

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie und Endokrinologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. T. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

NFATc1 und p53 in der epithelial-mesenchymalen Transition des Pankreaskarzinoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nadine Völker
aus Aschaffenburg

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 30. Januar 2017.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. V. Ellenrieder

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. D. Bartsch

Für
Oma Marga & Tante Gerti

und
für meine Eltern

1.	Zusammenfassung / Summary	1
1.1	Zusammenfassung	1
1.2	Summary	2
2.	Einleitung	4
2.1	Das Pankreaskarzinom	4
2.2	<i>Der Nuclear factor of activated T-Cells (NFAT)</i>	5
2.2.1	Struktur	6
2.2.2	Regulation und Signalweg	6
2.2.3	Funktionen von NFATc1 während der Tumorprogression	9
2.3	Der Tumorsuppressor p53	11
2.4	Das Protoonkogen <i>KRAS</i>	13
2.5	Die epithelial-mesenchymale Transition	14
2.5.1	Die EMT-Marker	14
2.5.2	EMT während der Tumorprogression	16
2.6	Der Transkriptionsfaktor SOX 2	17
2.6.1	Struktur und Regulation	18
2.6.2	Funktionen von SOX2 während der Tumorgenese	18
2.7	Die MicroRNAs-200c und -34a	19
2.8	Die NKC-, KPC- und KNPC-Mausmodelle	20
2.8.1	Das NKC-Mausmodell	21
2.8.2	Das KPC-Mausmodell	21
2.8.3	Das KNPC-Mausmodell	22
3.	Zielsetzung	23
4.	Material und Methoden	24
4.1	Laborgeräte	24
4.2	Chemikalien und Enzyme	25
4.3	Kits	28

Inhaltsverzeichnis V

4.4	Labormaterialien	29
4.5	Zelllinien	30
4.6	Puffer	30
4.7	Methoden	33
4.7.1	Tierversuche	33
4.7.1.1	Transgene Mauslinie KNP ^{+/-} C	33
4.7.1.2	Haltung und Zucht der Versuchstiere	35
4.7.1.3	Genotypisierung der transgenen Mäuse	36
4.7.1.4	Entnahme der Organe und Aufbereitung des Gewebes	39
4.7.2	Histologische Untersuchung von Geweben	40
4.7.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.- Färbung)	40
4.7.2.2	Immunhistochemie	40
4.7.3	Protein-/ RNA- und DNA-Isolierung aus Pankreasgewebe	42
4.7.3.1	Proteinisolierung	42
4.7.3.2	RNA-Isolierung	42
4.7.3.3	DNA-Isolierung	43
4.7.4	Zellbiologische Methoden	44
4.7.4.1	Zellkultur	44
4.7.4.2	Zelltransfektion	45
4.7.4.3	Zellbehandlung mit CsA	47
4.7.4.4	Zeitreihenexperimente	47
4.7.4.5	Anlage von Zelllinien	48
4.7.5	Immunologische Methoden	48
4.7.5.1	Gewinnung von Zelllysat	48
4.7.5.2	Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse	49
4.7.5.3	Immunpräzipitation	53
4.7.5.4	Chromatin-Immunpräzipitation	54
4.7.6	RNA-Analyse mittels qRT-PCR	58
4.7.6.1	qRT-PCR-Analyse auf mRNAs	58
4.7.6.2	qRT-PCR-Analyse auf miRNAs	61
4.7.7	Immunfluoreszenz	63
4.7.9	Statistische Auswertung	64

5.	Ergebnisse	65
5.1	Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom geht mit Entdifferenzierung und epithelial-mesenchymaler Transition einher	65
5.2	In vitro führt der <i>Knockdown</i> des Tumorsuppressors p53 zu erhöhter Expression von EMT-Markern	67
5.3	Verlust von p53 durch Mutation oder Deletion resultiert in der Entwicklung NFATc1 vermittelter anaplastischer, metastasierender Tumore	71
5.4	MicroRNA-200c hemmt die Expression von EMT-Markern	78
5.5	In murinen Pankreastumoren mit NFATc1-Überexpression steigt das Expressionsniveau der EMT-Markern im Vergleich zur NFATc1-Wildtyp-Situation an	81
5.6	In vitro resultiert der <i>Knockdown</i> von NFATc1 in einer Abnahme der Expression von EMT-Markern in murinen sowie in humanen Zelllinien	84
5.7	NFATc1 bindet an Enhancern der EMT-Marker <i>ZEB 1</i> und <i>TWIST 1</i>	90
5.8	<i>SOX 2-Knockdown</i> nach NFATc1-Überexpression führt zu verminderter Expression von EMT-Markern in murinen und humanen Zelllinien	92
5.9	NFATc1 und SOX 2 sind im Zellkern colokalisiert und interagieren	95
5.10	SOX 2 beeinflusst die Bindung von NFATc1 an Enhancern der EMT-Marker <i>TWIST 1</i> und <i>SNAI 1</i>	96
5.11	Der Tumorsuppressor p53 beeinflusst über MicroRNA-Induktion den Effekt der Bindungspartner NFATc1 und SOX 2	98
6.	Diskussion	100
6.1	Konstitutiv nukleär exprimiertes NFATc1 führt im Pankreas zur Akzeleration der Tumorgenese	100

6.2	Der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion führt mit dem Hintergrund von konstitutiv exprimiertem NFATc1 zu EMT der Tumorzellen und Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms	101
6.3	NFATc1-Expression führt zur Induktion von und Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor SOX 2	103
6.4	Der p53-miRNA-Signalweg wirkt hemmend auf EMT, Entdifferenzierung und Fernmetastasierung des Pankreaskarzinoms	105
6.5	<u>Schlussfolgerung:</u> NFATc1 und p53 regulieren in gegenläufigen Signalwegen EMT, Entdifferenzierung und Metastasierung des Pankreaskarzinoms	107
7.	Literaturverzeichnis	109
8.	Anhang	118
8.1	Abbildungsverzeichnis	118
8.2	Tabellenverzeichnis	121
8.3	Abkürzungen	122
8.4	Schreibweisen	126
8.5	Verzeichnis der akademischen Lehrer	127
8.6	Danksagung	128

1. Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist mit seiner hohen Letalität eines der aggressivsten Malignome überhaupt. Eine wesentliche Ursache der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms ist die frühe Entstehung von Fernmetastasen.

Der *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) c1 wird als onkogener Transkriptionsfaktor sowohl in fortgeschrittenen PanIN-Läsionen als auch im invasiven Karzinom exprimiert und wurde als zentraler Regulator der Pankreaskarzinomplastizität identifiziert. Die progressionsfördernden Eigenschaften des Transkriptionsfaktors werden dabei maßgeblich durch die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 determiniert.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der Mechanismus und die funktionelle Konsequenz der gegenläufigen NFATc1- und p53-abhängigen Regulation des onkogenen Transkriptionsfaktors SOX 2. NFATc1 induziert durch Enhancer-Bindung am SOX 2 Gen dessen Transkription, während p53 durch MicroRNA-Induktion posttranskriptionell die Funktion von SOX 2 hemmt. Die Dysregulation dieses Gleichgewichtes, z.B. im Kontext der p53-Inaktivierung oder im Rahmen einer konstitutiven NFATc1-Aktivierung in Pankreaskarzinomzellen, mündet in einer gesteigerten SOX 2-Expression und führt durch konsekutive transkriptionelle Aktivierung von ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 zur Induktion epithelial-mesenchymaler Programme. Durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) erlangen die Zellen eine gesteigerte Motilität sowie die Fähigkeit in entfernte Organe zu disseminieren und Fernmetastasen zu bilden. Dabei ist es unerheblich, ob die Funktion von TP53 durch Deletion oder Mutation inaktiviert wurde, da nicht der Zugewinn onkogener Fähigkeiten (*gain-of-function*-Mutation), sondern der tatsächliche Verlust der tumorsuppressiven p53-Aktivität die

Voraussetzung für die NFATc1-SOX 2-abhängige Pankreaskarzinomprogression darstellt.

Die Identifikation dieses hierarchisch angeordneten Netzwerkes von gegenläufigen Signalwegen in der Kontrolle der Tumorplastizität offenbart neue zielgerichtete therapeutische Strategien für die Behandlung des Pankreaskarzinoms.

1.2 Summary

The ductal adenocarcinoma of the pancreas is one of the most aggressive solid tumor entities. The dismal prognosis of PDAC is primarily caused by the early formation of distant metastases.

The nuclear factor of activated T-cells (NFAT) c1 is an oncogenic transcription factor that is expressed both in advanced PanIN lesions and in invasive pancreatic cancer and was identified as a central player in the progression of PDACs. Importantly, the oncogenic potential of NFATc1 is significantly determined by the inactivation of the tumorsuppressor p53.

The main focus of this thesis is the elucidation of the mechanism and the functional consequences of antithetical NFATc1- and p53-signaling in the regulation of the oncogenic transcription factor SOX 2. NFATc1 induces SOX 2 transcription by direct enhancer binding, while p53 posttranscriptionally inhibits the activity of SOX 2 by inducing the expression of SOX 2-targeting microRNAs. The imbalance of these two mechanisms, for example in context of p53-inactivation or as a consequence of constitutive NFATc1 activation in pancreatic cancer cells leads to an increased expression of SOX 2 and results in the induction of epithelial to mesenchymal transition programs by consecutive transcriptional activation of ZEB 1, TWIST 1 and SNAI 1. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) increases the motility and invasive capacities of PDAC cells and facilitates the formation of distant metastases.

Since NFATc1-SOX 2-dependent pancreatic cancer progression occurs upon *TP53* mutation and deletion, not the gain-of-function mutation, but the inactivation of tumorsuppressive p53 activity is required for full-blown activity of the NFATc1-SOX 2-axis.

The identification of the hierarchial network of antithetical pathways that influence pancreatic cancer cell plasticity might reveal novel therapeutic strategies for pancreatic cancer treatment.

2. Einleitung

2.1 Das Pankreaskarzinom

Mit einer Inzidenz von 15/100 000 Einwohnern jährlich und einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 8 % zählt das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zu den aggressivsten Tumoren überhaupt. Es weist die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf und stellt die vierthäufigste Krebstodesursache dar. Die Zahl der Neuerkrankungen ist nach wie vor steigend und trotz zahlreicher Studien in den letzten Jahren hat sich die Prognose kaum verbessert. Charakteristika des aggressiven Karzinoms sind das Fehlen spezifischer Frühsymptome, eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie die frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung, an welcher die Patienten durchschnittlich 12 Monate nach Diagnosestellung versterben. Nur eine Minderheit (~15 %) der Patienten werden in einem lokalisierten Tumorstadium diagnostiziert und haben durch radikale Tumoresektion die Chance auf eine kurative Therapie (Robert Koch Institut 2010).

Die Entstehung eines PDACs ist ein schrittweise ablaufender Prozess. Zunächst entstehen nicht-invasive Vorläuferläsionen, die nach ihrem histologischen Erscheinungsbild klassifiziert werden: PanINs (*pancreatic intraepithelial neoplasia*), MCNs (*mucinous cystic neoplasia*) und IPMNs (*intraductal pancreatic mucinous neoplasia*), wobei die PanINs am häufigsten auftreten. Die Prävalenz der PanINs, die zumeist im Kopf der Drüse lokalisiert sind, nimmt mit dem Alter der Patienten zu. Nach ihrer Morphologie unterteilt man folgende Formen: PanIN-1-Läsionen sind aus säulenartigem Epithel mit basalständigen Zellkernen aufgebaut, es gibt muzinöse (PanIN-1A) und papilläre (PanIN-1B) Formen. In PanIN-2-Läsionen finden sich mittelgradige Kerndysplasien. PanIN-3-Läsionen mit schweren Dysplasien gelten als Hochrisikoläsionen und werden als Carcinoma in situ bezeichnet (Hruban et al. 2008). Des Weiteren finden sich in allen Stadien lobulozentrische Atrophien, welche durch die

Obstruktion der kleinen Gänge entstehen und zum Aufstau des Bauchspeichels führen. Dies resultiert wiederum in Inflammationen, welche die Progression der PanINs begünstigen. Es hat sich außerdem gezeigt, dass PanIN-Läsionen mit einer *acinar to ductal metaplasia* assoziiert sind, also ursprünglich aus Azini und nicht aus Gangepithel entstehen, was den ersten Schritt der Progression vom gesunden Pankreasgewebe zum Karzinom darstellt (Brune et al. 2006; Detlefsen et al. 2005; Zhu et al. 2007; Chen et al. 2015). Hierbei finden zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen statt. Bereits ab den frühen PanIN-1-Läsionen finden sich Mutationen im *KRAS*-Gen, es folgt die Inaktivierung der Tumorsuppressoren p16 und p53. Die Prävalenz von parallel auftretenden Mutationen steigt mit dem Grad der Dysplasie in den Vorläuferstadien des Pankreaskarzinoms (Hruban et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Faktor während der Progression von PanIN-1-Läsionen zum invasiven Karzinom stellt die Expression von NFATc1 dar, welche von 20 % in frühen Vorläuferstadien auf 70 % im Karzinom steigt (Baumgart et al. 2012). Auf dieses Protein soll im Folgenden näher eingegangen werden.

2.2 Der Nuclear factor of activated T-Cells (NFAT)

Wie die Terminologie vermuten lässt, wurde der *Nuclear factor of activated T-Cells*, kurz NFAT, erstmalig in T-Lymphozyten identifiziert und als Transkriptionsfaktor, der die Expression von Interleukin-2 initiiert, beschrieben (Shaw et al. 1988). Mittlerweile ist bekannt, dass die verschiedenen Isoformen von NFAT ubiquitär vorkommen und zahlreiche Funktionen innehaben. NFAT-Proteine nehmen Einfluss auf das Zellwachstum, das Überleben der Zelle, die Motilität und Invasionsfähigkeit sowie die Angiogenese (Mancini und Toker 2009).

2.2.1 Struktur der NFAT-Proteine

Die Familie der NFAT-Proteine umfasst fünf Mitglieder: NFATc1-c4 und NFAT 5. Alle Isoformen besitzen verschiedene Splice-Varianten und können im Amino- und Carboxy-Terminus differieren. Die durch Calcium regulierten Isoformen NFATc1-c4 weisen hochkonservierte Strukturen auf (Abbildung 1).

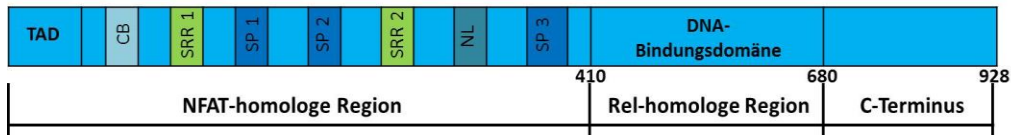


Abb. 1: Schematische Darstellung der primären Struktur von NFATc1-c4. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl der Basenpaare. TAD: Transaktivierungsdomäne, CB: Calcineurin-Bindungsstelle, SRR: Serin reiche Region, SP: Serin-Prolin reiche Region, NL: Nukleäre Lokationssequenz.

Die zahlreichen Serinreste (SRR und SP) sind im Ruhezustand phosphoryliert, maskieren die nukleäre Lokationssequenz und bedingen somit die zytosolseitige Lokalisation der NFAT-Proteine (Mancini und Toker 2009).

2.2.2 Regulation und Signalweg

Charakteristisch für die Proteine NFATc1-c4 ist die Regulation durch Calcium und die Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Serin-Phosphatase Calcineurin (Abbildung 2). NFAT 5 besitzt keine Bindungsstellen für Calcineurin und ist nicht Calcium-sensitiv, ist konstitutiv im Zellkern lokalisiert und wird durch osmotischen Stress aktiviert (Lopez-Rodríguez et al. 1999).

