |              | 3 | GAACCAGCAUAAGAGAGAA |
|    |        |              | 4 | CAAAGUAUGCCUCCGAAA   |    |         |              | 4 | CCAAAGACUCCAGUUAUA  |
| ÜE | UNC84B | NM_015374    | 1 | GCACACACCUCCUACUACA  | ÜE | MET     | NM_000245    | 1 | GAAGAUCAGUUUCCUAAUU |
|    |        |              | 2 | GCAAGAUCUCCACCCAUUGU |    |         |              | 2 | CCAGAGACAUGUAUGAUAA |
|    |        |              | 3 | CCUAUGGGCUGCAGACAUU  |    |         |              | 3 | GAACAGAAUCACUGACAU  |
|    |        |              | 4 | CCACAGCCGUUACCUUAGA  |    |         |              | 4 | GAAACUGUAUGCUGGAUGA |
| ÜE | UNG    | NM_003362    | 1 | CUACAGACAUAGAGGAUUU  | ÜE | MRE11A  | NM_005591    | 1 | GAUGAGAACUCUUGGUUUU |
|    |        |              | 2 | GAACUCGAAUGGCCUUGUU  |    |         |              | 2 | GAAAGGCUCUAUCGAAUGU |
|    |        |              | 3 | GCAGUGCCAUUGAUAGGAA  |    |         |              | 3 | GCUAAUGACUCUGAUGUA  |
|    |        |              | 4 | CAAGCCAACUCUAUAAGG   |    |         |              | 4 | GAGUAUAGAUUAGCAGAA  |
| UE | ATF3   | NM_001030287 | 1 | GGUUUGCCAUCAGAACAA   | ÜE | MSTIR   | NM_002447    | 1 | GUGGAGCGCUGUUGUGAAU |
|    |        |              | 2 | CACUGGUGUUUGAGGAUUU  |    |         |              | 2 | GACAGGGAGUACUAUAGUG |
|    |        |              | 3 | GCGACGAGAAAGAAUAAG   |    |         |              | 3 | CGACCACCUUCAGAGUAC  |
|    |        |              | 4 | AGACGGAGUGCCUGCAGAA  |    |         |              | 4 | UAGAGGAGUUUGAGUGUGA |
| UE | BCKDK  | NM_005881    | 1 | GCACGUGCAUGAGCUAUAU  | ÜE | NT5E    | NM_002526    | 1 | GAACCUGGCUCUGUAUUG  |
|    |        |              | 2 | GCAGAGGGCCUACGUGAGA  |    |         |              | 2 | GGAAGUCACUGCCAUGGAA |
|    |        |              | 3 | GUACUCGUCUCUACCAAA   |    |         |              | 3 | UGAAAUCACUGCAUUACAA |
|    |        |              | 4 | UGGCAGAGGGCCUACGUGA  |    |         |              | 4 | GGACUUUAUUUGCCAUAUA |
| UE | CCL2   | NM_002982    | 1 | UGUUAUAACUACCAAAUA   | ÜE | PAK4    | NM_001014834 | 1 | GGAUUAUGGUGAUUGAGAU |
|    |        |              | 2 | CUCGCGAGCUAUGAAGAA   |    |         |              | 2 | GGGUGAAGCUGUCAGACUU |
|    |        |              | 3 | CCAGUCACCUGCUGUUAUA  |    |         |              | 3 | AGAAUGUGGUGGAGAUUA  |
|    |        |              | 4 | CAGAGGCUCGCGAGCUAUA  |    |         |              | 4 | CCAUGAAGAUUUCGGGA   |
| UE | CHUK   | NM_001278    | 1 | CAAAGAAGCUGACAAUACU  | ÜE | PKM2    | NM_002654    | 1 | GAAAGAACAUCAGAUAUU  |
|    |        |              | 2 | CCAGAUACUUCUUUACUA   |    |         |              | 2 | GCAUUGAGAUUCUGCAGA  |
|    |        |              | 3 | GAAGUUCGGUUUAGUAGCC  |    |         |              | 3 | GAUCAGUGGAGACGUUGAA |
|    |        |              | 4 | AAAUAUGGCAUCUCCUUA   |    |         |              | 4 | CCAUGUGAAGCCGGGACU  |
| UE | DUSP1  | NM_004417    | 1 | CCAAUUGUCCCAACCAUUU  | ÜE | PRKCZ   | NM_002744    | 1 | GAACGAGGACGCCGACCUU |
|    |        |              | 2 | CAACGAGGCCAUUGACUUC  |    |         |              | 2 | GACCAAUUUACGCCAUGA  |

|       |       |           |           |                      |                      |    |        |           |   |                      |
|-------|-------|-----------|-----------|----------------------|----------------------|----|--------|-----------|---|----------------------|
|       |       |           | 3         | CCACCACCGUGUACAACUU  |                      |    |        |           | 3 | GGUUGUCCUGGUCAUUGA   |
|       |       |           | 4         | GCAUAAACUGCCUUGAUCAA |                      |    |        |           | 4 | CGUCAAGCCUCCCAUGUU   |
|       | UE    | EBI2      | NM_004951 | 1                    | GAAAUCUGGUGUAAACAAA  | ÜE |        | PRKD2     | 1 | UGAGACACCUUCACUUCAA  |
|       |       |           |           | 2                    | GGAUUUGUACUCCACUUA   |    |        |           | 2 | CAAGAACAUGUCCACUGU   |
|       |       |           |           | 3                    | UAACUGCGCUAGUGUUUA   |    |        |           | 3 | GGAAGAUGGGAGAGCGAUA  |
|       |       |           |           | 4                    | GGGCAUGUUUCAUAGGAUA  |    |        |           | 4 | CGACACACGACGGGAAAU   |
|       | UE    | EDG6      | NM_003775 | 1                    | GACGCUGGGUCUACUUAUG  | ÜE |        | PRKDC     | 1 | GCAAAGAGGGGAGUUA     |
|       |       |           |           | 2                    | GUGCGGAGCAUCUGAAGUU  |    |        |           | 2 | GAGCAUCACUUGCCUUUA   |
|       |       |           |           | 3                    | GCACAGCCGGCUCAUUGUU  |    |        |           | 3 | GAUGAGAAGUCCUAGGUA   |
|       |       |           |           | 4                    | UGGCAACAUUGAAGUUCGA  |    |        |           | 4 | GCAGGACCGUCAAGGUUA   |
|       | UE    | FOSL2     | NM_005253 | 1                    | GGCCAGUGUGCAAGAUUA   | ÜE |        | RAD50     | 1 | GAAACAAACUCGAGAUGU   |
|       |       |           |           | 2                    | GAAAUUCCGGUAGAUUUG   |    |        |           | 2 | GAACAAGGACUGGAUUAU   |
|       |       |           |           | 3                    | GCUCACCGCAGAAGCAGUA  |    |        |           | 3 | GCUCAGAGAUUGUGAAAUG  |
|       |       |           |           | 4                    | GCAGCUGUCUCCUGAAGAG  |    |        |           | 4 | UAACCUCACUGUUGGGAUA  |
|       | UE    | GTF2F2    | NM_004128 | 1                    | GAAAGAAGACGGAAAGCGA  | ÜE |        | RALB      | 1 | GAAAGAUGUUGCUUACUUAU |
|       |       |           |           | 2                    | UAGUCAAGGUUCCUAAAUA  |    |        |           | 2 | GAAUUCAGAACAAAGAAGA  |
|       |       |           |           | 3                    | AGUCAGUGCUCCUAGAGAA  |    |        |           | 3 | UACCAAAGCUGACAGUUAU  |
|       |       |           |           | 4                    | GAAAACUACAUGCGAUUUA  |    |        |           | 4 | AGACAAGAAUGGCAAGAAA  |
|       | UE    | PTPN2     | NM_002828 | 1                    | GAAACAGGAUUCAGUGUGA  | ÜE |        | RRAS      | 1 | GGAAAUACCAGGAACAAGA  |
|       |       |           |           | 2                    | ACAAAGGAGUUACAUCUUA  |    |        |           | 2 | GUUUAACGAGGUGGGCAA   |
|       |       |           |           | 3                    | AAAGGAGAUUCUAGUAUA   |    |        |           | 3 | CCGUUGUGUUGGUCGGAA   |
|       |       |           |           | 4                    | AAACAGAAUUCGAAACAGA  |    |        |           | 4 | CCGGAAAUACCAGGAACAA  |
|       | UE    | AURKB     | NM_004217 | 1                    | CAGAAGAGCUGCACAUAUUG | ÜE |        | SMURF1    | 1 | GCACUAUGAUCUAUAUUGUU |
|       |       |           |           | 2                    | CCAAACUGCUCAGGCAUUA  |    |        |           | 2 | AAAGAGAUCUAGUCCAGAA  |
|       |       |           |           | 3                    | ACGCGGCACUUCACAAUUG  |    |        |           | 3 | GGAAGAAGGUUGGAUUAU   |
|       |       |           |           | 4                    | UGGGACACCCGACAUUUA   |    |        |           | 4 | AGUAGGGUGUGGACGCAAA  |
|       | UE    | ZNF22     | NM_006963 | 1                    | GGGCAUGACUAUUCGAUUU  | ÜE |        | SRPK1     | 1 | GAAGUCAGUUCGCAAUUA   |
|       |       |           |           | 2                    | UCACUUAACCCUCUUGGAAA |    |        |           | 2 | GAACACUAUUCUGCAUGGU  |
|       |       |           |           | 3                    | CAAGGAAAGGCCUAUGAGA  |    |        |           | 3 | UCACGAAGCUGAAACCUUG  |
|       |       |           |           | 4                    | GGUAUUUCUCGGAGCUCAA  |    |        |           | 4 | GUUACAGGGUCUUGAUUAU  |
|       | PanIN | AGR2      | NM_006408 | 1                    | GAAGAAGCUCUACAAGUUG  | ÜE |        | SUV39HI   | 1 | GAACCUCUAUGACUUUGAA  |
|       |       |           |           | 2                    | GAAAUUGGCAGAGCAGUUU  |    |        |           | 2 | CCAACUACCGGUGCAGAA   |
|       |       |           |           | 3                    | CAGUCAAGCUUAAAAGAAA  |    |        |           | 3 | CUAAGAAGCGGGUCCGUUA  |
|       |       |           |           | 4                    | AGUCAAAACCGGAGCCAAA  |    |        |           | 4 | GGUGAAAUGGCGUGGAUUA  |
|       | PanIN | C8ORF20   | NM_025232 | 1                    | GAUGAGUGUUGGUCAGAUUA | ÜE |        | TMPRSS4   | 1 | GAACAGCCUCGAGUCAAAA  |
|       |       |           |           | 2                    | CCUCAGACGUGGACAGCUA  |    |        |           | 2 | CGAGGAAGCAGCUGUGUGA  |
|       |       |           |           | 3                    | AGAGAUCGUACAGACAUU   |    |        |           | 3 | GUACUAGGUUCUAGGAAA   |
|       |       |           |           | 4                    | GAUCGACCGUACAUCGUG   |    |        |           | 4 | GAGUGGAAACUAAGGUGAU  |
|       | PanIN | CDC37     | NM_007065 | 1                    | GCGAGGAGACGCCAAUUA   | ÜE |        | TRIO      | 1 | GAUAAGAGGUACAGAGAUU  |
|       |       |           |           | 2                    | CACAAGACCUUCGUGGAAA  |    |        |           | 2 | GGAAGUCGCUCUUGACAA   |
|       |       |           |           | 3                    | ACAAUCGUCAUGCAAUUA   |    |        |           | 3 | CAACGGAGAGUCCAUGUUA  |
|       |       |           |           | 4                    | GAGGAGAAAUGGCACUCA   |    |        |           | 4 | GAACACCAACUUCAGAUUA  |
| PanIN | CST3  | NM_000099 | 1         | GCACAAUGACCUUGUCGAA  | ÜE                   |    | TSG101 | NM_006292 | 1 | AAACUGAGAUGGCGGAUGA  |
|       |       |           | 2         | GCGUGGAGGAGGAGGGUGU  |                      |    |        |           | 2 | GAACCUCACUGGAACAAUC  |

|  |  |   |                     |  |  |   |                     |
|--|--|---|---------------------|--|--|---|---------------------|
|  |  | 3 | AGGAAAGCAUUCUGCUCUU |  |  | 3 | CCGUUUAGAUAAGAAGUA  |
|  |  | 4 | CCGUCGGCGAGUACAACAA |  |  | 4 | UCCCACAGCUCCCUUAUAC |

**Tabelle 9: Subzelluläre Lokalisationsbestimmungen der 79 Kandidatengene in den Panc1, S2-007 und Hek293 Zelllinien sowohl mit als auch ohne Serumbehandlung im reversen Transfektionsformat.** Folgende Abkürzungen fanden hier die Anwendung: *CP* für Zytoplasma, *NUC* für Nukleus, *Orga* sowie *Orgs* für Organellen, *Mem* für Membran, *Golgi* für Golgi-Apparat und *Ves* für Vesikel. Die Anmerkung durch die Zahl *1x* kennzeichnet die einmalige somit nicht reproduzierte Detektion dieser Lokalisation.