In ruhenden Zellen liegen NFAT-Proteine stark hyperphosphoryliert im Zytosol vor. Nach Stimulation wird Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Dies führt durch *Inside-out Signaling* zur Öffnung membranständiger Ca^{2+} -Kanäle und einer steigenden intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (Crabtree und Olson 2002). Calmodulin interagiert dann mit der Phosphatase Calcineurin, welche die Dephosphorylierung der

Serinreste bedingt, dadurch wird die nukleäre Lokationssequenz freigegeben und NFAT in den Zellkern transloziert (Mancini und Toker 2009). Inaktivierung und nukleärer Export der NFAT-Proteine erfolgt wiederum phosphorylierungsabhängig durch die Aktivität nukleärer Exportkinasen (Neal und Clipstone 2001).

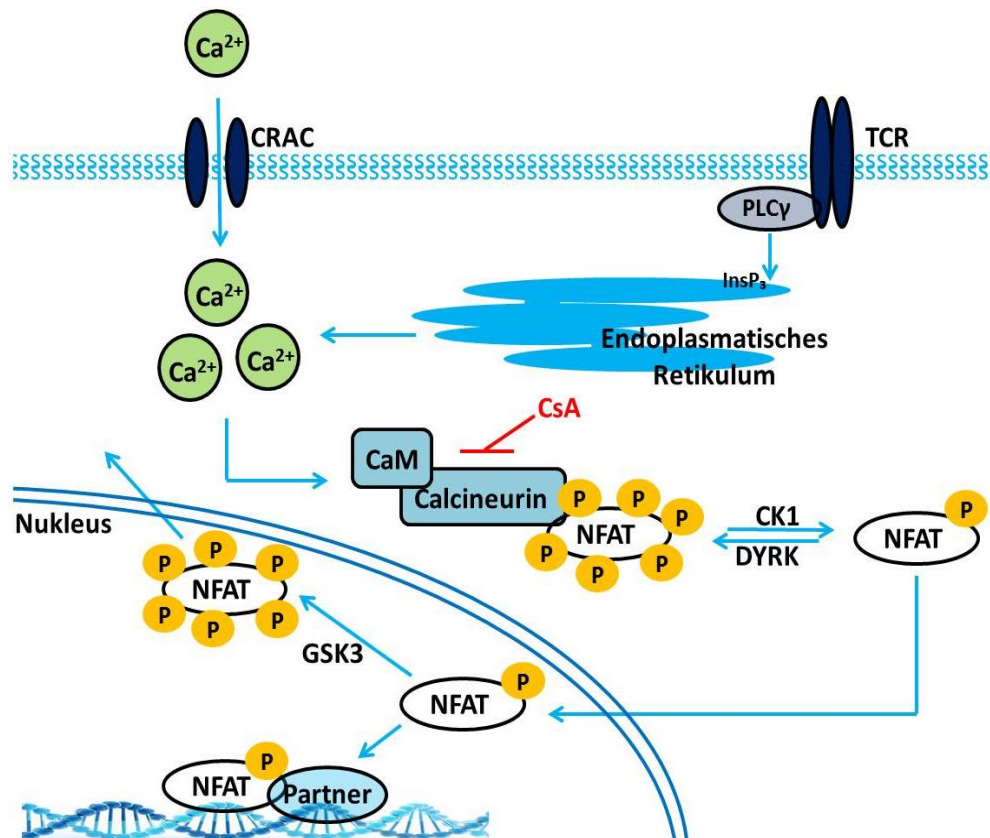


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -/Calcineurin-/NFAT-Signalweges. Die Stimulation der Zelle etwa durch Ligandenbindung an den T-Zell-Rezeptor (TCR) führt über die Aktivierung der Phospholipase $\text{C}\gamma$ (PLC γ) und deren Spaltprodukt Inositoltrisphosphat (InsP_3) zu einer Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma werden CRAC-Kanäle (CRAC = *calcium release-activated Ca^{2+} -Channel*) in der Zellmembran geöffnet und ein kontinuierlicher Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum gewährleistet. Calmodulin (CaM) interagiert nach Calcium-Bindung mit Calcineurin, der Phosphatase, welche die Dephosphorylierung von zytoplasmatischem, durch CK1 und DYRK hyperphosphoryliertem, NFAT katalysiert. Die Translokation des dephosphorylierten NFAT in den Zellkern führt zur Aktivierung der Transkription am Zielgen gemeinsam mit Partner-Transkriptionsfaktoren. Nach Rephosphorylierung durch nukleäre Exportkinasen, beispielsweise GSK3, findet der Retransport von NFAT ins Zytoplasma statt.

Die Module des Ca^{2+} -/Calcineurin-/NFAT Signalweges können auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden, zum Beispiel durch einen veränderten Ca^{2+} -Einstrom (Takayanagi et al. 2002; Chen et al. 2003). Außerdem wird die Aktivität von Calcineurin auch Ca^{2+} -unabhängig durch endogene Inhibitoren reguliert, deren Expression unter anderem durch NFAT selbst induziert wird (Yang et al. 2000). Des Weiteren modulieren zahlreiche Serin/Threonin-Kinasen die Aktivität von NFAT. So gilt etwa CK-1 als Erhaltungs- und Exportkinase und ist für die Phosphorylierung des SRR-1-Motivs verantwortlich (Okamura et al. 2004). PKA und DYRK sind sogenannte Priming-Kinasen, welche die SP-Motive vorphosphorylieren (Neal und Clipstone 2001). Pharmakologisch kann Calcineurin durch Cyclosporin A (CsA) oder FK 506 (Tacrolimus) inhibiert werden, wodurch NFAT im Zytoplasma akkumuliert. Dieser Effekt wird therapeutisch bei der Immunsuppression nach Organtransplantation ausgenutzt (Martínez-Martínez und Redondo 2004).

Nukleäre NFAT-Transkriptionsfaktoren binden im Zellkern die DNA ihrer Zielgene über ihre Konsensus-Sequenz GGAAA als Homo- oder Heterodimere. Sie können mit anderen Transkriptionsfaktoren zelltypspezifisch kooperieren und so gemeinsam mit einem Partner eine hocheffiziente Bindung an Enhancern oder Promotoren ihrer Zielgene hervorrufen. Die Funktion des Transkriptionsfaktors NFAT kann so maßgeblich über die Art des transkriptionellen Partners, durch Stabilisation und Spezifikation, beeinflusst werden (Mancini und Toker 2009). Im Pankreaskarzinom konnte unter anderem der onkogene Transkriptionsfaktor STAT 3 als Partnerprotein von NFATc1 identifiziert werden (Baumgart et al. 2014).

2.2.3 Funktionen von NFATc1 während der Tumorprogression

Im Jahr 2003 konnte eine Studie von Neal und Clipstone zeigen, dass NFATc1 als Transkriptionsfaktor mit onkogenem Potential agiert (Neal und Clipstone 2003). Robbs et al. (2008) konnten dies bestätigen, indem sie aufzeigten, dass die anhaltende Aktivierung von NFATc1 in Fibroblasten zur Transformation der Zellen und Koloniebildung führt. Zahlreiche Studien in den letzten Jahren, sowohl im Tierversuch als auch an humanen Pankreasgeweben, bestätigten das ubiquitäre Vorkommen und zeigten weitere Funktionen von NFATc1 außerhalb des Immunsystems auf (Kao et al. 2009; Li et al. 2011). NFATc1 agiert als Aktivator der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) während der Embryogenese und ist so an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen verschiedener Gewebe, beispielsweise von Keratinozyten oder Skelett- und Herzmuskelzellen, beteiligt (Graef et al. 2001; Mancini und Toker 2009). Der Transkriptionsfaktor übt außerdem modulierende Funktionen in Bezug auf die Migrationsfähigkeit von Epithelzellen aus (Thiery 2002; Jönsson et al. 2002), beeinflusst die Physiologie von Stammzellen als Regulator der Balance zwischen ruhendem und proliferierendem Zustand (Mani et al. 2008), spielt eine Rolle während der Angiogenese (Nagy et al. 2007) und trägt entscheidend zur Progression maligner Tumoren bei.

Die Analyse von PDACs erbrachte die Erkenntnis einer ektopen Expression und Aktivierung von nukleärem NFATc1 in 16 von 23 untersuchten humanen Pankreaskarzinomgeweben und dabei besonders in entzündlich verändertem Gewebe (Buchholz et al. 2006). Außerdem konnte im Tierversuch eine durch Entzündung getriggerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden, dies demonstriert deutlich die onkogenen Funktionen des Transkriptionsfaktors. So führte im Tierversuch die Aktivierung von NFATc1, sowohl durch induzierte Inflammation (durch Caerulein) als auch durch transgenetisch forcierte Überexpression von NFATc1 zur Akzeleration von KRAS-getriebener Karzinogenese, die in

rascher Progression zum Karzinom resultierten (Baumgart et al. 2014). Die Expression von NFATc1 im Pankreaskarzinom korreliert dabei mit einem aggressiven Phänotyp. Weder in Azinuszellen, noch in den Zellen der Ausführungsgänge von gesundem Pankreasgewebe, noch in den frühen PanIN-1-Läsionen wird NFATc1 exprimiert. Erst in den fortgeschrittenen Läsionen sowie im Karzinom konnte die Expression des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden (Baumgart et al. 2012).

Einige Mechanismen, durch welche NFATc1 Tumorprogression fördert, konnten bereits dargestellt werden. In Kooperation mit NFκB und STAT 3 aktiviert NFAT Gene, die an Tumorzellproliferation und Migration beteiligt sind, beispielsweise die für Cyclin D1, Bcl-2, E-Cadherin und für EMT-Marker wie SNAI 1 codierenden Gene (Bollrath und Greten 2009). Auch die zellzyklusregulierenden Gene von CDK4 und CDK6 sind transkriptionelle Ziele von NFATc1 (König et al. 2010). Außerdem ist NFATc1 ein Regulator von *c-Myc*, einem Protoonkogen, das einen Mastertranskriptionsfaktor der G1-Progression codiert (Buchholz und Ellenrieder 2007; König et al. 2010; Hessmann et al. 2015). Zusammenfassend führt die Aktivierung von NFATc1 zu gesteigerter G1/S-Transition während des Zellzyklus und damit zur Proliferation von Tumorzellen. Diese proliferationsfördernden Funktionen von NFAT-Proteinen konnten *in vitro* bestätigt werden. Durch Inhibition des Ca²⁺-/Calcineurin-Signalwegs mit Cyclosporin A bzw. durch genetische Depletion von NFATc1 konnte die Proliferation kultivierter Pankreaskarzinomzellen signifikant abgeschwächt werden (Buchholz und Ellenrieder 2007).

Konstitutiv aktiviertes nukleäres NFAT wurde nicht nur in PDACs nachgewiesen, sondern unter anderem in Mamma-Karzinomen (Jönsson et al. 2002), Burkitt-Lymphomen (Marafioti et al. 2005), B- und T-Zell-Lymphomen (Pham et al. 2005) und Ewing-Sarkomen (Neal und Clipstone 2001).

NFATc1 nimmt eine zentrale Rolle während Genese und Progression maligner Tumoren ein, dies begründet das wissenschaftliche Interesse an diesem Transkriptionsfaktor und stellt ein Ziel neuer Therapieansätze dar.

2.3 Der Tumorsuppressor p53

Beim Tumorsuppressor p53 handelt es sich um eine der wichtigsten Kontrollinstanzen während des Zellzyklus. Er bewahrt als „Wächter des Genoms“ die genomische Integrität der Zelle, indem er die Weitergabe von während des Zellzyklus aufgetretenen DNA-Schäden an die Tochterzellen verhindert (Lane 1992). Aktiviertes p53 induziert Apoptose oder Zellzyklusarrest, welcher transient oder permanent (Seneszenz) stattfinden kann und nimmt somit inhibierend Einfluss auf unkontrolliertes Zellwachstum, supprimiert Tumorgenese durch die Regulation von Zelldifferenzierung, EMT und der Initiation stammzellähnlicher Eigenschaften, gewährleistet die Reparatur von DNA-Schädigungen und moduliert metabolische Signalwege (Oren 2003; Lane und Levine 2010; Goldstein 1990). Das codierende Gen *TP53* ist das am häufigsten mutierte Gen in humanen Tumoren, so weisen über 80 % der Malignome dysfunktional veränderte Signalwege von p53 auf (Rokavec et al. 2014; Olivier et al. 2010; Vousden und Prives 2009; Rokavec et al. 2014).

Prominente Ziele des Tumorsuppressors sind Bax als Aktivator von Apoptose (Hengartner 2000) sowie p21 und p27, welche G1- bzw. G2-Zellzyklusarrest induzieren (Sakaguchi et al. 2000; Taylor und Stark 2001). Auch miRNAs als wichtige Mediatoren der Funktion von p53 konnten als Ziele des Tumorsuppressors identifiziert werden (Hermeking 2010; Navarro und Lieberman 2015).

Die Störung der Signalwege von p53, z.B. aufgrund von Mutationen, führt zum Verlust der Tumorsuppressorfunktion, somit zur Dysregulation der Zellhomöostase und letztlich zur Entstehung maligner Tumore.

Die Charakterisierung von 15 Zelllinien aus humanen PDACs zeigte auf, dass 73 % Mutationen des *TP53* aufweisen (Sun et al. 2001). In Karzinomen mit einer niedrigen *TP53*-Mutationsrate ist der Tumorsuppressor häufig durch alternative genetische oder epigenetische Mechanismen inaktiviert (Scheffner et al. 1990). HDM-2, als wichtigster Negativregulator, ist in Sarkomen regelmäßig überexprimiert, was ebenfalls zur Inaktivierung von p53 führt (Wade et al. 2013). Außerdem entfällt der fördernde Einfluss von p53 auf die Expression und Ausreifung von MicroRNAs, dies resultiert ebenfalls in Tumorprogression und Entdifferenzierung (Dong et al. 2013; Liu et al. 2013).

Es ist jedoch nicht alleine der Verlust der Tumorsuppressorfunktion der die Progression von Karzinomen begünstigt. Sogenannte *gain-of-function*-Mutationen verleihen p53 onkogene Funktionen, beispielsweise die Förderung von Tumorzellproliferation, Anti-Apoptose, Tumor-Angiogenese, Metastasierung und Einfluss auf den Metabolismus. Es konnten verschiedene Mechanismen beschrieben werden, durch welche mutiertes p53 seine onkogenen Funktionen ausübt (siehe Abbildung 3; nach Liu et al. 2013).

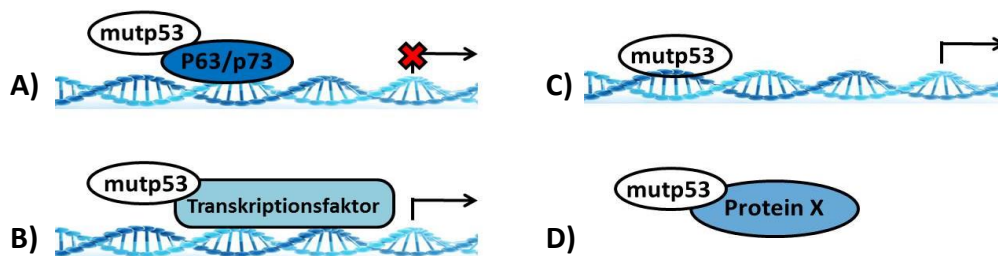


Abb. 3: Schematische Darstellung der onkogenen Mechanismen von p53 durch *gain-of-function*-Mutationen. **A)** Interaktion mit p63/p73 führt zur Inhibition derer transkriptionellen Aktivität (Gaiddon et al. 2001; Li und Prives 2007). **B)** Interaktion mit Transkriptionsfaktoren führt zu deren Aktivierung (Di Agostino et al. 2006) **C)** Mutp53 kann durch DNA-Bindung direkt die Expression von Genen erwirken (Brosh und Rotter 2009). **D)** Durch Interaktion mit verschiedenen Proteinen erzeugt mutp53 genomische Instabilität (Song et al. 2007; Restle et al. 2008).