| Genkurzzeichen:    | PANC1                |                           |                            |                     |
|--------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
|                    | CFP +FCS             | YFP +FCS                  | CFP -FCS                   | YFP-FCS             |
| <b>AMF</b>         | CP                   | CP, teilw. NUC            | CP                         | CP, teilw. NUC      |
| <b>AMFR</b>        | FEHLT IMMER          | FEHLT IMMER               | FEHLT IMMER                | CP, (NUC, Orga 1x)  |
| <b>Amplaxin</b>    | CP oder CP, NUC      | CP oder CP, NUC           | CP, (Orga 1x)              | CP-NUC              |
| <b>ATF3</b>        | CP und/oder NUC      | CP und/oder NUC           | CP-NUC, Orga               | CP-NUC, (Orga 1x)   |
| <b>BCKD</b>        | CP, Orgs, Golgi      | CP, Orgs, Golgi           | CP, Orga, (Kern 1x)        | CP, Orga, (Kern 1x) |
| <b>BCL10</b>       | CP, Orgs             | FEHLT IMMER               | (Orga 1x), (CP 1x)         | NUC, Orga 1x        |
| <b>Cathepsin E</b> | CP                   | CP, Orgs                  | CP-Kern, Orga 1x           | CP, Orga            |
| <b>CCL14</b>       | FEHLT IMMER          | CP, Orgs                  | CP-Kern 1x                 | CP-NUC, (Orga 1x)   |
| <b>CCL2</b>        | CP und/oder NUC      | CP und/oder NUC           | CP, (Kernmem 1x, Golgi 1x) | CP-NUC              |
| <b>CFL1</b>        | CP, NUC              | CP, NUC                   | CP-NUC                     | CP-NUC              |
| <b>Claudin4</b>    | CP, Mem, Orgs, Ext   | CP, Mem, Orgs, Ext        | CP, Orga 1x                | CP, Orga, Mem       |
| <b>Claudin7</b>    | Orgs                 | Orgs                      | Orga                       | CP - Orga           |
| <b>CNK</b>         | CP                   | Mem, Orgs                 | FEHLT IMMER                | CP1x                |
| <b>COPEB</b>       | CP, NUC              | CP, NUC                   | CP-NUC, (Golgi 1x)         | CP-NUC              |
| <b>CPNE1</b>       | CP, NUC              | CP, NUC                   | FEHLT IMMER                | CP-NUC, (Orga 1x)   |
| <b>CRABP</b>       | CP, NUC              | CP, NUC                   | CP-NUC                     | CP-NUC              |
| <b>CyclinD1</b>    | CP, NUC              | FEHLT IMMER               | CP-NUC                     | FEHLT IMMER         |
| <b>DDR1</b>        | FEHLT IMMER          | CP                        | CP- NUC 1x                 | FEHLT IMMER         |
| <b>DUSP1</b>       | CP, NUC              | CP und/oder NUC           | CP- NUC 1x                 | CP-NUC              |
| <b>EBI2</b>        | FEHLT IMMER          | Mem, Orgs                 | CP 1x                      | CP, Orga, (Mem 1x)  |
| <b>EDG6</b>        | CP                   | CP, Mem, Orgs, Ext, Golgi | CP 1x                      | CP, (Orga 1x)       |
| <b>EDNRA</b>       | FEHLT IMMER          | Orgs                      | FEHLT IMMER                | FEHLT IMMER         |
| <b>ELF3</b>        | CP, Orgs, teilw. NUC | CP, Orgs, teilw. NUC      | CP-Kern 1x                 | NUC 1x              |
| <b>FASTK</b>       | NUC                  | CP und/oder NUC           | CP1x                       | CP-NUC, (Orga 1x)   |
| <b>FRA2</b>        | CP und/oder NUC      | CP und/oder NUC           | CP-NUC                     | CP-NUC 1x           |
| <b>G2AN</b>        | CP                   | FEHLT IMMER               | FEHLT IMMER                | FEHLT IMMER         |
| <b>GSPT1</b>       | CP und/oder NUC      | CP und/oder NUC           | CP-NUC1x                   | FEHLT IMMER         |

|                   |                   |                        |                             |                                      |
|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| <b>GTF2F2</b>     | CP und/oder NUC   | CP und/oder NUC        | FEHLT IMMER                 | CP-NUC                               |
| <b>KCMF1</b>      | FEHLT IMMER       | FEHLT IMMER            | FEHLT IMMER                 | FEHLT IMMER                          |
| <b>LGALS3</b>     | CP, NUC           | CP, NUC                | CP-NUC1x                    | CP-NUC, (Orga 1x)                    |
| <b>Lipocortin</b> | CP                | CP                     | CP 1x                       | CP                                   |
| <b>MAP3K11</b>    | CP, Golgi, Orgs   | FEHLT IMMER            | CP-NUC 1x                   | FEHLT IMMER                          |
| <b>MMP2</b>       | FEHLT IMMER       | CP                     | CP 1x                       | FEHLT IMMER                          |
| <b>NFAT2C1</b>    | CP, Orgs          | CP, Orgs               | CP-NUC, (Orga 1x)           | CP-NUC, Orga                         |
| <b>NKX2-5</b>     | NUC               | NUC                    | NUC 1x                      | Kern                                 |
| <b>PAI</b>        | CP und/oder NUC   | CP                     | CP 1x                       | CP, Golgi                            |
| <b>PCTK1</b>      | CP                | CP                     | NUC 1x                      | CP-NUC                               |
| <b>PPM1B</b>      | NUC               | NUC                    | n.D.                        | CP-NUC                               |
| <b>PPP2R1A</b>    | NUC               | NUC                    | n.D.                        | CP-NUC                               |
| <b>PPP2R4</b>     | CP, NUC           | CP, NUC                | CP-NUC 1x                   | CP-NUC                               |
| <b>PROC</b>       | FEHLT IMMER       | NUC                    | FEHLT IMMER                 | Orga 1x                              |
| <b>PRSS25</b>     | FEHLT IMMER       | Mem                    | FEHLT IMMER                 | CP, Orga 1x                          |
| <b>PTPN2</b>      | FEHLT IMMER       | CP, NUC                | FEHLT IMMER                 | CP-Kern, Golgi 1x                    |
| <b>RAB20</b>      | CP, NUC           | CP, NUC                | CP-NUC                      | CP-NUC                               |
| <b>SMAC</b>       | FEHLT IMMER       | 1x Orgs, 1x CP,<br>NUC | CP, Orga, (Kern 1x)         | CP, (NUC 1x,<br>Kernmem 1x, Orga 1x) |
| <b>SPINT2</b>     | FEHLT IMMER       | CP, Orgs, Golgi        | CP-NUC 1x                   | CP, Orga (Kern 1x,<br>Kernmem 1x)    |
| <b>ADRBK1</b>     | CP, NUC           | CP, NUC                | CP-NUC                      | CP-NUC                               |
| <b>AGR2</b>       | FEHLT IMMER       | FEHLT IMMER            | CP-NUC 1x                   | CP-NUC 1x                            |
| <b>C8orf20</b>    | CP, Orgs          | FEHLT IMMER            | CP, (NUC 1x)                | FEHLT IMMER                          |
| <b>CDC37</b>      | FEHLT IMMER       | FEHLT IMMER            | CP, (NUC 1x)                | FEHLT IMMER                          |
| <b>CNR2</b>       | FEHLT IMMER       | FEHLT IMMER            | FEHLT IMMER                 | FEHLT IMMER                          |
| <b>CST3</b>       | 1x CP, 1x CP, NUC | FEHLT IMMER            | CP-NUC                      | CP-NUC 1x                            |
| <b>CYP4F12</b>    | FEHLT IMMER       | CP, Orgs               | n.D.                        | CP-NUC 1x                            |
| <b>FOXA3</b>      | CP                | CP, NUC                | CP-NUC                      | CP-Kern                              |
| <b>H1FO</b>       | NUC               | NUC                    | n.D.                        | NUC                                  |
| <b>IFI37</b>      | CP                | CP, NUC                | CP, (NUC 1x,<br>Kernmem 1x) | CP-NUC                               |
| <b>IL13R1A</b>    | FEHLT IMMER       | FEHLT IMMER            | CP, Golgi 1x                | CP-NUC 1x                            |
| <b>LGALS4</b>     | CP, NUC           | CP, NUC                | CP-NUC                      | CP-NUC, (Mem 1x)                     |
| <b>PLAC8</b>      | CP, Orgs          | CP, NUC                | CP-NUC                      | CP-NUC                               |
| <b>POLR3K</b>     | CP, NUC           | FEHLT IMMER            | CP-NUC                      | CP-NUC                               |
| <b>RAB34</b>      | CP                | FEHLT IMMER            | CP-NUC                      | CP-NUC                               |
| <b>RABAC1</b>     | CP                | CP, orgs               | CP-NUC 1x                   | Orga, (CP1x)                         |
| <b>S100P</b>      | CP, NUC           | CP, Orgs               | CP-NUC                      | CP-NUC 1x                            |
| <b>SQLE</b>       | CP                | FEHLT IMMER            | CP, Orga 1x                 | n.D.                                 |
| <b>STK12</b>      | FEHLT IMMER       | CP und/oder NUC        | CP-NUC, (Golgi 1x)          | CP-NUC, (Orga 1x)                    |
| <b>Survivin</b>   | CP und/oder NUC   | CP oder NUC            | CP 1x                       | Zyto, (Kern 1x)                      |
| <b>Syndecan</b>   | CP                | CP, Mem, Orgs, Ext     | CP 1x                       | CP, Mem,O-Protein,<br>(Orga 1x)      |

|               |               |                      |                          |                              |
|---------------|---------------|----------------------|--------------------------|------------------------------|
| <b>TAPBP</b>  | FEHLT IMMER   | CP, Orgs             | CP                       | CP, Orga, Kernmem 1x         |
| <b>TFF1</b>   | FEHLT IMMER   | FEHLT IMMER          | CP-NUC 1x                | FEHLT IMMER                  |
| <b>TGFBR1</b> | FEHLT IMMER   | FEHLT IMMER          | FEHLT IMMER              | FEHLT IMMER                  |
| <b>TGFBR2</b> | FEHLT IMMER   | FEHLT IMMER          | FEHLT IMMER              | FEHLT IMMER                  |
| <b>TIMP2</b>  | CP, NUC       | FEHLT IMMER          | CP-NUC                   | FEHLT IMMER                  |
| <b>TM4SF1</b> | FEHLT IMMER   | CP, Mem, orgs        | CP 1x                    | CP, ( Orga, Mem 1x)          |
| <b>UNC84B</b> | CP, NUC       | CP, Mem, Orgs        | CP, Orga,<br>Kernmem. 1x | Kernmem, (Kern, Golgi<br>1x) |
| <b>UNG</b>    | FEHLT IMMER   | FEHLT IMMER          | CP-NUC                   | CP 1x                        |
| <b>XIAP</b>   | CP, NUC       | CP                   | FEHLT IMMER              | CP (Kern 2x, Golgi 1x)       |
| <b>XS314</b>  | CP, Orgs, Ext | CP, Orgs, Golgi, Ext | Orga, (CP-NUC1x)         | Kernmem, Orga                |
| <b>ZNF22</b>  | FEHLT IMMER   | 1x CP, 2x NUC        | CP-NUC 1x                | (Kernmem 1x, Kern 1x)        |
| <b>BAX</b>    | CP, NUC       | CP, NUC              | CP-NUC 1x                | CP-Kern 1x                   |

| Genkurz-<br>zeichen: | S2-007                |                          |                           |                                |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------|
|                      | CFP +FCS              | YFP +FCS                 | CFP -FCS                  | YFP -FCS                       |
| <b>AMF</b>           | CP                    | CP                       | CP (NUC 1x)               | CP                             |
| <b>AMFR</b>          | Mem, Golgi            | Mem, Golgi, Orgs         | CP                        | CP ( NUC, Orga 1x)             |
| <b>Amplaxin</b>      | CP                    | CP                       | CP (NUC 2x),<br>(Orga 1x) | CP                             |
| <b>ATF3</b>          | NUC und/oder CP       | NUC und/oder CP          | NUC                       | NUC 2x, CP 2x, Orga<br>2x      |
| <b>BCKD</b>          | CP, Orgs              | Orgs, Golgi              | Orga (CP 1x)              | Orga (CP 1x)                   |
| <b>BCL10</b>         | CP, Orgs              | FEHLT IMMER              | Orga                      | NUC, Orga (1x)                 |
| <b>Cathepsin E</b>   | CP, Orgs              | CP, Orgs                 | FEHLT IMMER               | Orga                           |
| <b>CCL14</b>         | CP, Orgs              | CP, Orgs                 | FEHLT IMMER               | Orga (CP 1x)                   |
| <b>CCL2</b>          | CP, NUC, Orgs         | CP, Orgs, NUC            | CP 1x                     | CP-NUC, (Orga 1x,<br>Golgi 1x) |
| <b>CFL1</b>          | CP, NUC               | CP, NUC                  | CP-NUC                    | CP-NUC (Orga 1x)               |
| <b>Claudin4</b>      | Mem, Orgs, Golgi, Ext | Mem, Orgs, Golgi,<br>Ext | Mem, (CP 1x)              | Mem (CP)                       |
| <b>Claudin7</b>      | Orgs                  | Orgs                     | Orga (CP1x)               | Orga (1x)                      |
| <b>CNK</b>           | FEHLT IMMER           | Cp, Orgs, MEM            | CP 1x                     | CP (1X)                        |
| <b>COPEB</b>         | CP, NUC               | CP, NUC                  | CP-NUC                    | CP-NUC                         |
| <b>CPNE1</b>         | CP, NUC               | CP, Orgs                 | CP-NUC 1x                 | CP-NUC (1x)                    |
| <b>CRABP</b>         | CP, NUC               | CP, NUC                  | CP-NUC                    | CP-NUC                         |
| <b>CyclinD1</b>      | CP, NUC, Orgs         | CP, NUC                  | CP                        | Orga (1x)                      |
| <b>DDR1</b>          | FEHLT IMMER           | FEHLT IMMER              | CP 1x                     | FEHLT IMMER                    |
| <b>DUSP1</b>         | CP, Orgs              | CP, Orgs, NUC            | CP-NUC                    | CP (Kern, Mem 1x)              |
| <b>EBI2</b>          | FEHLT IMMER           | CP, Mem, Orgs            | CP 1x                     | Mem (CP 1x)                    |
| <b>EDG6</b>          | CP?, Orgs?            | Mem, Orgs, Golgi,        | (CP 1x), (Mem 1x)         | (CP1x), Mem, Orga<br>(1X)      |