Zusammenfassend spielen Mutationen des *TP53* eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese und Tumorpheriferation. Ob dabei der Verlust der Tumorsuppressorfunktion oder der Zugewinn von onkogenem Potential überwiegt, ist für jede Tumorentität individuell und wird in den kommenden Jahren Gegenstand der Forschung bleiben.

2.4 Das Protoonkogen *KRAS*

Das Produkt des humanen *KRAS*-Gens fungiert als essenzielles Element in diversen Signaltransduktionswegen, welche in die Regulation der Zellhomöostase eingreifen. Die physiologische Funktion von *KRAS* besteht darin, durch Aktivierung der entsprechenden Signalwege das Wachstum und die Differenzierung von neuen Zellen zu fördern. Mutationen führen zum Kontrollverlust und spielen eine entscheidende Rolle während der Proliferation maligner Tumore (Kranenburg 2005).

Bei vielen Karzinomerkrankungen lassen sich Punktmutationen von *KRAS* nachweisen. Eine häufige Folge solcher Mutationen ist der Aktivitätsverlust der GTPase, die zur Beendigung des *KRAS*-Signals notwendig ist. Dadurch bleibt *KRAS* konstitutiv aktiv, kumuliert und führt zu unkontrollierter Proliferation der Zellen (Kranenburg 2005).

KRAS-Mutationen können in 70 - 90 % der PDACs nachgewiesen werden, womit das Pankreaskarzinom der Tumor mit der höchsten Rate an *KRAS*-Mutationen unter allen humanen Karzinomen ist (di Magliano und Logsdon 2013; Immervoll et al. 2006; Lee et al. 2007). Die häufigste Mutation findet sich hierbei im Codon 12, weswegen die Mutation als *KRAS*^{G12D} bezeichnet wird (Miglio et al. 2014). Jedoch ist diese Mutation alleine nicht ausreichend um einen aggressiven Phänotyp des Pankreaskarzinoms hervorzurufen, hierfür werden Mutationen in weiteren Genen, zum Beispiel *TP53*, benötigt.

Auch Amplifikationen des *KRAS*-Gens konnten in einigen Karzinomarten, zum Beispiel dem Kolonkarzinom, nachgewiesen werden (Valtorta et al. 2013).

2.5 Die epithelial-mesenchymale Transition

Als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet man den Wechsel von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp, welchem sich Zellen unter bestimmten Umständen unterziehen. Epitheliale Zellen haben eine apikale und eine basale Seite, sie sind über Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel E-Cadherin, mit den Nachbarzellen verbunden. Zellen mit mesenchymaler Differenzierung haben keine interzellulären Verbindungen und keine apikobasale Polarität. Sie können sich durch Delamination aus Zellverbänden lösen und erlangen so die Fähigkeit zu migrieren. Sie exprimieren vornehmlich mesenchymale Marker, wie zum Beispiel Vimentin (Lim und Thiery 2012). Die Transition ist nicht irreversibel. Mesenchymale Zellen können die Basalmembran anderer Gewebe durchdringen und sich dort erneut einer Transition vom mesenchymalen zum epithelialen Phänotyp unterziehen. Dieser Mechanismus nennt sich mesenchymal-epitheliale Transition, kurz MET (Davies 1996).

2.5.1 Die EMT-Marker ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1

Als Aktivatoren von EMT spielen die Transkriptionsfaktoren ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch bei der Progression und Metastasierung epithelialer Tumore eine entscheidende Rolle.

ZEB 1 ist ein Transkriptionsfaktor, der über seine *Zinc-finger E-box-binding homeobox-1* die Expression epithelialer Gene, wie zum Beispiel E-Cadherin, reprimiert (Brabletz und Brabletz 2010; Williams et al. 1991). Über den TGF- β -Signalweg wird ZEB 1 induziert und epitheliale Zellen können so zu

EMT gezwungen werden. Der *Knockdown* von ZEB 1 führt hingegen zu einer mesenchymal-epithelialen Transition (Aigner et al. 2007). Es existiert außerdem ein negativer Regelkreis zwischen dem EMT-Marker und Mitgliedern der miR-200-Familie. Abhängig von extrazellulären Signalen kann der Regelkreis in beide Richtungen beeinflusst und somit entweder ein epithelialer oder ein mesenchymaler Phänotyp stabilisiert werden (Burk et al. 2008). ZEB 1 wurde als zentraler Aktivator von EMT in humanen Karzinomen identifiziert, zum Beispiel in Prostata, Kolon, Mamma und Pankreas (Brabletz und Brabletz 2010).

Das Protein TWIST 1 gehört zur Familie der *Basic-Helix-Loop-Helix*-Transkriptionsfaktoren (bHLH). Die Expression wird durch verschiedene Signalwege, wie z.B. Protein-Kinase B-, STAT 3-, Wnt- und Ras-Signalwege, induziert und führt zur Expression von mesenchymalem N-Cadherin (Yang et al. 2004). Eine Überexpression führt zur Entstehung von Melanomen und T-Zell-Lymphomen (Yang et al. 2006). Auch in Mamma- (Yang et al. 2004), Magen- (Rosivatz et al. 2002), Prostata- (Kwok et al. 2005) und Blasenkarzinomzellen (Yun und Kim 2013) und in Karzinomen aus dem Nasopharyngealraum (Zhang et al. 2013) konnte eine gesteigerte Expression von TWIST 1 beobachtet werden. Auch in humanen PDACs wurde nach Stimulation durch Hypoxie die Expression von TWIST 1 nachgewiesen (Hotz et al. 2007).

SNAI 1, auch bekannt als Snail, ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und agiert als Repressor ektodermaler Gene, vor allem von E-Cadherin, und damit als Aktivator von EMT. Die Expression von SNAI 1 wird durch den Wnt-Signalweg und über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen initiiert, welche von FGF, EGF oder PDGF stimuliert werden können. Auch Hypoxie führt zur vermehrten Expression von SNAI 1, dies wurde bisher vor allem in Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen. Neben der Initiation von EMT verhindern die Mitglieder der SNAI-Familie zusätzlich die Einleitung von Apoptose (Barrallo-Gimeno und Nieto 2005). Aufgrund dessen wird SNAI 1 als Frühmarker für Tumormalignität angesehen und wurde in zahlreichen

Karzinomarten, wie Mamma- (Blanco et al. 2002), Magen- (Rosivatz et al. 2002), Kolon- (Pálmer et al. 2004) und Pankreaskarzinom (Hotz et al. 2007), im hepatozellulärem Karzinom (Sugimachi et al. 2003) sowie in Sarkomen (Saito et al. 2004) nachgewiesen.

2.5.2 EMT während der Tumorprogression

EMT ist ein essenzieller, evolutionär konservierter Prozess, der während der Entwicklung eines Embryos abläuft und letztlich zu Spezifizierung und Differenzierung von Zellen führt. Sowohl die Histogenese als auch die Organogenese sind abhängig von einem Phänotypwechsel der Zellen. Die Transition findet nur in streng definierten Zellpopulationen statt. Zellspezifisch beeinflussen die Komponenten der Extrazellulärmatrix und Wachstumsfaktoren sowie parakrine und autokrine Signale die Initiation und Regulation von EMT. SNAI 1, ZEB 1 und TWIST 1 üben hierbei einen bedeutenden Einfluss auf die Zellplastizität aus (Lim und Thiery 2012).

Auch in Karzinomen finden Phänotypwechsel der Zellen statt. Der relevante Unterschied liegt in der Art der Zelle, die die Transition durchläuft. Eine Tumorzelle ist genetisch und epigenetisch verändert und hat die Responsivität auf wachstumsregulierende Signale verloren. In diesem Kontext führt EMT zur Progression des Tumors und beeinflusst dessen Aggressivität.

Karzinome entstammen epithelialen Zellen und sind zu Beginn meist von der Basalmembran des Epithels abgegrenzt. Jedoch haben sie die Fähigkeit das umliegende Gewebe zu infiltrieren und in Blut- und Lymphgefäße einzudringen. Karzinomzellen, die im Blutsystem zirkulieren, können dieses an anderer Stelle verlassen, in das Parenchym entfernter Organe eindringen und dort Fernmetastasen des Primärtumors formieren (Talmadge und Fidler 2010). Fernmetastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, dessen zahlreiche Stufen denen der Transitionen, welcher sich Zellen während der Embryogenese unterziehen, nahezu gleichen. Diese

Beobachtung lässt vermuten, dass die Wiederaufnahme von EMT und MET aus der Embryogenese einen entscheidenden Mechanismus bei der Metastasierung von Karzinomen darstellt (Kalluri und Weinberg 2009).

Neben der Progression des Tumors bis hin zur Fernmetastasierung wird EMT mit einem zweiten wichtigen Faktor tumorbezogener Mortalität in Verbindung gebracht: Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika. Beide Prozesse sind eng mit einem dritten verknüpft, dem Zugewinn stammzellähnlicher Eigenschaften und somit einer Resistenzentwicklung gegenüber Apoptosesignalen und dem Verlust der Fähigkeit zur Seneszenz (Morel et al. 2008; Yu et al. 2007).

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass EMT eine zentrale Rolle in der Entstehung, Progression und der Metastasierung des Pankreaskarzinoms spielt. EMT wird dabei durch zahlreiche Trigger induziert, darunter die EMT-Marker, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hypoxie. Die Initiation der Transition führt zum Zugewinn von malignem Potential der Tumorzellen, weswegen die Regulatoren von EMT als therapeutische Ziele in Betracht gezogen werden müssen (Satoh et al. 2015).

2.6 Der Transkriptionsfaktor SOX 2

SOX 2, kurz für *sex determining region Y-box 2*, ist ein Transkriptionsfaktor, welcher essenzielle Funktionen für die Aufrechterhaltung der pluripotenten Eigenschaften von undifferenzierten embryonalen und neuronalen Stammzellen erfüllt. Auch in adulten Stammzellen wird SOX 2 exprimiert und reguliert die Homöostase von differenzierten Geweben. Durch die Fähigkeit in differenzierten Zellen stammzellähnliche Eigenschaften hervorzurufen, kann die Dysregulation der SOX 2-Expression zur Entwicklung maligner Tumorerkrankungen, wie dem Pankreaskarzinom, beitragen (Sarkar und Hochedlinger 2013).

2.6.1 Struktur und Regulation

Alle Mitglieder der SOX-Familie besitzen eine hoch konservierte DNA-Bindungs-Domäne, die HMG (*high-mobility group*)-Box, die etwa 80 Aminosäuren umfasst (Rizzino 2009). Über diese aktiviert SOX 2 Gene zur Selbsterneuerung und unterdrückt Gene deren Transkription zu Differenzierung führen. Um eine regelrechte embryonale Entwicklung zu gewährleisten, ist die Expression von SOX 2 streng reguliert. Extrazelluläre Signale werden gewebsspezifisch interpretiert und es findet eine zellspezifische Interaktion mit Cofaktoren statt. SOX 2 fördert unter anderem die Expression von positiven Regulatoren der Pluripotenz: Klf4, Oct-4, Nanog und SOX 2 selbst (Sarkar und Hochedlinger 2013).

2.6.2 Funktionen von SOX 2 während der Tumorgenese

SOX 2 ist an der Entstehung von Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften beteiligt und beeinflusst so das Zellwachstum und die Tumorgenese. Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften sind mit aggressivem Tumorwachstum, Metastasierung und Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika assoziiert (Herreros-Villanueva et al. 2013).

In verschiedenen Tumorarten, wie dem Bronchialkarzinom (Lu et al. 2010), Prostatakarzinom (Kregel et al. 2013), Kolonkarzinom (Tani et al. 2007) und dem Pankreaskarzinom (Herreros-Villanueva et al. 2013) konnte bisher eine Überexpression von SOX 2 nachgewiesen werden. Diese Überexpression resultiert sowohl aus epigenetischen als auch genetischen Veränderungen, vor allem aus Genamplifikation (Alonso et al. 2011).

Im gesunden Pankreasgewebe wird SOX 2 weder in Azinuszellen noch im Gangepithel exprimiert, im Pankreaskarzinom jedoch konnte in 20 % der untersuchten Gewebe eine ektopische Expression des Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten erst in den PDACs, vor allem den anaplastischen Tumoren, nicht aber in frühen PanIN-

Läsionen SOX 2-Expressionen gezeigt werden, was auf eine Aktivität in den späten Phasen der Tumorgenese hinweist. Der *Knockdown* von SOX 2 in aus Pankreaskarzinomen isolierten Zellen resultiert in einem Zellzyklusarrest durch p21-/ p27-Induktion, eine Überexpression führt zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und zu Proliferation. Auch durch die Induktion von EMT ist SOX 2 an der Progression des Pankreaskarzinoms beteiligt, so führt die Überexpression zusätzlich zur Reduktion von epithelialen Markern, zum Beispiel E-Cadherin (Herreros-Villanueva et al. 2013).

Zusammenfassend ist die SOX 2-Überexpression mitverantwortlich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von stammzellähnlichen Eigenschaften in Tumorzellen. Dies stellt den Ausgangspunkt für Fernmetastasierung und Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika dar und ist somit ein zentraler Faktor während der Progression maligner Tumore.

2.7 Die MicroRNAs-200c und -34a

MicroRNAs (miRNAs, miR) sind 20 - 25 Nukleotide lange, nicht-codierende RNA-Moleküle, welche das 3'-Ende der mRNA ihrer Zielproteine binden und somit auf posttranskriptioneller Ebene die Genexpression regulieren. Die Bindung an der mRNA kann sowohl in einer Inhibierung als auch der Förderung der Translation resultieren (Bartel 2009; Vasudevan et al. 2007). Es wird angenommen, dass über 30 % aller Gene ein Ziel von miRNAs sind und diese eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose und Zellmetabolismus, spielen (Feng et al. 2011). Als Regulatoren der Genexpression sind miRNAs mit Tumorgenese und -progression assoziiert. Für zahlreiche humane Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass durch Amplifikation oder Deletion die Expressionsmuster der miRNAs gestört oder die mehrstufige, komplexe Reifung der miRNA gestört sind, was zur Modulation der Expression kritischer Gene der Zellhomöostase führt (Feng et al. 2011).

Die miRNA-34a hat tumorsuppressive Eigenschaften und wird durch p53 positiv reguliert. Außerdem ist sie invers mit dem MAP-Kinase-Signalweg korreliert. Dieser ist durch Dysregulation in Pankreaskarzinomzellen häufig konstitutiv aktiv, was zur Proliferation von Tumorzellen führt (Ikeda et al. 2012). In Zellen aus Kolonkarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass miR-34a in einem negativen Regelkreis mit SNAI 1 steht und die Inhibition über EMT zu einem mesenchymalen Phänotyp und Metastasierung führt (Hahn et al. 2013).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in Zelllinien aus Pankreaskarzinomen ein hohes Level an miR-200c-Expression mit geringem invasivem Verhalten, der Expression von E-Cadherin und der verminderten Expression von *ZEB 1* korreliert (Yu et al. 2010; Brabletz und Brabletz 2010). Dies verdeutlicht, dass miR-34a und -200c negative Regulatoren von EMT und somit von Invasion und Metastasierung sind. Der Verlust dieser miRNAs fördert EMT und die Progression zu einem aggressiven Tumorphänotyp.

Der Tumorsuppressor p53 steht in einem engen Zusammenhang mit miRNA-Expression. So steuert er einerseits die Transkription und Ausreifung von miRNAs und wird andererseits selbst durch miRNAs reguliert (Chang et al. 2011; Ikeda et al. 2012; Feng et al. 2011). Da die Funktion von p53 im humanen Pankreaskarzinom häufig durch Mutationen moduliert ist, ist auch dieser Zusammenhang Gegenstand dieser Arbeit.