|                   |                 |                      |                         |                             |
|-------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>EDNRA</b>      | CP, Mem         | Mem, Orgs, CP        | CP, Mem 1x              | FEHLT IMMER                 |
| <b>ELF3</b>       | NUC, Orgs       | CP, Orgs             | NUC, (CP 1x)            | NUC, (CP, Orga 1x)          |
| <b>FASTK</b>      | CP und/oder NUC | CP und/oder NUC      | Orga 1x                 | CP-NUC (1x), Orga (1x)      |
| <b>FRA2</b>       | NUC, teilw. CP  | NUC, teilw. CP       | NUC, (Kernmem 1x)       | NUC, (Orga 1x)              |
| <b>G2AN</b>       | FEHLT IMMER     | FEHLT IMMER          | CP 1x                   | FEHLT IMMER                 |
| <b>GSPT1</b>      | CP und/oder NUC | CP                   | CP 1x                   | Orga (1x)                   |
| <b>GTF2F2</b>     | CP, NUC         | CP, NUC              | CP 1x                   | NUC 1x, CP 1x, mem 1x       |
| <b>KCMF1</b>      | FEHLT IMMER     | FEHLT IMMER          | n.D.                    | CP-NUC 1x                   |
| <b>LGALS3</b>     | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-Kern 1x              | CP-NUC 1x                   |
| <b>Lipocortin</b> | CP              | CP                   | CP, (Ves 1x, Mem 1x)    | FEHLT IMMER                 |
| <b>MAP3K11</b>    | CP              | FEHLT IMMER          | CP, (NUC 1x, Orga 1x)   | CP-Orga 1x                  |
| <b>MMP2</b>       | Orgs            | FEHLT IMMER          | NUC, (Zyto 1x)          | FEHLT IMMER                 |
| <b>NFAT2C1</b>    | Cp, Orgs        | CP, Orgs             | CP-NUC, (Orga 1x)       | CP-NUC, Orga 1x             |
| <b>NKX2-5</b>     | NUC             | NUC                  | NUC                     | NUC                         |
| <b>PAI</b>        | CP              | CP                   | CP-NUC                  | CP (NUC 1x)                 |
| <b>PCTK1</b>      | CP              | CP                   | CP, (NUC 1x), (Orga 1x) | CP 1x                       |
| <b>PPM1B</b>      | NUC             | NUC                  | NUC, (CP 1x)            | NUC 1x                      |
| <b>PPP2R1A</b>    | CP und/oder NUC | CP und/oder NUC      | CP, (NUC 1x)            | FEHLT IMMER                 |
| <b>PPP2R4</b>     | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-NUC                  | CP-NUC                      |
| <b>PROC</b>       | CP              | CP und/oder NUC      | FEHLT IMMER             | CP                          |
| <b>PRSS25</b>     | FEHLT IMMER     | CP, Mem              | FEHLT IMMER             | CP, Mem 1x                  |
| <b>PTPN2</b>      | FEHLT IMMER     | CP und/oder NUC      | CP-NUC 1x               | FEHLT IMMER                 |
| <b>RAB20</b>      | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-NUC                  | CP-NUC                      |
| <b>SMAC</b>       | CP, Orgs        | CP, Orgs             | Orga, (CP 1x)           | CP, Orga                    |
| <b>SPINT2</b>     | CP              | CP, Orgs, teilw. NUC | CP, Orga 1x             | Orga, (CP 1x), (Kernmem 1x) |
| <b>ADRBK1</b>     | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-NUC                  | CP, NUC                     |
| <b>AGR2</b>       | FEHLT IMMER     | FEHLT IMMER          | CP-NUC 1x               | FEHLT IMMER                 |
| <b>C8orf20</b>    | CP, mem         | FEHLT IMMER          | Orga 1x                 | Orga 1x                     |
| <b>CDC37</b>      | CP und/oder NUC | FEHLT IMMER          | CP-NUC                  | FEHLT IMMER                 |
| <b>CNR2</b>       | FEHLT IMMER     | FEHLT IMMER          | n.D.                    | FEHLT IMMER                 |
| <b>CST3</b>       | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-NUC                  | FEHLT IMMER                 |
| <b>CYP4F12</b>    | FEHLT IMMER     | CP, NUC              | FEHLT IMMER             | FEHLT IMMER                 |
| <b>FOXA3</b>      | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-NUC                  | NUC (CP 1x)                 |
| <b>H1FO</b>       | NUC             | NUC                  | NUC                     | NUC                         |
| <b>IFI37</b>      | FEHLT IMMER     | CP, NUC              | CP (NUC 1x)             | CP-NUC                      |
| <b>IL13R1A</b>    | FEHLT IMMER     | CP, NUC              | FEHLT IMMER             | FEHLT IMMER                 |
| <b>LGALS4</b>     | CP, NUC         | CP, NUC              | CP-NUC                  | CP- NUC, Mem                |
| <b>PLAC8</b>      | CP und/oder NUC | CP, NUC              | CP-NUC, (Orga 1x)       | CP (NUC 1x)                 |

|                 |               |                    |   |                         |
|-----------------|---------------|--------------------|---|-------------------------|
| <b>POLR3K</b>   | CP, NUC       | CP, NUC            | CP-NUC                                    | CP-NUC                  |
| <b>RAB34</b>    | CP, NUC       | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER                               | CP-NUC                  |
| <b>RABAC1</b>   | CP, Orgs      | CP, Orgs           | CP, (Orga 1x)                             | CP, Orga                |
| <b>S100P</b>    | CP, NUC       | CP, NUC, Orgs      | CP-NUC                                    | CP-NUC, (Orga 1x)       |
| <b>SQLE</b>     | CP            | FEHLT IMMER        | CP 1x                                     | CP, Orga 1x             |
| <b>STK12</b>    | FEHLT IMMER   | CP, NUC, Orgs      | Orga 1x                                   | CP-NUC 1x               |
| <b>Survivin</b> | CP            | CP                 | CP-NUC                                    | CP, Kernmem, (Orga 1x)  |
| <b>Syndecan</b> | FEHLT IMMER   | CP; Orgs, Mem, Ext | CP 1x                                     | CP, Mem, (Orga 1x)      |
| <b>TAPBP</b>    | CP            | CP, Orgs, Mem      | CP, (Ves 1x)                              | CP, Ves, Kernmem 1x     |
| <b>TFF1</b>     | FEHLT IMMER   | CP und/oder NUC    | FEHLT IMMER                               | CP- NUC 1x              |
| <b>TGFBR1</b>   | CP, Orgs, Mem | FEHLT IMMER        | CP, Orga 1x                               | FEHLT IMMER             |
| <b>TGFBR2</b>   | FEHLT IMMER   | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER                               | CP (NUC 1x)             |
| <b>TIMP2</b>    | FEHLT IMMER   | CP, NUC            | CP-NUC 1x                                 | FEHLT IMMER             |
| <b>TM4SF1</b>   | CP, Mem, Orgs | CP, Mem, Orgs      | CP, (NUC 1x),<br>(Kernmem 1x),<br>Mem 1x) | Mem, Ves                |
| <b>UNC84B</b>   | FEHLT IMMER   | FEHLT IMMER        | NUC 1x, Kernmem 1x                        | CP 1x, Kernmem 1x       |
| <b>UNG</b>      | FEHLT IMMER   | CP, mem, Orgs      | NUC 1x                                    | CP-NUC, Orga 1x         |
| <b>XIAP</b>     | CP            | CP und/oder NUC    | FEHLT IMMER                               | CP 1x                   |
| <b>XS314</b>    | CP, Mem, Orgs | CP, Mem, Orgs      | CP, Orga, (NUC 1x)                        | CP, (Orga 1x, Golgi 1x) |
| <b>ZNF22</b>    | Orgs          | CP, NUC            | FEHLT IMMER                               | FEHLT IMMER             |
| <b>BAX</b>      | CP, NUC       | CP, NUC            | CP-NUC 1x                                 | FEHLT IMMER             |

| Genkurz-<br>zeichen: | Hek293               |                 |
|----------------------|----------------------|-----------------|
|                      | CFP +FCS             | YFP +FCS        |
| <b>AMF</b>           | CP                   | CP              |
| <b>AMFR</b>          | FEHLT IMMER          | CP, Orgs        |
| <b>Amplaxin</b>      | CP                   | CP              |
| <b>ATF3</b>          | NUC                  | CP und/oder NUC |
| <b>BCKD</b>          | CP, Orgs             | CP, Orgs        |
| <b>BCL10</b>         | CP, Orgs             | FEHLT IMMER     |
| <b>Cathepsin E</b>   | FEHLT IMMER          | CP, Orgs        |
| <b>CCL14</b>         | Orgs                 | CP, Orgs, NUC   |
| <b>CCL2</b>          | CP, Orgs, Golgi      | FEHLT IMMER     |
| <b>CFL1</b>          | CP, NUC              | CP, NUC         |
| <b>Claudin4</b>      | CP, Orgs, Mem, Golgi |                 |
| <b>Claudin7</b>      | Orgs                 | Orgs            |
| <b>CNK</b>           | CP                   | CP              |
| <b>COPEB</b>         | CP, NUC              | CP, NUC         |
| <b>CPNE1</b>         | CP und/oder NUC      | CP und/oder NUC |
| <b>CRABP</b>         | CP, NUC              | CP, NUC         |



|                   |                    |                           |
|-------------------|--------------------|---------------------------|
| <b>CyclinD1</b>   | Cp, Orgs, Golgi    | CP                        |
| <b>DDR1</b>       | CP                 | FEHLT IMMER               |
| <b>DUSP1</b>      | FEHLT IMMER        | CP und/oder NUC           |
| <b>EBI2</b>       | FEHLT IMMER        | Cp, Mem, Orgs             |
| <b>EDG6</b>       | FEHLT IMMER        | Cp, Mem, Orgs             |
| <b>EDNRA</b>      | CP                 | Cp, Mem, Orgs             |
| <b>ELF3</b>       | NUC                | FEHLT IMMER               |
| <b>FASTK</b>      | CP                 | CP und/oder NUC           |
| <b>FRA2</b>       | NUC                | NUC                       |
| <b>G2AN</b>       | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER               |
| <b>GSPT1</b>      | CP, Golgi          | FEHLT IMMER               |
| <b>GTF2F2</b>     | CP, Orgs, Golgi    | Cp, orgs, Golgi           |
| <b>KCMF1</b>      | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER               |
| <b>LGALS3</b>     | CP und/oder NUC    | CP und/oder NUC           |
| <b>Lipocortin</b> | CP                 | CP                        |
| <b>MAP3K11</b>    | CP, Orgs           |                           |
| <b>MMP2</b>       | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER               |
| <b>NFAT2C1</b>    | CP, Orgs           | CP, Orgs                  |
| <b>NKX2-5</b>     | NUC                | NUC                       |
| <b>PAI</b>        | CP                 | CP                        |
| <b>PCTK1</b>      | CP, Golgi          | CP, golgi                 |
| <b>PPM1B</b>      | NUC                | NUC                       |
| <b>PPP2R1A</b>    | CP und/oder NUC    | CP und/oder NUC           |
| <b>PPP2R4</b>     | CP, NUC            | CP, NUC                   |
| <b>PROC</b>       | FEHLT IMMER        | CP                        |
| <b>PRSS25</b>     | FEHLT IMMER        | CP, Orgs, Mem             |
| <b>PTPN2</b>      | FEHLT IMMER        | CP und/oder NUC           |
| <b>RAB20</b>      | CP, NUC            | CP, NUC                   |
| <b>SMAC</b>       | CP, Orgs           | CP, Orgs                  |
| <b>SPINT2</b>     | FEHLT IMMER        | CP, Orgs, Golgi           |
| <b>ADRBK1</b>     | CP, NUC            | CP, NUC                   |
| <b>AGR2</b>       | FEHLT IMMER        | CP, NUC                   |
| <b>C8orf20</b>    | CP 1x, CP, Orgs 3x | FEHLT IMMER               |
| <b>CDC37</b>      | CP                 | FEHLT IMMER               |
| <b>CNR2</b>       | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER               |
| <b>CST3</b>       | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER               |
| <b>CYP4F12</b>    | 1x CP, 1x NUC      | FEHLT IMMER               |
| <b>FOXA3</b>      | CP oder NUC        | CP und/oder NUC           |
| <b>H1FO</b>       | FEHLT IMMER        | NUC                       |
| <b>IFI37</b>      | CP                 | CP oder CP, NUC           |
| <b>IL13R1A</b>    | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER               |
| <b>LGALS4</b>     | CP, NUC            | CP, NUC                   |
| <b>PLAC8</b>      | CP, Orgs, Mem      | CP, Orgs teilweise<br>NUC |

|                 |                       |                       |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>POLR3K</b>   | Cp, NUC               | FEHLT IMMER           |
| <b>RAB34</b>    | CP, NUC               | FEHLT IMMER           |
| <b>RABAC1</b>   | CP, Orgs              | CP, Orgs              |
| <b>S100P</b>    | CP, NUC teilw, nur CP | CP, NUC teilw. Nur CP |
| <b>SQLE</b>     | CP                    | CP                    |
| <b>STK12</b>    | CP                    | CP, Orgs teilw. NUC   |
| <b>Survivin</b> | CP                    | CP, Orgs              |
| <b>Syndecan</b> | FEHLT IMMER           | CP, Orgs, Mem, Golgi  |
| <b>TAPBP</b>    | FEHLT IMMER           | CP, Orgs              |
| <b>TFF1</b>     | FEHLT IMMER           | CP                    |
| <b>TGFBR1</b>   | CP, Orgs              | FEHLT IMMER           |
| <b>TGFBR2</b>   | FEHLT IMMER           | FEHLT IMMER           |
| <b>TIMP2</b>    | FEHLT IMMER           | FEHLT IMMER           |
| <b>TM4SF1</b>   | CP, Orgs              | CP, Mem, Orgs, Golgi  |
| <b>UNC84B</b>   | CP, Orgs              | CP, Orgs              |
| <b>UNG</b>      | CP                    | CP                    |
| <b>XIAP</b>     | CP                    | CP                    |
| <b>XS314</b>    | CP, Mem, Orgs, Golgi  |                       |
| <b>ZNF22</b>    |                       | CP, Orgs oder nur NUC |
| <b>BAX</b>      | CP und/oder NUC       | CP, NUC               |

**Tabelle 10: Subzelluläre Lokalisationsbestimmungen der 12 PaCaNet-Kandidatengene in den Panc1, S2-007 und Hek293 Zelllinien sowohl mit als auch ohne Serumbehandlung im *forward* Transfektionsformat.** Folgende Abkürzungen fanden hier die Anwendung: *CP* für Zytoplasma, *NUC* für Nukleus, *Orga* sowie *Orgs* für Organellen, *Mem* für Membran, *Golgi* für Golgi-Apparat, *TJ* für tight junctions und *Ves* für Vesikel. Die Ansätze mit Serumbehandlung sind von Frau S. Kirchhof durchgeführt wurden.

| Genbezeichnung: | Hek293              |             |                    |             |
|-----------------|---------------------|-------------|--------------------|-------------|
|                 | CFP                 |             | YFP                |             |
|                 | 10% FKS             | 0% FKS      | 10% FKS            | 0% FKS      |
| CDC20           | CP, Orgs, NUC       | CP, Orgs    | FEHLT IMMER        | CP          |
| MAPRE2          | CP                  | CP          | CP                 | CP          |
| PKM2            | CP, Orgs, Artefakte | CP, Orgs    | CP, Orgs, Artefakt | CP, Orgs    |
| TSG101          | Orgs                | CP, Orgs    | FEHLT IMMER        | FEHLT IMMER |
| NT5E            | Orgs (rar)          | CP, Mem     | Mem, Orgs          | CP, Orgs    |
| EZH2            | NUC, Orgs, tw. CP   | NUC         | NUC, Orgs, tw CP   | NUC         |
| MRE11A          | FEHLT IMMER         | FEHLT IMMER | CP, tw.NUC         | CP, NUC     |
| SUV39H1         | Orgs, tw. NUC       | CP, Orgs    | Orgs, tw. NUC      | Orgs        |