2.8 Die NKC-, KPC- und KNPC-Mausmodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Versuche in Zelllinien und Geweben durchgeführt, welche aus Pankreata transgener Mäuse isoliert wurden. Drei der Mausmodelle wurden bereits in Vorarbeiten generiert und werden im Folgenden kurz charakterisiert:

2.8.1 Das NKC-Mausmodell

In das Erbgut der *c.n.NFATc1;Kras^{G12D};P48/PDX1-Cre*-Maus, die von der AG Ellenrieder generiert wurde und im Folgenden als NKC-Maus bezeichnet wird, wurden durch Verpaarung die Genkonstrukte für *c.n.NFATc1* und *Kras^{G12D}* eingebracht. Nach Aktivierung durch eine Cre (*Cause of Recombination*)-Rekombinase, wurde folglich pankreasspezifisch konstitutiv *Kras* sowie nukleäres *NFATc1* exprimiert. In den Gewebsschnitten dieser Mäuse konnte im Alter von 36 Wochen eine Tumorinzidenz von 100 % ermittelt werden, Lebermetastasen wurden ab der 28. Woche festgestellt, das mediane Überleben lag bei 140 Tagen (Abbildung 6, Seite 22). Die isolierten Pankreastumore wurden nach dem WHO-Schema untersucht und eingeteilt (Abbildung 4, siehe Dissertationsschrift von Julius Nikorowitsch 2016, AG Ellenrieder). Zusammenfassend entwickeln NKC-Mäuse mäßig differenzierte, metastasierte Pankreaskarzinome.

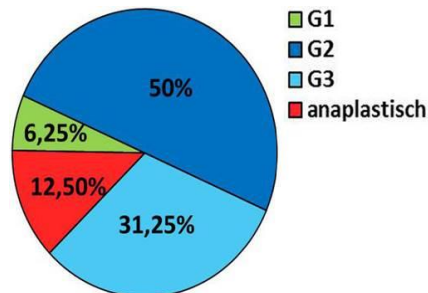


Abb. 4: WHO-Grading von Pankreastumoren aus dem NKC-Mausmodell.

2.8.2 Das KPC-Mausmodell

Auch die DNA der KPC (*LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp^{R172h/+};PDX1-Cre*)-Maus beinhaltet die *Kras^{G12D}*-Mutation. Zusätzlich wurde hier mit dem *LSL-Trp^{R172H}*-Konstrukt eine den Tumorsuppressor *Trp53* betreffende Mutation eingefügt. Das Einbringen der *PDX-Cre*-Rekombinase resultiert in der konstitutiven Expression von *Kras* und inaktivem p53. Diese Mäuse entwickelten mäßig differenzierte Tumore (G2 - G3) mit Lebermetastasen und überlebten im Median fünf Monate (Hingorani et al. 2005).

2.8.3 Das KNPC-Mausmodell

Die KNPC ($LSL-Kras^{G12D/+};c.n.NFATc1;LSL-Trp^{R172h/+};P48-Cre$)-Maus wurde durch die AG Ellenrieder generiert und stellt die Kombination beider obengenannten Modelle dar. Die durch Verpaarung eingebrachten Genkonstrukte führten zur Überexpression von nukleärem NFATc1 sowie von Kras und der Expression von inaktivem p53 in den Pankreata der Tiere. Die Mäuse entwickelten innerhalb weniger Wochen metastasierende anaplastische Tumoren und überlebten im Durchschnitt lediglich 50 Tage (Abbildung 6). Das Grading (Abbildung 5) bestätigt die Aggressivität der sich entwickelnden Tumore (Singh et al. 2015). Im Vergleich zu NKC- und KPC-Mäusen entwickeln KNPC-Mäuse zu einem früheren Zeitpunkt Pankreaskarzinome, welche zudem einen aggressiveren Phänotyp aufweisen.

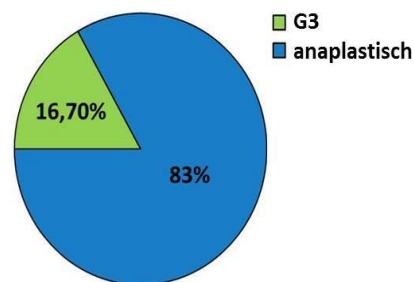


Abb. 5: WHO-Grading von Pankreastumoren aus dem KNPC-Mausmodell.

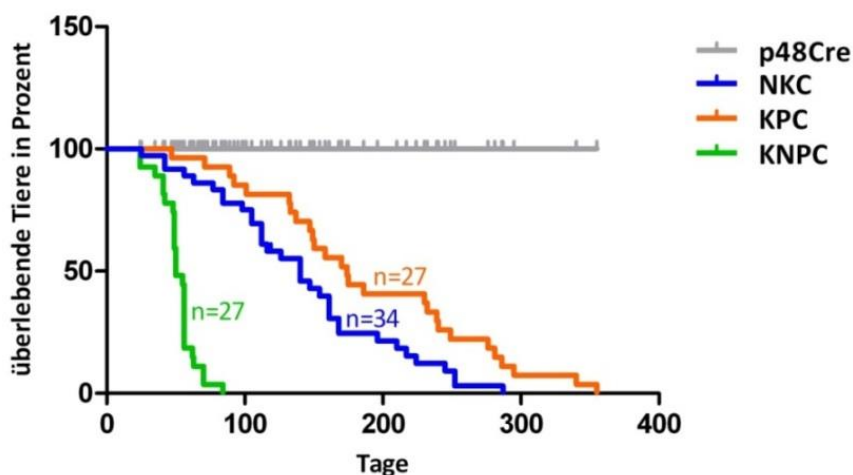


Abb. 6: Kaplan-Meier-Überlebenskurve der NKC-/KPC- und KNPC-Mäuse. P48Cre-Mäuse sind als Kontrolle dargestellt. Jede Stufenbildung zeigt einen Todesfall ($p < 0,001$, Log-Rang-Test im Zweigruppenvergleich). Die KPC-Daten entstammen Hingorani et al. 2005

3. Zielsetzung

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein zentraler Mechanismus der Metastasierung im Pankreaskarzinom.

In dieser Arbeit wird die Rolle von NFATc1 und p53 bei der epithelial-mesenchymalen Transition und der Metastasierung des Adenokarzinoms des Pankreas untersucht. Hierbei stehen im Speziellen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt:

- Haben NFATc1 und p53 Einfluss auf die Expression von EMT-Markern im Pankreaskarzinom *in vitro* und *in vivo*?
- Ist die Art der Inaktivierung von p53 (Deletion versus Mutation) entscheidend für die Progression des Pankreaskarzinoms?
- Spielen im Rahmen der p53-bedingten Repression von EMT-Markern MicroRNAs eine regulierende Rolle?
- Welche Funktion übt SOX 2 als zentraler Mediator in der Progression des Pankreaskarzinoms bei der epithelial-mesenchymalen Transition aus?
- Durch welchen Mechanismus beeinflusst NFATc1 die Expression von EMT-Markern?

4. Materialien und Methoden

4.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Tuttnauer (Breda, Niederlande)
Brutschrank WTB Binder	Hereaus Instruments (Dreieich)
ChemoCam	Intas (Göttingen)
DLReady TM Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Eismaschine	Ziegra Eis (Isernhagen)
Einbettmaschine	Reichert-Jung, heute Leica (München)
Elektrophorese-Kammer	Bio Rad (München)
Feinwaage	Ohaus (Nänikon, Schweiz)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Gefriertruhe	Heraeus Instruments (Dreieich)
Heizblock	Techne AG (Chemnitz)
Heizplatte	MeDax (Kiel)
Inkubator	Memmert (Schwabach)
Kühlschrank	Liebherr (Lindau)
Kühlzentrifuge Micro 200R	Hettich Zentrifuge (Tuttlingen)
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen) Olympus (Hamburg)
Mikrotom	Leica (München)
Mikrowelle	Whirlpool (Stuttgart)
Multiscan FC Mikroplate	Thermo Scientific (Langenselbold)
Photometer	
Nano-Drop 1000	Nano Drop Technologies (Wilmington, USA)
pH-Meter	Mettler-Toledo (Gießen)
Real-time PCR-Maschine 7500	Applied Biosystems (Darmstadt)
Real-time PCR Maschine Step One Plus	Applied Biosystems (Darmstadt)
Schüttler	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Sonifier W 250-D	Branson Ultrasonics (Danbury, USA)
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments (Dreieich)
Stickstofftank	Tec-Lab (Idstein)
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems(Darmstadt)
Thermal Cycler T100	Bio Rad (München)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

Trockenschrank	Heraeus Instruments (Dreieich)
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph Instruments (Schwabach)
UV-Scanner	Kaiser (Gemünden)
Vakuum Concentrator	Bachofer (Reutlingen)
Vakuumpumpe	Pfeiffer (Aslar)
Video Graphic Printer	SONY (Berlin)
Voltmeter für Western Blot	Bio Rad (München)
Vortexer Reax2000	Heidolph Instruments (Schwabach)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Western Blot-Kammer	Bio Rad (München)
Zentrifugen	
• Biofuge Pico	Heraeus Instruments (Dreieich)
• Fuge 5415C	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
• Labofuge GL	Heraeus Instruments (Dreieich)
• Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments (Dreieich)
• Mikrofuge 200R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
• Picofuge™	Stratagene (Heidelberg)

Tab. 1: Verwendete Laborgeräte

4.2 Chemikalien und Enzyme

Name	Hersteller
4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Aqua ad iniectabilia	Fresenius Kabi AG (Bad Homburg)
B27	Life Technologies (Darmstadt)
bEGF	Pepro Tech (Hamburg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
BioRad Protein Assay	Bio Rad (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Bovine Serum Albumin (BSA, 10mg/ml)	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Citronensäure-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
Colorless GoTaq Reaction Buffer	Promega (Madison, USA)

Cyclosporin A	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Diaminobenzidin (DAB)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
DMEM Medium	Invitrogene (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
DNase I	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Acros Organics- Thermo Fisher Scientific (New Jersey, USA)
EGF	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethylenglykolaminoethylester (EGTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Eosin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserumalbumin (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Gemcitabine	Klinik-Apotheke der Uni Marburg
GeneRuler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
Glutamin	Invitrogene (Karlsruhe)
Gluthathion Sepharose™ beads	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
GoTaq DNA Polymerase	Promega (Madison, USA)
HEPES (pH 7,5)	Carl Roth (Karlsruhe)
H₂O₂	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin Solution	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Insulin-Transferrin-Selenium-X	Invitrogene (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Lipofectamin	Invitrogene (Karlsruhe)
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
MEM	Invitrogene (Karlsruhe)

Methylbenzoat	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Matrigel	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Midori Green	Nippon Genetics (Düren)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
N2 Supplement	Life Technologies (Darmstadt)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
NaCl isotonische Lösung	Diprom GmbH (Hamburg)
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Natriumflourid	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Natriumpyruvat	Carl Roth (Karlsruhe)
Non-essential Amino acids	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
NP₄O	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Oligo-dT-Primer	Applied Biosystems (Darmstadt)
Orthovandat	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Paraffin	Vogel GmbH & Co. KG (Gießen)
Paraformaldehyd (4 %)	USB Corporation (Cleveland, USA)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Dulbecco's PBS	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
PageRuler™ Proteinmarker	Fermentas GmbH (St. Leon-Roth)
PIPES	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Protein A Agarose	Millipore (Darmstadt)
Protein G Agarose	Millipore (Darmstadt)
Proteaseinhibitor-Tablette (complete mini)	Roche Molecular Diagnostics (Mannheim)
Proteinase K	AppliChem (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt/Main)
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen (Karlsruhe)
RNase A	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
RNase-freies Wasser	Ambion (Chaedle, UK)
Roticlear	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotimount	Carl Roth (Karlsruhe)
Salmon Sperm	Invitrogen (Karlsruhe)

Salzsäure	Thermo Fisher Scientific (New Jersey, USA)
SiLentFect	Bio Rad (München)
SDS Natriumdodecylsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
RNase Inhibitor	Applied Biosystems (Darmstadt)
SYBR® Green	Applied Biosystems (Darmstadt)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Thermo-Start Taq-DNA-Polymerase	Abgene (Hamburg)
Tris Base	Acros Organics-Thermo Fisher Scientific (New Jersey, USA)
TRIS Hydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton-X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Tween® 20	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Western Lightning™ Plus ECL	Bio Rad (München)
Oxidizing Reagent Plus	
Western Lightning™ Plus ECL	Bio Rad (München)
Enhanced Luminol Reagent Plus	
Western Lightning™ Ultra ECL	Bio Rad (München)
Oxidizing Reagent Plus	
Western Lightning™ Ultra ECL	Bio Rad (München)
Enhanced Luminol Reagent Plus	
Xylol	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)

Tab. 2: Verwendete (Bio-)Chemikalien und Enzyme

4.3 Kits

Name	Hersteller
DNeasy Kit	Qiagen (Hilden)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Omniscript Reverse Transkriptase Kit	Qiagen (Hilden)
PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)

Tab. 3: Verwendete Kits

4.4 Labormaterialien

Material	Hersteller
Blotpapier Whatman	Schleicher & Schüll (Dassel)
Bradford-Platten	Sarstedt (Nürnberg)
Kryo-Röhrchen (2ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Dako-Pen	Dako (Hamburg)
Deckgläschen	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einwegnadeln, Spritzen	Braun (Melsungen)
Eppendorfgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt (Nürnberg), Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Falcons (15ml, 50ml)	Sarstedt (Nürnberg)
Geltaschenkamm	Thermo Scientific (Dreieich)
Glaswaren	Schott (Mainz)
Kultivierungsplatten (6 Wells)	Thermo Scientific Nunc (Langenselbold)
Mikropistill	Carl Roth (Karlsruhe)
Neubauerzählkammer	Carl Roth (Karlsruhe)
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll (Dassel)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Ohrmarken	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg)
Parafilm	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Pipetboy	Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten	
<ul style="list-style-type: none"> • 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl • 2,5 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml 	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Pipettenspitzen	
<ul style="list-style-type: none"> • weiß • gelb • blau 	Gilson Diamond (Middleton, USA) Gilson Diamond (Middleton, USA) Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Skalpell	Braun (Melsungen)
Sterilfilter (0,2 µM/ 0,45 µM)	Schleicher & Schüll (Dassel)
TaqMan-PCR-Platten	Applied Biosystems (Darmstadt)
Zellkulturflasche (50ml, 250ml, 500ml)	Greiner-Bio-One (Frickenhausen)
Zellschaber	Sarstedt (Nürnberg)

Tab. 4: Verwendete Labormaterialien

4.5 Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Herkunft	Medium
KNPC 001	Murine Pankreaskarzinom- zelllinie	AG Ellenrieder, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10 % FCS + 1 % NEAA + 1 % Pen/Strept
KNPC del3	Murine Pankreaskarzinom- zelllinie	AG Ellenrieder, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10 % FCS + 1 % NEAA + 1 % Pen/Strept
L3.6	Humane Pankreaskarzinom- zelllinie	AG Daniel Billadeau, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota	MEM + 10 % FCS + 1 % Na Pyruvat + 1 % NEAA + 1 % Glutamin
NKC II	Murine Pankreaskarzinom- zelllinie	AG Ellenrieder, Philipps-Universität Marburg	DMEM + 10 % FCS + 1 % NEAA + 1 % Pen/Strept
Panc-1	Humane Pankreaskarzinom- zelllinie	European Collection of Animal Cell Cultures, ECACC, Salisbury, Großbritannien	DMEM + 10 % FCS + 1 % Pen/Strept

Tab. 5: Beschreibung und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

4.6 Puffer

Die aufgeführten Puffer wurden mit destilliertem, autoklaviertem Wasser angesetzt und wenn nötig steril filtriert oder autoklaviert.