|       |                  |               |                     |         |
|-------|------------------|---------------|---------------------|---------|
| RALB  | CP, NUC          | CP, NUC       | CP, Orgs, Mem       | CP, NUC |
| SRPK1 | CP, Mem (rar)    | CP            | CP, Mem (rar)       | CP      |
| PRKCZ | CP, tw. Orgs     | CP, Mem, Orgs | CP, tw. Orgs        | CP      |
| RRAS  | Mem, Orgs, Golgi | CP            | CP, Mem, Orgs (rar) | CP      |

| Genbe-<br>zeichnung: | Panc1                      |                               |                                  |                     |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------|
|                      | CFP                        |                               | YFP                              |                     |
|                      | 10% FKS                    | 0% FKS                        | 10% FKS                          | 0% FKS              |
| CDC20                | CP, Orgs, NUC              | CP, Orgs                      | FEHLT IMMER                      | CP, Orgs            |
| MAPRE2               | CP, tw. NUC                | CP                            | CP, tw. NUC                      | CP, NUC             |
| PKM2                 | CP, Orgs, NUC,<br>Artefakt | CP                            | CP, Orgs, Artefakt,<br>NUC (rar) | CP, Orgs (riesig)   |
| TSG101               | Orgs                       | Orgs                          | FEHLT IMMER                      | Zyto, Orgs          |
| NT5E                 | Orgs (rar)                 | CP, Golgi, Ves                | Mem, Orgs                        | CP, Orgs, Golgi, TJ |
| EZH2                 | NUC, Orgs, tw. CP          | NUC, CP                       | NUC, Orgs, tw CP                 | NUC, CP             |
| MRE11A               | FEHLT IMMER                | CP, Nuc (rar)                 | CP, tw. NUC                      | CP, NUC, Mem        |
| SUV39H1              | Orgs, tw. NUC              | CP, Orgs, NUC (rar),<br>Golgi | Orgs, tw. NUC                    | Orgs; NUC           |
| RALB                 | CP, NUC                    | CP, NUC                       | CP, Orgs, Mem                    | CP, Orgs, Mem       |
| SRPK1                | CP, Mem (rar)              | CP                            | CP, Mem (rar)                    | CP, NUC, Mem        |
| PRKCZ                | CP, tw. Orgs               | CP, Mem, Golgi                | CP, tw. Orgs                     | CP, NUC (rar)       |
| RRAS                 | Mem, Orgs, Golgi           | CP                            | CP, Mem, Orgs (rar)              | CP                  |

| Genbe-<br>zeichnung: | S2- 007             |                      |                     |             |
|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-------------|
|                      | CFP                 |                      | YFP                 |             |
|                      | 10% FKS             | 0% FKS               | 10% FKS             | 0% FKS      |
| CDC20                | CP, Orgs, NUC (rar) | Orgs?                | FEHLT IMMER         | FEHLT IMMER |
| MAPRE2               | CP                  | CP                   | CP                  | CP          |
| PKM2                 | CP, Orgs, Artefakte | CP                   | CP, Orgs, Artefakt  | CP, Orgs    |
| TSG101               | Orgs                | Orgs, CP (rar)       | FEHLT IMMER         | FEHLT IMMER |
| NT5E                 | Orgs (rar)          | CP, Orgs             | Mem, Orgs           | CP, Orgs    |
| EZH2                 | NUC, Orgs, tw. CP   | CP, Golgi, NUC (rar) | NUC, Orgs, tw CP    | Orgs        |
| MRE11A               | FEHLT IMMER         | CP, NUC              | CP, tw. NUC         | CP, NUC     |
| SUV39H1              | NUC, CP             | CP, Orgs             | Orgs, tw. NUC       | Orgs; NUC   |
| RALB                 | CP, NUC             | CP, NUC              | CP, Orgs, Mem       | CP, Orgs    |
| SRPK1                | CP, Mem (rar)       | CP                   | CP, Mem (rar)       | CP          |
| PRKCZ                | CP, tw. Orgs        | CP, Mem              | CP, tw. Orgs        | CP, NUC     |
| RRAS                 | Mem, Orgs, Golgi    | CP                   | CP, Mem, Orgs (rar) | CP, Orgs    |

**Tabelle 11: Zusammenfassende Gegenüberstellung der mindestens in 3 unabhängigen Durchläufen in parallelierten funktionellen Analysen im *reverse transfection* Format gesammelt Befunde.** Ausgewertet wurden die Daten der Lokalisationsbestimmungen inklusive der Morphologieveränderungen sowie funktionelle Effekte der Apoptoseinduktion, EMT, Proliferation nach der Überexpression der 79 Kandidaten und der PaCaNet-Gruppe in Hek293, Panc1 und S2-007 Zelllinien. Besonders starke, reproduzierbare Effekte sind durch ein „++“ und weniger starke Signale

sind durch „+“ gekennzeichnet. Die zweite Tabellenspalte „Auswahl“ markiert Kandidaten für die anschließend im *forward transfection* Format durchgeführte Validierung.

| Genkurzzeichen:  | Auswahl: | funktionelle Assays       |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
|------------------|----------|---------------------------|-------------|---|-------------------------|-------|------|--------------|-------|------|-------------|-------|------|-----------------|-------|------|-----------------|-------|------|-------------------|-------|------|--------|-------|------|--|--|--|
|                  |          | Lokalisationswechsel      |             |   | Morphologisch auffällig |       |      | Casp3-Signal |       |      | Ki67-Signal |       |      | CyclinB1 Signal |       |      | Vimentin Signal |       |      | E-Cadherin Signal |       |      |        |       |      |  |  |  |
|                  |          | HEK vs. Transf. +FCS/-FCS | CFP vs. YFP |   | HEK293                  | PANCI | S007 | HEK293       | PANCI | S007 | HEK293      | PANCI | S007 | HEK293          | PANCI | S007 | HEK293          | PANCI | S007 | HEK293            | PANCI | S007 | HEK293 | PANCI | S007 |  |  |  |
| ADRBK1           | X        |                           | +           |   |                         |       | +    |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| AMF/GPI          |          | +                         | +           | + |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| AMFR             |          |                           |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| Amplaxin/C TTN   |          | +                         |             |   |                         |       |      |              |       | ++   |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| ANXA2/Lipocortin |          |                           | +           |   |                         | +     |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| BAX              |          |                           |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CCL14            |          |                           | ++          |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CFL1             | X        |                           | +           |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CLDN7            |          |                           |             |   |                         |       | ++   | ++           | ++    |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CNK/CNKS R1      |          |                           |             |   |                         |       | +    |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CNR2             |          |                           |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| COPEB/KL F6      |          |                           |             |   |                         |       | +    |              |       |      | +           |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CPNE1            |          | +                         |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CRABP1           | X        |                           |             |   |                         |       |      |              |       |      | +           |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| CTSE             |          |                           | +           |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| DDR1             |          |                           | +           |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| EDNRA            |          |                           |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| ELF3             |          | +                         | +           | + |                         |       |      |              |       | ++   |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| FASTK            | X        |                           | ++          | + |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |
| G2AN/GAN AB      |          |                           |             |   |                         |       |      |              |       |      |             |       |      |                 |       |      |                 |       |      |                   |       |      |        |       |      |  |  |  |