WCL (Whole cell lysat)-Pufferlösung

50 mM	HEPES (pH 7,5)
150 M	NaCl
1 mM	EGTA
10 %	Glycerin
1 %	Triton – X – 100
100 mM	NaF
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇ x 10 H ₂ O

WCL-Lysepuffer

500 µl	Lysepufferlösung
20 µl	Complete 25x
5 µl	PMSF
5 µl	Orthovandat

Für die Immunhistochemie:Citratpuffer

2,1 g Citronensäure-
monohydrat
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

TE-Puffer (10x)

12,1 g Tris-Base
3,7 g EDTA
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

PBS (pH 7,4)

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
0,2 g KH_2PO_4
0,765 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

TBS (pH 7,4)

6,06 g Tris-Base
8,7 g NaCl
35 ml 1M HCl
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

DAB = Diaminobenzidin

200 mg DAB
200 ml TBS
100 μl H_2O_2

Für die Western Blot-Analyse:Lämmli (5x)

225 mM Tris (pH 6,8)
50 % Glycerin
5 % SDS
100 mM DTT
0,02 % Bromophenolblau
1 : 20 2-Mercaptoethanol

Bradford Protein Assay

50 ml BioRad Protein Assay
200 ml Aqua dest.

Trenngelpuffer

1,5 M Tris (pH 8,8)
0,4 % SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-Base (pH 6,8)
0,4 % SDS

Stopgellösung (für 2 Gele)

800 μl Trenngellösung
unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:
5 μl 10 % APS
5 μl TEMED

Trenngellösung (für 2 Gele a 10 %)

2,5 ml Trenngelpuffer
3,67 ml Aqua dest.
3,33 ml Acrylamidlösung
0,5 ml Glycerin
unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:
25 μl 10 % APS
25 μl TEMED

Trenngellösung (für 2 Gele a 15 %)

2,5 ml	Trenngelpuffer
2,0 ml	Aqua dest.
5,0 ml	Acrylamidlösung
0,5 ml	Glycerin
unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:	
25 µl	10 % APS
25 µl	TEMED

Sammelgellösung (für 2 Gele)

25 ml	Sammelgelpuffer
59 ml	Aqua dest.
16 ml	Acrylamidlösung
unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:	
15 µl	10 % APS
9 µl	TEMED

Laufpuffer (10 x)

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin

Transblotpuffer (1 x)

100 ml	10x Transblotpuffer
200 ml	Methanol
700 ml	Aqua dest.

Blocking-Puffer

100 ml	1 x TBST
5 g	Milchpulver

Für die Chromatin-Immunpräzipitation:Waschpuffer I

20 mM	Tris (pH 8,1)
150 mM	NaCl
2 mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton X-100

Waschpuffer II

20 mM	Tris (pH 8,1)
500 mM	NaCl
2 mM	EDTA
0,1 %	SDS
0,1 %	Triton X-100

Waschpuffer III

10 mM	Tris (pH 8,1)
250 mM	LiCl
1 mM	EDTA
1 %	NP40
1 %	SDS

RIPA-Puffer

1 M	Tris (pH 7,4)
5 M	NaCl
10 %	Triton X-100
5 g	Natrium-Deoxycholat
0,25 M	EDTA
0,2 M	EGTA (pH 7,2)

TE-Puffer

20 mM	Tris (pH 8,0)
1 mM	EDTA

Für die Genotypisierung der Mäuse:PBND

50 mM	KCl
10 mM	Tris
2,5 mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
0,45 %	NP ₄ O
0,45 %	Tween 20

TBE-Puffer (1x)

10,8 g	Tris
5,5 g	Borsäure
0,37 g	EDTA
auf 1 l	mit Aqua dest. auffüllen

DNA Loading Dye (10x)

30 %	Glycerol
0,1 mM	EDTA
0,25 %	Bromphenolblau
	mit Aqua dest. auffüllen

1 % Agarose Gel

2,5 g	Agarose
200 ml	TBE Puffer (1x)
7 µl	MidoriGreen®

4.7 Methoden**4.7.1 Tierversuche****4.7.1.1 Transgene Mauslinie KNP^{+/-}C**

Die für diese Arbeit generierte Mauslinie exprimierte pankreasspezifisch konstitutiv aktives Kras, NFATc1 und ein durch *Knockout* inaktiviertes p53. Hierfür mussten unterschiedliche Mauslinien nach folgendem Schema miteinander gekreuzt werden:

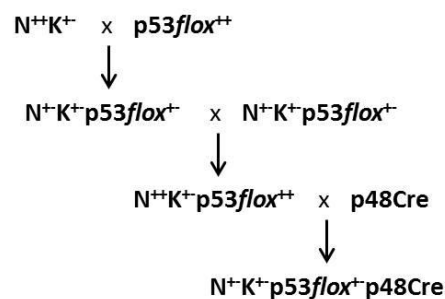


Abb. 7: Kreuzungsschema zur Generierung der KNP^{+/-}C-Mäuse. N: *c.n.NFATc1*, K: *Kras^{G12D}*, ++ homozygot, +- heterozygot

Die konstitutive Aktivität der Kras-Signalwege wurde durch Einbringen des bekannten *LSL-Kras^{G12D}*-Konstruktes erreicht. In den *KRAS*-Genlocus wurde hierbei im Exon 12 eine Mutation eingefügt, welche im exprimierten Protein den Austausch der Aminosäure Glycin gegen Aspartat erzeugte.

Zusätzlich wurde vor dem veränderten *KRAS*-Gen ein Stopcodon, flankiert von *LoxP*-Sequenzen (*loxP-STOP-loxP = LSL*), inseriert, was die Transkription des mutierten *Kras* zunächst inhibierte (Hingorani et al. 2005). *LoxP* stammt aus dem Genom des Bacteriophagen P1. Dieser Genabschnitt enthält zwei palindromische Sequenzen und kann anhand derer durch pankreasspezifische Cre-Rekombinasen erkannt werden (Sternberg und Hamilton 1981).

Um die konstitutive Expression von *c.n.NFATc1* herbeizuführen, wurde ein weiteres Genkonstrukt eingebracht. Durch den Austausch von 13 Serinresten durch Alanin im Genlocus für *NFATc1* liegt dieses stets dephosphoryliert vor, was zur Akkumulation im Zellkern führt. Dies wiederum führt zur dauerhaften transkriptionellen Aktivität des *Nuclear factor of activated T-cells*. Dieses Konstrukt wurde am N-Terminus mit einem Hämagglutinin (HA)-Marker versehen und genaufwärts wurde ein *loxP-Stop-loxP*-Konstrukt eingefügt.

Die für die Generierung der $KNP^{+/-}$ -C-Maus benötigte *p53flox*-Mauslinie (*Trp53^{F2-10}*) wurde durch Jonkers et al. (2001) beschrieben und durch die AG Stiewe bereitgestellt. Der Genlocus für *p53* wurde ebenfalls durch *loxP*-Sequenzen flankiert, welche durch pankreasspezifische Cre-Rekombinasen erkannt wurden. Durch die Exzision des Genlocus wurde die Deletion von *Trp53* in den Pankreata der Versuchstiere simuliert.

Im letzten Schritt der Kreuzung wurde die *p48Cre*-Rekombinase eingefügt. Diese Mauslinie wurde durch Nakhai et al. generiert, beschrieben und bereitgestellt (Nakhai et al. 2007). Bei *p48Cre* handelt es sich um eine pankreasspezifische Rekombinase welche die *loxP*-Stellen erkennt und so das Stop-Codon exzidiert. Nach Cre-vermittelter Exzision des Stop-Codons werden unter Kontrolle des schwachen Promotors *ROSA-26* *Kras^{G12D}*, *c.n.NFATc1* sowie *p53flox* exprimiert.

In der folgenden Abbildung ist schematisch die *p48Cre*-vermittelte Aktivierung der inserierten Genkonstrukte dargestellt.

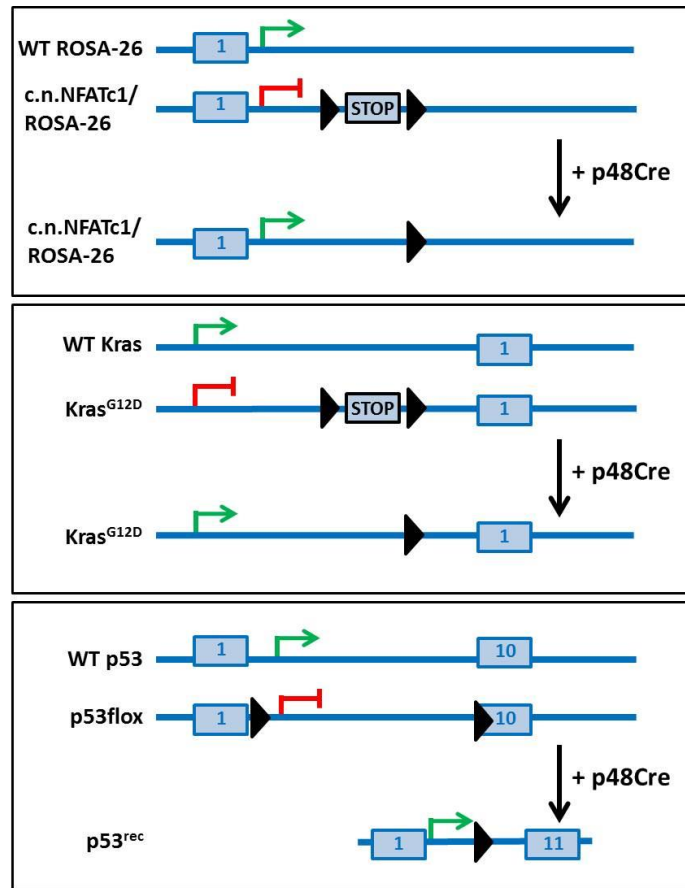


Abb. 8: p48Cre-vermittelte Aktivierung der inserierten Genkonstrukte *c.n.NFATc1*, *Kras^{G12D}* und *p53floxed*. Mittels homologer Rekombination wurden die entsprechenden Konstrukte eingebracht. Die Expression der veränderten Genabschnitte im Pankreas setzte die Identifikation der loxP-Sequenzen durch die p48Cre-Rekombinase sowie die Exzision der Stop-Codons voraus.

4.7.1.2 Haltung und Zucht der Versuchstiere

Die Mäuse wurden nach Richtlinien und Protokollen der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg gehalten. Die Mäuse waren in einer offenen Haltung der Universität untergebracht. Es herrschte dort eine konstante Raumtemperatur von $21 (\pm 1) ^\circ\text{C}$ und eine Luftfeuchtigkeit von $55 (\pm 5) \%$. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch ein Beleuchtungs- und Dunkelheitsintervall von je 12 Stunden vorgegeben. Die Tiere bekamen Standardfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt.

Zur Zucht wurden jeweils zwei weibliche und eine männliches Tier zusammen in einem Zuchtkäfig gehalten. Die Auswahl der Tiere erfolgt anhand des Ergebnisses der Genotypisierung.

4.7.1.3 Genotypisierung der transgenen Mäuse

Die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde per PCR mit GoTaq[®] durchgeführt. Zunächst wurden die Mausschwanzbiopsien in je 200 µl PBND-Puffer, welcher mit 600 µg Proteinase K versetzt worden war, bei 56 °C (über Nacht) gelöst. Am nächsten Tag wurden die Proben kurz zentrifugiert und bei 95 °C für 5 Minuten abgekocht, um die Proteinase zu inaktivieren. Die Lysate konnten bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für die PCR wurde ein Master-Mix vorgelegt, dieser wurde pro Mausschwanzbiopsie nach folgendem Schema pipettiert:

H ₂ O	15,25 µl
GoTaq Puffer (5x)	5 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	1 µl
dNTPs	0,5 µl
GoTaq [®]	0,25 µl
Insgesamt:	23 µl

Den 23 µl Master-Mix wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen je 2 µl der Mausschwanzbiopsie hinzugefügt.

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Primer und PCR-Programme wurden für die Genotypisierung der in dieser Arbeit erwähnten transgenen Mäuse verwendet.

Alle verwendeten Primer wurden vom Hersteller Biomers aus Ulm bezogen.

Primer	Sequenz
Cre-p48 forward	5'-tgc tgt ttc act ggt tat gcg g-3'
Cre-p48 reverse	5'-ttg ccc ctg ttt cac tat cca g-3'
K-Ras forward	5'-agc tag cca cca tgg ctt gag taa gtc tgc g-3'
K-Ras reverse	5'-cct tta caa gcg cac gca gac tct aga -3'
NFATc1 forward	5'-cat gtc tgg gag atg gaa gc-3'
NFATc1 reverse	5'-tct cga gct act tgt cat cg-3'
p53 Mutation forward	5'-tag cca cca tgg ctt gag gtc tgc -3'
p53 Mutation reverse	5'-ctt gga gac ata gcc aca ctr -3'
p53 flox Int10 forward	5'-aag ggg tat gag gga caa gg-3'
p53 flox Int10 reverse	5'-gaa gac aga aaa ggg gag gg-3'
p53 flox Int1 reverse	5'-agc aca tag gag gca gga c-3'
Rosa forward	5'-ggc gga tca caa gca ata at-3'
Rosa reverse	5'-gag tct tct ggg cag gct ta-3'

Tab. 6: Sequenzen der für die Genotypisierung verwendeten Primer

	Programm	Bandengröße
Kras^{G12D}	95 °C 2 min 95 °C 30 sec ← 60 °C 30 sec — 29 x 72 °C 1 min — 72 °C 5 min	550 bp
c.n.NFATc1	95 °C 5 min 95 °C 30 sec ← 60 °C 30 sec — 34 x 72 °C 1 min — 72 °C 10 min	295 bp
p48Cre	95 °C 5 min 95 °C 30 sec ← 60 °C 30 sec — 34 x 72 °C 1 min — 72 °C 10 min	600 bp
p53flox	95 °C 2 min 95 °C 30 sec ← 58 °C 30 sec — 30 x 72 °C 1 min — 72 °C 5 min	<u>flox/flox Allel:</u> 584 bp <u>wtAllel:</u> 431 bp
p53-Mutante	95 °C 2 min 95 °C 30 sec ← 60 °C 30 sec — 29 x 72 °C 1 min — 72 °C 5 min	290 bp

Tab. 7: PCR-Programme und Bandengröße der zu typisierenden Gene

Nach Beendigung der PCR wurde jeder Probe 2 μ l DNA-Loading Dye hinzugefügt, dies auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und ausgewertet.

Zur Auswertung wurde das Agarosegel mit den aufgetrennten DNA-Fragmenten auf einen Transilluminator gelegt. Das im Gel befindliche MidoriGreen[®], welches mit der DNA interkalierte, wurde durch einfallendes UV-Licht sichtbar, sodass die amplifizierten DNA-Fragmente aufleuchteten. Mittels der integrierten Kamera konnten die Ergebnisse dokumentiert werden. Abbildung 9 zeigt beispielhaft die Genotypisierung einer KNP^{+/-}-C-Maus.

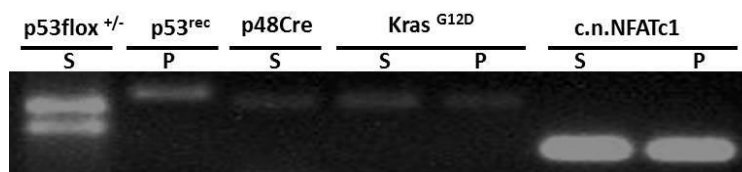


Abb. 9: PCR-Analyse zum Nachweis des KNP^{+/-}-C-Genotyps. Nach der Entnahme von Mausschwanzbiopsien (**S**) bzw. nach der Notopferung und Entnahme des Pankreas (**P**) und der DNA-Isolation wurden das Vorliegen bestimmter Gene durch eine primerspezifische Amplifikation und daran anschließende Auftrennung mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Bandengrößen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Zur Detektion von p53flox wurden in dieser Arbeit die Primer für „Int10“ eingesetzt. Wurde das Konstrukt durch Verpaarung in die DNA der Maus inseriert, so leuchtete durch UV-Bestrahlung eine Bande bei 584 bp auf, eine Bande bei 431 bp leuchtete dagegen nach der Genotypisierung von Wildtyp-Mäusen auf. Die Anwesenheit beider Banden in der Auswertung der PCR auf p53flox bedeutete, dass das Konstrukt heterozygot eingebracht wurde (p53flox^{+/-} in Abbildung 9). Die Verpaarung mit p48Cre-Mäusen führte zur Exzision des Genlokus für p53 im Pankreas. In der PCR wurden nun die Primer „Int1 forward“ und „Int10 reverse“ kombiniert, die Auswertung unter UV-Licht ergab ein Leuchtsignal bei 612 bp (p53^{rec} in Abbildung 9).

4.7.1.4 Entnahme der Organe und Aufbereitung des Gewebes

Die KNPC- bzw. KNP^{+/-}C-Mäuse, welche durch die Genotypisierung identifiziert wurden, wurden in separate Käfige gesetzt und im Besonderen beobachtet. Beim Eintritt eindeutiger Schmerzzeichen wie einer stark veränderten Körperhaltung, verminderter Aktivität, Futtermittelverweigerung sowie fehlender Fellpflege wurde eine Notopferung mittels zervikaler Dislokation durchgeführt. Die Daten wurden dokumentiert um daraus Kaplan-Meier-Überlebenskurven zu erstellen.

Im Anschluss wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, um das gesamte Abdomen inklusive Pankreas darzustellen und aus Dokumentationsgründen fotografieren zu können. Es wurden Pankreas, Leber und Milz entnommen. Das Pankreas wurde geteilt und zur Hälfte für die Proteinisolierung und RNA-Extraktion in Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, der Rest, sowie Leber und Milz, wurden zur weiteren Aufbereitung in Glasgefäßen mit Formaldehyd fixiert. Aus den Pankreata einzelner Tiere wurden Zelllinien isoliert.

Zur histologischen Analyse wurden die Gewebe nach 15-stündiger Formalinfixierung wie folgt bei 4 °C in Ethanol inkubiert:

2 h in 70%igem Ethanol – 1 h in 80 %igem Ethanol –
2 h in 96%igem Ethanol – 2 h in 100% igem Ethanol

Nach der Durchführung der Alkoholreihe wurde das Gewebe in Methylbenzoat überführt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Morgen für 10 - 15 Minuten in Xylol eingelegt. Das Xylol wurde anschließend entfernt und die Glasgefäße in denen sich die Gewebe befanden mit flüssigem Paraffin befüllt. Das Paraffin wurde so oft gewechselt, bis der charakteristische Geruch des Xylols verflogen war. Zum Abschluss wurden die Gewebe in dafür vorgesehene Metallschälchen gelegt und diese mit Paraffin gefüllt. Nachdem das Paraffin etwas

angetrocknet war, wurden die Gewebe samt Metallschälchen über Nacht bei -20 °C inkubiert, um das Paraffin vollständig auszuhärten.

Aus den in Paraffin eingebetteten Geweben wurden mit dem Mikrotom 4 µm dünne Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträgern im Trockenschrank getrocknet.

4.7.2 Histologische Untersuchung von Geweben

Vor der histologischen Aufbereitung erfolgte die Rehydrierung der Gewebeschnitte. Dafür wurden diese zweimal für 5 Minuten in Roticlear® und anschließend je 3 Minuten in absteigender Alkoholreihe (99 % - 96 % - 80 % - 70 % - 50 %) eingelegt und mit Aqua dest. gespült.

4.7.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Nach erfolgter Rehydrierung der Gewebeschnitte wurden diese für 5 Minuten in Hämatoxylin getaucht und anschließend durch lauwarmes, fließendes Wasser 5 Minuten lang gebläut. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 30 Sekunden lang in 0,5 %igem Eosin gefärbt und durch dreimaliges Spülen mit destilliertem Wasser überschüssiger Farbstoff entfernt. Durch die sich anschließende aufsteigende Alkoholreihe (70 % - 80 % - 96 % - 99 %) wurde das Gewebe dehydriert und schließlich zweimal für je 5 Minuten in Roticlear inkubiert, um die Schnitte mit Hilfe von Rotimount® mit einem Deckglas versehen zu können. Nachdem die Präparate vollständig getrocknet waren konnte das Ergebnis der H.E.-Färbung unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

4.7.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse wurden die Schnitte im Anschluss an die Rehydrierung für 10 Minuten im entsprechenden Puffer gekocht und für 20 Minuten auf Eis gekühlt. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest.

wurden die Schnitte in 3 %iges H₂O₂ überführt, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Nach 10 Minuten wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült. Mit Hilfe eines Dako®-Pens wurde nun der zu färbenden Bereich auf dem Objektträger begrenzt und diese Fläche dreimal für 5 Minuten mit PBST gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Stunde mit 10 %igem BSA in einer feuchten Kammer inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach dieser Zeit wurde das BSA abgekippt und die Schnitte wurden mit dem entsprechend verdünnten Antikörper beträufelt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten mit PBST gespült und mit dem entsprechenden Sekundäantikörper behandelt, dieser inkubierte 40 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut mit PBST gespült (dreimal 5 Minuten) und das Gewebe mit einem ABC-Komplex behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurde ein letztes Mal dreimal 5 Minuten mit PBST gewaschen. Im nächsten Schritt wurde DAB, das Substrat für die Reaktion, hinzugefügt. Die Inkubationszeiten für die entsprechenden Antikörper sind in Tabelle 8 angegeben. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült, 150 Sekunden in Hämalauen eingelegt und 5 Minuten gebläut.

Antikörper	Hersteller	Herkunft	Puffer	Verdünnung	Zeit für DAB
Cytokeratin-19	Santa Cruz	Kaninchen	Tris EDTA	1:50	10 min
E-Cadherin	BD	Maus	Tris EDTA	1:800	5 min
HA	Cell Signaling	Kaninchen	Tris EDTA	1:100	4 min
NFATc1	Abcam	Kaninchen	Citrat	1:200	10 min
p53	Leica	Kaninchen	Tris EDTA	1:600	10 min
Vimentin	BD	Maus	Tris EDTA	1:400	10 min
ZEB 1	Santa Cruz	Ziege	Tris EDTA	1:60	10 min

Tab. 8: Verwendete Antikörper für Immunhistochemie

Abschließend wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Alkoholreihe (99 % - 96 % - 80 % - 70 % - 50 %) rehydriert und in Roticlear® eingelegt. Zum Eindeckeln der gefärbten Präparate wurde Rotimount® verwendet. Nachdem dieses vollständig getrocknet war, konnte das Ergebnis unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

4.7.3 Protein-/ und RNA-Isolierung aus Pankreasgewebe

4.7.3.1 Proteinisolierung

Um entnommene Gewebe auf Proteinebene analysieren zu können, wurden die bei -80 °C aufbewahrten Proben stets auf Trockeneis gekühlt, auch die benötigten Instrumentarien wurden im Trockeneis inkubiert. Das benötigte Pankreasgewebe wurde mit Hilfe eines Skalpells in dünne Scheiben geschnitten und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, in welche zuvor 500 µl Lysepuffer, 20 µl 20x Complete und 5 µl PMSF vorgelegt wurden.

Mit Hilfe eines sterilen Mikropistills wurde das Gewebe im Eppendorfgefäß zerstoßen und anschließend mehrfach durch eine 26 G Kanüle gezogen, bis schließlich eine Suspension aus Gewebe und Lysepuffer entstanden war. Anschließend wurde eine Proteinbiobestimmung nach Bradford durchgeführt um die Proteinkonzentration in den Proben zu ermitteln.

Das gewonnene Protein wurde bei -20 °C aufbewahrt und konnte u.a. für Western Blot-Analysen eingesetzt werden.

4.7.3.2 RNA-Isolierung

Für die Präparation von RNA aus Pankreasgewebe wurden die Proben und Instrumentarien stets auf Trockeneis gekühlt. Von den Proben wurden mit Hilfe eines Skalpells circa 2 mm große Stücke abgetrennt und diese mittels Mörser und Stößel pulverisiert, das Pulver wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, in welchen 500 µl Tripure-Reagenz vorgelegt worden

waren. Nach 5-minütiger Inkubation wurde das Lysat durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Nach Zugabe von 150 µl Chloroform und 15-sekündigem Vortexen folgte eine weitere Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Lysate 15 Minuten lang bei 4 °C und 15 000 rpm zentrifugiert, wodurch sich drei Phasen in den Eppendorfgefäßen bildeten. In der farblosen Oberphase sammelte sich die benötigte RNA. Diese Schicht wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, ohne dabei RNase aus der Interphase mit aufzunehmen. Nach Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol folgte eine weitere Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis, daran anschließend wurde 20 Minuten lang bei 4 °C und 15 000 rpm zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet welches zunächst in 1 ml 70 %igem Ethanol resuspendiert wurde, nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 15 000 rpm wurde mit einer Pipette möglichst viel Ethanol entfernt, der Rest verdampfte bei anschließender Inkubation auf Eis. Das getrocknete Pellet wurde in 55 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Mittels *NanoDrop*-Spektrophotometers konnte die RNA-Konzentration ermittelt und die Proben schließlich bei -80 °C aufbewahrt werden.

4.7.3.3 DNA-Isolierung

Um aus Zelllinien DNA zu isolieren, um für diese Arbeit eine *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchzuführen und eine *Heat Map* erstellen zu können, wurde das „DNeasy Kit“ von Qiagen verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels *NanoDrop*-Spektrophotometers ermittelt. Dabei sollte die Konzentration über 25 ng/µl liegen um die Proben weiter verwenden zu können.

Die isolierte DNA wurde für die Durchführung des *Microarrays* und der *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) an das Institut für Molekularbiologie

und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg versandt, wo Lukas Rycak die nötigen Analysen im Auftrag der AG Ellenrieder durchführte.

4.7.4 Zellbiologische Methoden

4.7.4.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien wurden zur Kultivierung in eine mit 20 ml Nährmedium (siehe Tabelle 5, Seite 30) gefüllte Kulturflasche überführt. Das Medium wurde nach zwei bis drei Tagen unter sterilen Bedingungen gewechselt. Die Lagerung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

Bei ausreichender Konfluenz der Zellen wurden diese unter sterilen Bedingungen in eine frische Zellkulturflasche passagiert. Das Nährmedium wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml DPBS gewaschen. Durch 3-minütige Inkubation mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C wurden die Zellen vom Boden gelöst und mit 10 ml Medium in ein 50 ml Polypropylengefäß aufgenommen. Diese Suspension wurde für 3 Minuten bei 1 200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der entstandene Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Ihrer Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend wurden die Zellen verdünnt und in neue Kulturflaschen gefüllt.

Sollten Zelllinien über einen längeren Zeitraum konserviert werden, konnten diese im Stickstofftank aufbewahrt werden. Für diesen Zweck wurde dem Kulturmedium DMSO in einer Verdünnung von 1:10 zugefügt. Die Zellen wurden in 1 ml Gefriermedium in ein Kryo-Gefäß überführt.

Das Auftauen der konservierten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Sobald die aufgetauten Zellen in einer Kulturflasche adhärent wuchsen, wurde das Nährmedium unter sterilen Bedingungen gewechselt.

Für einzelne Versuche wurde eine definierte Zellzahl benötigt, welche mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension in den Kapillarspalt einer solchen Kammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Anzahl der Zellen in jedem der vier gefüllten Quadrate in der Zählkammer bestimmt werden. Aus dem gebildeten Mittelwert der vier Quadrate konnte die Zellzahl pro Milliliter errechnet werden, daraus ließ sich das Suspensionsvolumen für die gewünschte Zellzahl ermitteln.

4.7.4.2 Zelltransfektion

Das transiente oder stabile Einbringen von DNA bzw. RNA in eukaryotische Zellen wird Transfektion bezeichnet. Für diese Arbeit wurde transient siRNA eingebracht, um zeitweilig die Expression bestimmter Gene zu hemmen. Des Weiteren wurde mit AntagoMiRs bzw. mit Mimics gearbeitet, was zur Hemmung bzw. Förderung des Effekts von MicroRNAs auf die Genexpression führte.

Für die Transfektion von siRNA wurde das Reagenz *siLentFect*[®] angewendet. Bei 70 - 80 % konfluenten Zellen in Medium ohne Serum- und Antibiotikazusatz konnte transfiziert werden. In Polystyrol-Röhrchen wurden pro Ansatz 150 µl Medium mit 7 µl siRNA vermischt, in einem zweiten Röhrchen 100 µl Medium mit 7 µl *siLentFect*[®]. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Inhalt beider Röhrchen zusammengeführt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Erfolg der siRNA-Transfektion beurteilen zu können wurde in gleicher Art und Weise zusätzlich ein Ansatz mit Kontroll-siRNA vorbereitet. Anschließend wurde das Gemisch auf die entsprechenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank bei 37 °C konnten die Zellen geerntet werden.

Die verwendeten siRNA-Konstrukte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

siRNA-Konstrukt	Sequenz	Referenz
NFATc1 #3	5'-gcg uuu cac gua ccu ucc utt-3'	Ambion (Carlsbad, USA)
p53 #2	5'-aca gcg ugg ugg uac cuu att -3'	Ambion (Carlsbad, USA)
SOX2 #3	5'-gca ccc gga uua uaa aua c-3'	Smart Pool, Thermo Scientific (Dreieich)
SOX2 #4	5'-gcu cgc aga ccu aca uga a-3'	Smart Pool, Thermo Scientific (Dreieich)

Tab. 9: Verwendete siRNA-Konstrukte.

Für die Transfektion von AntagoMiRs bzw. Mimics wurde das Reagenz *Lipofectamine*[®] angewendet. Bei 70 - 80 % konfluenten Zellen in Medium ohne Serum- und Antibiotikazusatz konnte transfiziert werden. In Polystyrol-Röhrchen wurden pro Ansatz 250 µl Medium mit 6 µl AntagoMiR bzw. Mimic vermischt, in einem zweiten Röhrchen 250 µl Medium mit 6 µl *Lipofectamine*[®]. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Inhalt beider Röhrchen zusammengeführt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Erfolg der Transfektion beurteilen zu können, wurde in gleicher Art und Weise zusätzlich ein Ansatz ohne AntagoMiR bzw. Mimic vorbereitet. Anschließend wurde das Gemisch auf die entsprechenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4 - 6 h im Brutschrank bei 37 °C wurde das Medium gewechselt, nach 24 h konnten die Zellen geerntet werden.

Die verwendeten Konstrukte sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Mimic	Sequenz	Referenz
miRNA-34a	5'- ugg cag ugu cuu agc ugg uug u-3'	Ambion (Carlsbad, USA)
miRNA-200c	5'- uaa uac ugc cgg gua aug aug ga-3'	Ambion (Carlsbad, USA)

Tab. 10: Verwendete Mimics.

AntagoMiR	Sequenz	Hersteller
miRNA-34a	5'- ugg cag ugu cuu agc ugg uug u-3'	Ambion (Carlsbad, USA)
miRNA-200c	5'- uaa uac ugc cgg gua aug aug ga-3'	Ambion (Carlsbad, USA)

Tab. 11: Verwendete AntagoMiRs.