|                                       |                |   |   |                          |
|---------------------------------------|----------------|---|---|--------------------------|
|                                       | <b>PAKA4</b>   | <b>filamentös, stark verzweigt</b>                  | <b>verzweigt, morphologisch verändert</b> | <b>keine Färbung</b>     |
|                                       | <b>PRKDC</b>   |   |   | <b>vermehrte Färbung</b> |
|                                       | <b>RRAS</b>    |   |   |                          |
|                                       | <b>SMURF 1</b> |   |   | <b>vermehrte Färbung</b> |
|                                       | <b>TM45SF1</b> |   |   |                          |
| <b>Spezifisch expremiert in PanIN</b> | <b>c8orf20</b> | <b>immens filamentös, stark verzweigt</b>           | <b>immens filamentös, langgestreckt</b>   |                          |
|                                       | <b>Cyp4F12</b> |   |   | <b>vermehrte Färbung</b> |
|                                       | <b>LGALS4</b>  |   |   | <b>vermehrte Färbung</b> |
|                                       | <b>POLR3K</b>  |   |   |                          |
|                                       | <b>RAB34</b>   |   |   |                          |
|                                       | <b>RABAC1</b>  |   | <b>stark verzweigt, filamentös</b>        |                          |
|                                       | <b>s100P</b>   |   |   |                          |
|                                       | <b>SOLE</b>    |   |   |                          |
|                                       | <b>TFF1</b>    |   |   | <b>vermehrte Färbung</b> |
| <b>Kontrollgene</b>                   | <b>KCMF</b>    | <b>Strukturveränderung, flächig, Kernfärbung</b>    |   |                          |
|                                       | <b>MMP2</b>    | <b>Strukturveränderung, Kernfärbung</b>             |   |                          |
|                                       | <b>PAI1</b>    | <b>Strukturveränderung, Kernfärbung</b>             |   |                          |
|                                       | <b>RAB20</b>   | <b>Strukturveränderung, flächig, Kernfärbung</b>    |   |                          |
|                                       | <b>SMAC</b>    | <b>flächig, Kernfärbung</b>                         |   |                          |
|                                       | <b>TGFBR1</b>  | <b>Strukturveränderung, flächig, Kernfärbung</b>    |   |                          |
|                                       | <b>TGFBR2</b>  | <b>Strukturveränderung, Kernfärbung</b>             |   |                          |
|                                       | <b>TIMP</b>    | <b>Strukturveränderung, flächig, starke Färbung</b> |   |                          |



|                                       | Gen-<br>bezeichnung:                         | Hek 293   |        |                |        |
|---------------------------------------|--|---|--------|----------------|--------|
|                                       |  | Vimentin  |        | E-<br>Cadherin |        |
|                                       |  | 10% FKS   | 0% FKS | 10% FKS        | 0% FKS |
| unterexpr<br>emiert im<br>PDAC        | BCKD   | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | DUSP1  |   |        |                |        |
|                                       | EBI2   |   |        |                |        |
| überexpr<br>emiert im PDAC            | AMFR   | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | CPNE1  | starke Vimentin<br>Färbung  |        |                |        |
|                                       | CRABP  | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | CST3   | Strukturveränderung ++  |        |                |        |
|                                       | ELF3   | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | EZH2   |   |        |                |        |
|                                       | G2AN   |   |        |                |        |
|                                       | JARID 1                                      |   |        |                |        |
|                                       | MAP3K11                                      | Strukturveränderung,<br>kaum Vimentinfärbung                        |        |                |        |
|                                       | MREAMA                                       |   |        |                |        |
|                                       | MSTR1  |   |        |                |        |
|                                       | NTSE   | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | PAKA4  |   |        |                |        |
|                                       | PRKDC  |   |        |                |        |
|                                       | RRAS   | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | SMURF 1                                      |   |        |                |        |
| TM45SF1                               | Strukturveränderung,<br>kaum Vimentinfärbung |   |        |                |        |
| spezifisch<br>expr<br>emiert in PanIN | c8orf20                                      | Strukturveränderung,<br>kaum Vimentinfärbung    Strukturveränderung |        |                |        |
|                                       | Cyp4F12                                      |   |        |                |        |
|                                       | LGALS4                                       |   |        |                |        |
|                                       | POLR3K                                       | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | RAB34  | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | RABAC1                                       |   |        |                |        |
|                                       | s100P  | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | SQLE   | Strukturveränderung   |        |                |        |
|                                       | TFF1   |   |        |                |        |
| Kontrollge<br>ne                      | KCMF   |   |        |                |        |
|                                       | MMP2   |   |        |                |        |
|                                       | PAI1   |   |        |                |        |

keine E- Cadherin- Färbung möglich

---

|               |                            |  |
|---------------|----------------------------|--|
| <b>RAB20</b>  | <b>Strukturveränderung</b> |  |
| <b>SMAC</b>   |                            |  |
| <b>TGFBR1</b> |                            |  |
| <b>TGFBR2</b> |                            |  |
| <b>TIMP</b>   |                            |  |

## **9. Danksagung**

Ich bedanke mich bei meiner Familie, die stets das Fundament für die Überwindung jeglicher Herausforderung gelegt hat.

Ich danke meinem Doktorvater, PD. Dr. Malte Buchholz, für seine unermüdliche Geduld, Verständnis, Bemühungen um eine Balance zwischen Autorität und dem Vertrauen in individuelle Entfaltung sowie stetige Begegnung auf Augenhöhe.

Ich danke meinem Lebenspartner, Herr Keven Schöpp, für die Begleitung durch die Augenblicke der Enttäuschung, Frust, aber auch auch Passion und Hoffnung.

Es ist mir ein besonderes Anliegen zwei Damen, Frau Eleni Aprin und Frau Bettina Geisel, für ihr Verständnis, Ermutigung, offenes Ohr, Rat und Tat sowie nahezu mütterliche Fürsorge herzlichst zu danken.

An dieser Stelle sei auch Frau Melanie Sauer für friedliche Jahre des gemeinsamen Arbeits im wahrscheinlich winzigsten Labor der Welt gedankt.

Ich danke auch allen Medizindoktoranden, unter anderem Antje Hülsemann, Elisabeth Glesel, Fabian Becker, Nai Ming Chen, die zur spätem Stunde und an den Wochenenden im Labor geisterten und mich immer gerne tatkräftig unterstützten.

Ein großer Dank geht auch an den Direktor der Inneren Medizin, Professor Dr. Thomas M. Gress, für seine stillen mühevollen Einsatz für seine Mitarbeiter und die Abteilung, der auch mir die Anfertigung der Doktorarbeit ermöglichte.

## 10. Angaben der Dissertationsverordnung

### 10.1 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover waren die Damen und Herren:

Anders-von Ahlften

Auling

Berger

Brakhage

Huchzermeyer

Hüppe

Irniger

Jacobsen

Kolb

Krings

Küster

Papenbrock

Richter

Schmidt

Schulz-Vogt

Steinlechner

Stelzer

Zorn

Meine akademischen Lehrer an der Tierärztlichen Hochschule Hannover waren die Damen und Herren:

Bicker

Esser

Hackbarth

Herrler

Kreienbrock

Leibold

Naim

Radespiel

Schierwater

Schmidt

Schuberth

Valentin-Weigand

Zimmer

Zimmermann

Meine akademischen Lehrer an der Medizinischen Hochschule Hannover waren die Damen und Herren:

Alves

Bautsch

Gerlach

Holtmann

Jacobs

Jürgens

Klos

Martin

Müller

Suerbaum

Szamel

Tiemann

Mein akademischer Lehrer am Fraunhofer Institut für Toxikologie und experimentelle Medizin in Hannover war der Herr:

Braun

Meine akademischen Lehrer an der Charité in Berlin waren die Herren:

Krüger

Rang