4.7.4.3 Zellbehandlung mit CsA

Cyclosporin A (kurz: CsA) ist ein bekannter Inhibitor des NFAT-Signaltransduktionsweges und wurde für diese Arbeit mehrfach eingesetzt. Behandelt wurden die Zellen wenn sie eine Konfluenz von 70 – 80 % erreicht hatten mit 1 µl CsA pro Milliliter Kulturmedium. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Brutschrank bei 37 °C konnten die Zellen geerntet werden. Die Kontrollpopulation wurde mit H₂O behandelt.

4.7.4.4 Zeitreihenexperimente

Für die Erhebung funktioneller Daten wurden in dieser Arbeit Zellen über 24 Stunden unter dem Lichtmikroskop bezüglich ihrer Motilität beobachtet.

Hierfür wurden Zellen auf 6-Well-Platten ausgesät und entsprechend des Versuchsaufbaus vorbehandelt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70 - 80 % wurde mit Hilfe einer 200 µl-Pipettenspitze eine lineare Wunde im Zellrasen erzeugt. Die Breite der Wunde und die Motilität der Zellen wurden 24 Stunden lang unter dem Lichtmikroskop beobachtet und mit Hilfe der Software AxioVision Rel. 4.6[®] von Zeiss aufgezeichnet. Anschließend wurde die Wundschlussrate mittels *TimeLapseAnalyzer*-Software berechnet (Huth J et al. 2011). Es wurden jeweils 3 unabhängige Experimente durchgeführt, Mittelwert und Standardabweichung berechnet und das Signifikanzniveau mittels T-Test ermittelt.

4.7.4.5 Anlage von Zelllinien

Um Zelllinien aus entnommenen Pankreata anlegen zu können, wurden 2 - 3 mm große Biopsien entnommen und in gekühlten Petrischalen mit Hilfe eines gekühlten Skalpells zerkleinert. Im Anschluss wurden 10 ml Digestions Puffer zugefügt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Lysat wurde anschließend in 50 ml Polystyrol-Gefäße überführt und 5 Minuten bei 1 200 rpm zentrifugiert, das entstandene Pellet wurde in Digestions Puffer resuspendiert und für 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach weiterer Zentrifugation für 5 Minuten bei 1 200 rpm wurde das entstandene Pellet in Waschpuffer, welcher Trypsininhibitor enthielt, resuspendiert. Die Suspension wurde unter Verwendung eines 100 µm Mikrosiebs filtriert und erneut bei 1 200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend im entsprechenden Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gefüllt. Am nächsten Tag wurde das Medium unter sterilen Bedingungen gewechselt.

4.7.5 Immunologische Methoden

4.7.5.1 Gewinnung von Zelllysat

Die Voraussetzung für die Untersuchung der exprimierten Proteine einer Zelle, um auf die biochemischen Eigenschaften der Zelle schließen zu können, ist die Lyse der Zellmembran. Das Produkt dieses Verfahrens ist das Gesamtzelllysat.

Zunächst wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt und der Zellrasen mit DPBS gewaschen. Der angesetzte Lysepuffer wurde pro Milliliter mit 40 µl 25x Complete versetzt, je nach Größe der verwendeten *Wells* wurden hiervon 70 - 150 µl auf die Zellen gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturschale gelöst und anschließend mit dem Lysepuffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach kurzem Vortexen, wodurch die Destruktion der Zellmembran gefördert wurde,

wurden die Suspensionen für 10 Minuten bei 4 °C und 15 000 rpm zentrifugiert. Dies diente der Trennung der Zellbestandteile: im entstandenen Überstand sammelten sich die Proteine und dieser konnte in neue Eppendorfgefäße überführt werden.

4.7.5.2 Proteinnachweis mittels Western Blot-Analyse

Der quantitative Nachweis von Proteinen in verschiedenen Zelllinien sowie in Zellen aus Tumorgewebe erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Dieses Verfahren ist zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

Für die Western Blot-Analyse ist es essenziell für alle Proben die gleiche Proteinkonzentration einzusetzen, weswegen mittels quantitativer Proteinbiobestimmung nach Bradford zunächst die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt wurde.

Die Anwesenheit von Proteinen verschiebt das Absorptionsmaximum des Triphenylmethan Farbstoffes Coomassie-Brillinat-Blau-G-250 von 470 nm auf 595 nm. Diese Eigenschaft wurde im Bradford-Verfahren ausgenutzt. Dafür wurden in einem 96-Well 200 µl der Bradford-Lösung vorgelegt und mit 2 µl Zelllysat, in Doppelbestimmung, versetzt. Hierbei konnte ein Farbumschlag von blau nach braun entsprechend der Proteinkonzentration beobachtet werden. Zusätzlich wurde zur Erstellung der Kalibrierungskurve 1 µl, 2 µl, 4 µl und 8 µl BSA (*Bovine Serum Albumin*) eingesetzt.

Die verschiedenen Extinktionswerte wurden mittels Photometer detektiert und die Proteinkonzentrationen sowie die Mittelwerte der Doppelbestimmungen errechnet.

Im nächsten Arbeitsschritt wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C abgekocht, wodurch die Proteine denaturierten und eine monomere Struktur annahmen.

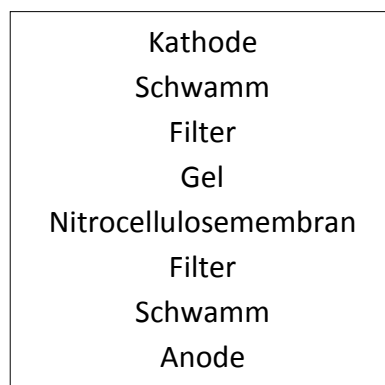
Die Auftrennung der Proteine aufgrund ihres Ladungs-Massen-Verhältnisses setzt eine Neutralisierung der Eigenladung der Proteine voraus. Das negativ geladene Reagenz SDS, welches im Ladepuffer, im Lysepuffer sowie im Gel selbst enthalten ist, bindet die Proteine, wodurch diese nach außen ebenfalls negativ geladen sind.

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele, die je nach Molekulargewicht des zu nachweisenden Proteins in 10 %iger oder 15 %iger Konzentration gefertigt wurden, wurden je zwei mit Alkohol gereinigte Glasplatten nach Einbringen von *Spacern* aneinander befestigt. In den dazwischen entstandenen Spalt wurden zunächst 500 µl Stoppgellösung eingebracht und nach dem Aushärten 5 ml Trenngellösung und 2 ml Sammelgellösung aufgeschichtet. In die Sammelgelschicht wurden Kämme eingebracht um die nötigen Geltaschen zu formen.

Die polymerisierten Gele konnten nun für die Elektrophorese verwendet werden. 20 µg Protein wurden hierfür mit 30 % Lämmli versetzt, bei 95 °C denaturiert und in die Geltaschen geladen, zusätzlich wurden 6 µl eines Proteinmarkers auf das Gel aufgetragen.

In den mit einfach konzentriertem Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammern wurde eine Anfangsspannung von 120 V angelegt. Die Spannung wurde nach Erreichen der Trenngelschicht auf 160 V erhöht.

Für die Western Blot-Analyse wurden die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran übertragen. Dieser Proteintransfer erfolgte mittels Elektro-Tank-Blotting wofür verschiedene Komponenten wie folgt hintereinander geschaltet wurden:



Der Übertragungsprozess erfolgt in einer mit Blotting Puffer gefüllten Trans-Blot-Kammer für 90 Minuten bei 400 mA und 4 °C.

Anschließend wurden mittels Ponceaulösung die Proteinbanden auf der Membran sichtbar gemacht, die Membranen zugeschnitten, mit TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde in 5 %igen Milchpuffer auf dem Kippschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken.

Zur Visualisierung der Proteine wurden die Effekte zweiteiliger Antikörpersysteme ausgenutzt. Ein primärer Antikörper bindet hierbei spezifisch ein Epitop des zu detektierenden Proteins. Der primäre Antikörper wird durch einen sekundären HRP (*horseradish peroxidase*)-Antikörper gebunden, welcher eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert und die Proteine sichtbar werden lässt.

Der proteinspezifische Primärantikörper wurde auf die geblockte Membran in entsprechender Verdünnung mit Milchpuffer aufgetragen und über Nacht bei 4 °C auf dem Kippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit TBST gewaschen und der Sekundärantikörper verdünnt in Milchpuffer zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler wurden die Membranen erneut mit TBST gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die verwendeten Primär-/ und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 12 und 13 (Seite 52) aufgeführt.

Zur abschließenden Visualisierung wurde ECL angewandt. Das darin enthaltene Luminol ist Substrat der Chemilumineszenzreaktion und wird katalysiert durch HRP des Sekundärantikörpers oxidiert, was zur Emission von sichtbarem Licht führt. Somit wurden die zu detektierenden Proteine auf einem Film in der Dunkelkammer indirekt sichtbar gemacht.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Größe (kDa)	Hersteller
β-actin HRP	Maus	1:20.000	42	Sigma-Aldrich (Steinheim)
E-Cadherin	Maus	1:1000	120	BD (Franklin Lakes, USA)
HA-NFATc1	Maus	1:1000	95	Cell signaling (Cambridge, UK)
N-Cadherin	Kaninchen	1:1000	135	Abcam (Cambridge, UK)
NFATc1	Maus	1:1000	95	Abcam (Cambridge, UK)
p53	Kaninchen	1:1000	53	Cell signaling (Cambridge, UK)
SNAI1	Maus	1:500	30	Cell signaling (Cambridge, UK)
SOX2	Kaninchen	1:500	43–34	Abcam (Cambridge, UK)
	Kaninchen	1:500	43	Cell signaling (Cambridge, UK)
TWIST1	Maus	1:500	22	Abcam (Cambridge, UK)
Vimentin	Maus	1:1000	57	BD (Franklin Lakes, USA)
ZEB1	Ziege	1:500	120	Santa Cruz (Dallas, USA)

Tab. 12: Verwendete Primärantikörper für die Western Blot-Analyse.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus	Pferd	1,5:10.000	Cell signaling (Cambridge, UK)
Anti-Kaninchen	Ziege	2:10.000	Cell signaling (Cambridge, UK)
Anti-Ziege	Maus	5:10.000	Santa Cruz (Dallas, USA)

Tab. 13: Verwendete Sekundärantikörper für die Western Blot-Analyse.

4.7.5.3 Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde für diese Arbeit mehrfach eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Hierfür wurde ein Protein mit den gebundenen Interaktionspartnern durch einen spezifischen Antikörper präzipitiert. Für den Proteinnachweis wurde abschließend eine Western Blot-Analyse durchgeführt.

Wie oben beschrieben wurden die Zellen lysiert, Gesamtzelllysat isoliert und in diesem die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es wurden 400 - 500 µg Protein für die IP eingesetzt.

Zunächst wurden die *Beads* im *Preclearing* vorbereitet, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Je nach Isoform des verwendeten Antikörpers wurden 20 µl Protein A-/ oder G-*Beads* pro IP bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt und der Rest mit DPBS gewaschen. 20 µl der mit DPBS 1:1 verdünnten *Beads* wurden in das Gesamtzelllysat überführt und zusätzlich 40 µl 25x Complete hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit DPBS auf 1 ml aufgefüllt und für 2 Stunden auf einem Überkoprotator bei 4 °C inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben erneut bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der entstandene Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Den Proben wurden jetzt die entsprechenden Antikörper (siehe Tabelle 14), bzw. der Negativkontrolle IgG, hinzugefügt.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
HA	Maus	1: 1 250	Cell Signaling
IgG	Maus	1:10 000	Santa Cruz

Tab. 14: Verwendete Antikörper für Immunpräzipitation

Nach der Inkubation auf dem Rotator bei 4 °C über Nacht folgte die Zugabe von 50 µl gewaschener und mit DPBS verdünnter *Beads*. Erneute 2-stündige Inkubation auf dem Rotator bei 4 °C diente der Stabilisierung des Antikörper-Protein-Komplexes.

Anschließend wurden die Proben bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die im Eppendorfgesäß verbleibenden *Beads* wurden dreimal mit 500 µl DPBS gewaschen und zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Die gewaschenen *Beads* wurden abschließend mit 65 µl Lämmli versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Dies führte zur Aufhebung der Interaktion zwischen den *Beads* und den Antikörper-Komplexen. Nach erneutem Zentrifugieren konnte der Überstand, welcher die präzipitierten Proteine enthielt, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden und eine Western Blot-Analyse hinsichtlich der zu untersuchenden Proteine durchgeführt werden.

4.7.5.4 Chromatin-Immunpräzipitation

Während der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurde die Bindung von Proteinen an bestimmten DNA-Regionen mittels Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, das Chromatin durch Sonifizieren fragmentiert und mittels IP Proteine samt gebundener DNA präzipitiert. Nach Lösung der Quervernetzung zwischen Protein und DNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Mit diesem Verfahren lässt sich *in vivo* die Bindung von Proteinen an bestimmten DNA-Regionen nachweisen.

Vorbereitend für die ChIP wurden die Zellen für jede zu untersuchende Kondition in drei 20 cm Zellkulturschalen ausgesät und entsprechend behandelt. Da eine hohe Zellzahl erforderlich war um ausreichend Chromatin isolieren zu können, wurde mit der Isolierung bei einer Konfluenz von 90 % begonnen. Im ersten Schritt sollten die Protein-DNA-Verbindungen fixiert werden. Für diesen Zweck wurde auf die Zellen 274 µl Formaldehyd pro 10 ml Kulturmedium gegeben, die Schalen vorsichtig geschwenkt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 550 µl 2,5 M Glycins pro 10 ml Kulturmedium und Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten stoppte die Kondensationsreaktion des Formaldehyds. Die Flüssigkeit wurde nun entfernt und der fixierte Zellrasen

mit eisgekühltem DPBS gewaschen, dieser mit Hilfe eines Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst und mit DPBS in 10 ml Polypropylengefäße überführt. Durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 1 200 rpm entstand ein Zellpellet, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 3 ml 25x Complete haltigem Lysepuffer I resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4 °C und 1 200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit RIPA-Puffer, welcher Proteinaseinhibitor enthielt, resuspendiert und auf drei Reaktionsgefäße (dreimal 1 ml) verteilt.

Im Anschluss wurden die Proben sonifiziert um das enthaltene Chromatin auf eine Länge von 200 - 1000 bp zu fragmentieren. Dabei wurden die Proben stets im Ethanol-Eisbad gekühlt. Bei einer Amplitude von 20 % lag die Pulszahl abhängig von der Zellkonfluenz zwischen 120 und 140 Pulsen pro Probe. Nach dem Sonifizieren wurden alle Proben der gleichen Kondition wieder in einem Polypropylengefäß zusammengeführt und bei 13 000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Effizienz der Fragmentierung des Chromatins wurden von jeder Probe 50 µl mit 0,66 µl RNase A und 1 µl Proteinase K in einem Eppendorfgefäß versetzt und 3 Stunden bei 55 °C, anschließend über Nacht bei 65 °C inkubiert. 10 µl dieser Probe wurden am Folgetag auf ein 1 %iges Agaroseelektrophoresegel aufgetragen, um zu überprüfen, ob die DNA-Fragmente eine Länge von 1 kB nicht überschreiten, ansonsten wurde die Sonifizierung wiederholt.

Im nächsten Schritt wurden die Protein Sepharose-*Beads* für die IP vorbereitet. Zum Blockieren der *Beads* wurden pro IP Agarose A-/oder G-*Beads* mit RIPA-Puffer gewaschen, anschließend mit 586 µl BSA (10 mg/ml), 438 µl *Salmon Sperm* (10 mg/ml) und 400 µl 25x Complete versetzt und auf

10 ml mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Der Ansatz inkubierte über Nacht bei 4 °C auf dem Rotator.

Am Folgetag wurden beim *Clearing* unspezifische Bindungen entfernt. Hierfür wurden die geblockten *Beads* für 5 Minuten bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, anschließend mit RIPA-Puffer 1:1 verdünnt, pro Ansatz 30 µl in ein Eppendorfgefäß überführt und mit RIPA-Puffer auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach der Zugabe von jeweils 1 µg Maus- und Kaninchen-IgG folgte eine Inkubation für 2 Stunden auf dem Rotator bei 4 °C. Der entstandene Überstand wurde den restlichen *Beads* zugeführt. Diese wurden erneut zentrifugiert, 1:1 mit RIPA-Puffer verdünnt und davon je 25 µl in jedes Falcon mit den sonifizierten Proben gegeben. Die Ansätze wurden erneut für 2 Stunden auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert.

Die restlichen 40 µl der Probe, welcher auf das Agarosegel aufgetragen wurde, wurde nun unter Verwendung des *Qiagen Purification Kits* aufgereinigt und mittels *Nano Drop* die DNA-Konzentration bestimmt.

Von jedem Probenansatz wurden im Anschluss 100 µg aus dem Überstand, welcher nach Zentrifugation entstanden war, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nun wurden die entsprechenden Antikörper (siehe Tabelle 15) hinzugefügt. Über Nacht wurden die Proben mit den Antikörpern bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Das Restvolumen der sonifizierten Proben wurde für die Inputkontrolle benötigt und bei 4 °C gelagert.

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Hersteller
H3K27 acetyliert IgG	Kaninchen	4 µg	Cell Signaling
	Maus	1 µg	Santa Cruz
	Kaninchen	1 µg	Santa Cruz
NFATc1	Kaninchen	20 µg	Santa Cruz
SOX2	Kaninchen	5 µg	Abcam

Tab. 15: Verwendete Antikörper für die Chromatin-Immünpräzipitation

Am nächsten Tag wurde der Überstand der geblockten Beads entfernt und diese mit RIPA-Puffer verdünnt. Jedem IP-Ansatz wurden 50 µl der *Beads* hinzugefügt und für 2 Stunden bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (1 min, 13 000 rpm, 4 °C) und der Überstand vorsichtig entfernt.

Die entstandenen Pellets wurden in folgender Reihenfolge mit jeweils 1 ml des entsprechenden Puffers gewaschen:

1 x Waschpuffer I -> 1 x Waschpuffer II
-> 2 x Waschpuffer III -> 2 x TE-Puffer

Zwischen den Waschvorgängen wurden die Proben jeweils für eine Minute bei 4 °C und 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Im Anschluss wurden die Pellets in 250 µl *Elution*-Puffer resuspendiert und 15 Minuten lang auf dem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde dieser Schritt wiederholt, wodurch sich die Formaldehydfixierung von Protein und DNA löste. Der Probe für die Inputkontrolle wurde 1 % des Volumens der IP-Ansätze entnommen und mit 500 µl *Elution*-Puffer verdünnt. Die eluierte DNA sowie die Inputkontrolle wurden anschließend mit 50 µl *Reversion*-Puffer vermischt und für 3 Stunden bei 55 °C und anschließend über Nacht bei 65 °C inkubiert.

Am letzten Versuchstag wurde die DNA mittels *Qiagen PCR Purification Kit* aufgereinigt und eine qRT-PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen 16 und 17 aufgeführt und wurden alle vom Hersteller Biomars aus Ulm bezogen. Für die Auswertung der CHIP mussten die Inputwerte von den Werten der IP-Proben subtrahiert werden.

Primer	Sequenz
SNAI 1 Enhancer <i>forward</i>	5'- caa cag aaa ggc aga aag aca ag-3'
SNAI 1 Enhancer <i>reverse</i>	5'-ccc ctc cca tgt ctt aag ttg -3'
TWIST 1 Enhancer <i>forward</i>	5'- tgt gag cat cgt cta caa gc-3'
TWIST 1 Enhancer <i>reverse</i>	5'-cac gaa atc ccc act gta att g -3'
ZEB 1 Enhancer <i>forward</i>	5'-gcc aaa ttg ttc cct gtg aag -3'
ZEB 1 Enhancer <i>reverse</i>	5'- ctt atg taa cga tcg acc cca-3'

Tab. 16: Verwendete ChIP-Primer für murine Zellen.

Primer	Sequenz
TWIST 1 Enhancer <i>forward</i>	5'- tcg agg ttg gca ctg tat tg-3'
TWIST 1 Enhancer <i>reverse</i>	5'- acg gct ggt agg aat gtg ac-3'
ZEB 1 Enhancer <i>forward</i>	5'-tgt gtg cag cac tgt gac tt -3'
ZEB 1 Enhancer <i>reverse</i>	5'- aca aaa ggc tgt gga gtt gg-3'

Tab. 17: Verwendete ChIP-Primer für humane Zellen.

4.7.6 RNA-Analyse mittels qRT-PCR

4.7.6.1 qRT-PCR-Analyse auf mRNAs

Für die Extraktion von RNA aus Zelllinien wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und vorbehandelt. Nach Erreichen ausreichender Konfluenz wurde das Kulturmedium entfernt und der Zellrasen mit DPBS gewaschen. Für die Gewinnung der RNA kam das *Qiagen RNeasy-Mini-Kit* zum Einsatz, es wurde nach dessen Protokoll verfahren. Zum Lösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschalen wurde dem RLT-Puffer des Kits β -Mercaptoethanol zugefügt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt konnte die RNA in 1,5 ml Eppendorfgefäßen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Um die Güte der gewonnenen Probe zu ermitteln wurde mittels *Nano Drop* (ND-1000) Spectrophotometer die Konzentration der RNA bestimmt. Dabei sollte unter anderem das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm

in 1,5 µl der Probe über 2,0 liegen, geringere Werte waren dabei Hinweis auf Kontaminationen.

Um eine qRT-PCR durchführen zu können musste die zuvor isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde das *Omniscript Reverse Transkriptase Kit* verwendet, es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und somit für jeden Ansatz folgende Volumina eingesetzt:

2	µl	10xBuffer RT
2	µl	dNTP Mix
0,4	µl	Oligo dt Primer
0,5	µl	RNase Inhibitor
<u>1</u>	<u>µl</u>	<u>Omniscript RT</u>
+ 2	µl	RNA
+ <u>12,91</u>	<u>µl</u>	<u>RNase-freies Wasser</u>
= 20	µl	Probe

Die Synthese der cDNA erfolgte bei 37 °C, die Dauer der Inkubation belief sich auf 90 Minuten. Anschließend wurden die Proben mit Aqua dest. auf 200 µl Volumen aufgefüllt.

Mittels *Polymerase-chain-reaction* (PCR) konnte ein Nachweis der Expression bestimmter Gene auf mRNA-Ebene erbracht werden. Bei der hier beschriebenen qRT-PCR (*Real-Time-quantitative-PCR*) konnte aufgrund einer Fluoreszenzreaktion durch den Farbstoff SYBR-Green, welcher sich an amplifizierte RNA anlagert und somit dessen Reaktion proportional zum RNA-Gehalt ansteigt, die exponentielle RNA-Vervielfältigung während eines PCR-Zyklus erfasst werden.

Das Prinzip der PCR-Analyse ist die vielfache Wiederholung von Zyklen verschiedener Reaktionen. Auf die DNA-Denaturierungsreaktion folgen Primer-Hybridisierungs- und RNA-Amplifikationsreaktion. Diese Teilschritte der PCR unterliegen einem definierten Zeit- und Temperaturschema, dieses wurde wie folgt im PCR-Gerät programmiert:

95 °C	10 min	
95 °C	15 sek	} 40x
60 °C	1 min	
95 °C	15 sek	
60 °C	1 min	
95 °C	15 sek	

Die eingesetzten Primer flankierten dabei die zu amplifizierende Sequenz und sind in den Tabellen 18 und 19 aufgeführt. Sie wurden vom Hersteller Biomers aus Ulm bezogen.

Primer	Sequenz
E-Cadherin forward	5'-aga aaa tgc tgg ccg att taa-3'
E-Cadherin reverse	5'-cct gag tgc tgg gct taa agg-3'
NFATc1 forward	5'-gcc ttt tgc gag cag tat ct-3'
NFATc1 reverse	5'-gct gcc ttc cgt ctc ata gt-3'
p53 forward	5'-tgg acc ctg gca cct aca at-3'
p53 reverse	5'-gga aag tag gcc ctg gag gat-3'
SNAI 1 forward	5'-ccg gaa gcc caa cta tag cga-3'
SNAI 1 reverse	5'-aca gcg agg tca gct cta gc-3'
SOX 2 forward	5'-aag ggt tct tgc tgg gtt tt-3'
SOX 2 reverse	5'-aaa cgg tct tg cca cga-3'
TWIST 1 forward	5'-cgg gtc atg gct aac gtg-3'
TWIST 1 reverse	5'-cag ctt gcc atc ttg gag tc-3'
Vimentin forward	5'-atg ctt ctc tgg cac gtc tt-3'
Vimentin reverse	5'-agc cac gct ttc ata ctg ct-3'
xs13 forward	5'-tgg gca aga aca cca tga tg-3'
xs13 reverse	5'-agt ttc tcc aga gct ggg ttg t-3'
ZEB 1 forward	5'-gag ccg cca gtg aag gtg atc-3'
ZEB 1 reverse	5'-gtg agg cct ctt acc tgt gtg ct-3'

Tab. 18: Verwendete Primer für qRT-PCR in murinen Zellen.

Primer	Sequenz
SOX 2 forward	5'-ttc aca tgt ccc agc act ac-3'
SOX 2 reverse	5'-tcc atg ctg ttt ctt act ctc c-3'
TWIST 1 forward	5'- act cca aga tgg caa gct g- 3'
TWIST 1 reverse	5'- tgt cca ttt tct cct tct ctg g- 3'
Vimentin forward	5' gat gtt gac aat gcg tct ctg gc- 3'
Vimentin reverse	5'- atg ctg ttc ctg aat ctg agc- 3'
xs13 forward	5'gtc gga gga gtc gga cga g-3'
xs13 reverse	5'- gcc ttt att tcc ttg ttt tgc aaa -3'
ZEB 1 forward	5'- gca tac acc tac tca act acg- 3'
ZEB 1 reverse	5'- ttt ggg cgg tgt aga atc ag- 3'

Tab. 19: Verwendete Primer für qRT-PCR in humanen Zellen.

Für die qRT-PCR wurden 96-Well-Platten benutzt. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wurden 10 µl 2x SYBR Green, 0,1 µl Primer *forward*, 0,1 µl Primer *reverse* und 7,8 µl RNase-freies Wasser vorgelegt. Jedem Ansatz wurden 2 µl der entsprechenden, verdünnten cDNA zugefügt.

Die Ergebnisse wurden mithilfe der $\Delta \Delta C_T$ -Methode (Applied Biosystems) ausgewertet.

4.7.6.2 qRT-PCR-Analyse auf miRNAs

Mehrfach wurde für diese Arbeit die Expression von MicroRNAs unter bestimmten Bedingungen untersucht.

Hierfür wurde aus der isolierten RNA unter Verwendung der *TaqMan*[®] *MicroRNA Reverse Transcription Kits* cDNA für miRNAs hergestellt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Pro Ansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

- 7 µl Master Mix
- 3 µl 5xPrimer
- 5 µl RNA
- 15 µl Probe

Im Thermozykler wurden die Ansätze nach folgendem Schema inkubiert:

16 °C	30 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min
4°C	∞

Im Anschluss an die Inkubation wurde die qRT-PCR vorbereitet. Hierfür wurde nach dem *TaqMan® Universal Master Mix II*-Protokoll von Applied Biosystems vorgegangen. Für jeden Ansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

10 µl TaqMan® Universal Master Mix II
 1 µl TaqMan® 20xPrimer
 4,8 µl cDNA
4,2 µl RNase-freies Wasser
 20 µl Probe

Die Teilschritte der PCR unterliegen einem definierten Zeit- und Temperaturschema, dieses wurde wie folgt im PCR-Gerät programmiert:

50 °C	2 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sek	← 40x
60 °C	1 min	

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Applied Biosystems) ausgewertet.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Primer	Hersteller	Assay ID
hsa-miR-34a	Applied Biosystems (Foster City, USA)	000426
hsa-miR-200c	Applied Biosystems (Foster City, USA)	002300
U6 snRNA	Applied Biosystems (Foster City, USA)	001973

Tab. 20: Verwendete Primer für qRT-PCR- Analyse auf miRNAs.

4.7.7 Immunfluoreszenz

Um Angaben über die subzelluläre Lokalisation von Proteinen machen zu können, wurden diese mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes markiert und unter Anwendung der Lichtmikroskopie nachgewiesen. Durch Verwendung mehrerer Farbstoffe konnte außerdem das Verhältnis verschiedener Proteingruppen zueinander und eine mögliche Colokalisation dargestellt werden. Es kam das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung zur Anwendung, bei welcher gekoppelte Antikörpersysteme eingesetzt wurden. Ein primärer Antikörper richtet sich dabei gegen das zu detektierende Epitop des Proteins, sekundäre, fluoreszierende Antikörper interagieren mit dem primären Antikörper, was den indirekten Nachweis des Proteins liefert.

In 6-Well-Zellkulturplatten wurden auf runden Deckgläsern Zellen ausgesät und entsprechend des Versuchsaufbaus vorbehandelt. Das Kulturmedium wurde vorsichtig entfernt und die Zellen mit 300 µl DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 300 µl 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Nach 15-minütiger Inkubation wurde der Zellrasen erneut mit DPBS gewaschen. Es folgte die Permeabilisierung der Zellmembran mit 300 µl in PBS verdünntem 0,2 %igem TritonX-100. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen viermal mit DPBS gewaschen und für eine Stunde mit 10 % FCS in DPBS inkubiert, was zur Maskierung unspezifischer Bindungen führte. Anschließend wurden die Primärantikörper verdünnt mit 10 % FCS in PBS hinzugefügt (siehe Tabelle 21).

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
HA	Maus	1:100	Cell Signaling
SOX 2	Kaninchen	1:200	Abcam
Maus IgG FITC	Maus	1:500	Abcam
IgG H&L Cy3	Kaninchen	1:500	Abcam

Tab. 21: Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Zellrasen erneut dreimal mit DPBS gewaschen und schließlich die fluoreszierenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 21) zugefügt.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurde die Flüssigkeit von den Zellen entfernt und die Deckgläser mit den Zellen entnommen. Nach Zugabe von 2 Tropfen DAPI auf die Zellen wurde das Deckglas auf einem Objektträger fixiert. Mit dem DAPI-Medium werden AT-reiche Regionen der DNA angefärbt, was eine objektive Differenzierung zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglichte.

Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung konnte abschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

4.7.9 Statistische Auswertung

Für alle numerischen Ergebnisse wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet und in Säulendiagrammen abgebildet, dabei stellen die Säulen die Mittelwerte, die Fehlerbalken die Standardabweichungen dar. Die statistische Auswertung für $n > 1$ erfolgte mit Excel durch den ungepaarten, einseitigen T-Test. Dabei wurden p -Werte $< 0,05$ als signifikant, p -Werte $< 0,01$ als hoch signifikant betrachtet.

5. Ergebnisse

5.1 Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion im fortgeschrittenen Pankreaskarzinom geht mit Entdifferenzierung und epithelial-mesenchymaler Transition einher

Während der Progression des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas nimmt die Expression an nukleärem NFATc1 zu (Baumgart et al. 2012). Immunhistochemische Analysen von Pankreastumoren verschiedener Differenzierungsgrade aus dem NKC-Mausmodell zeigen zudem, dass mit zunehmender Entdifferenzierung der PDACs die Expression von p53 abnimmt (siehe Abbildung 10).

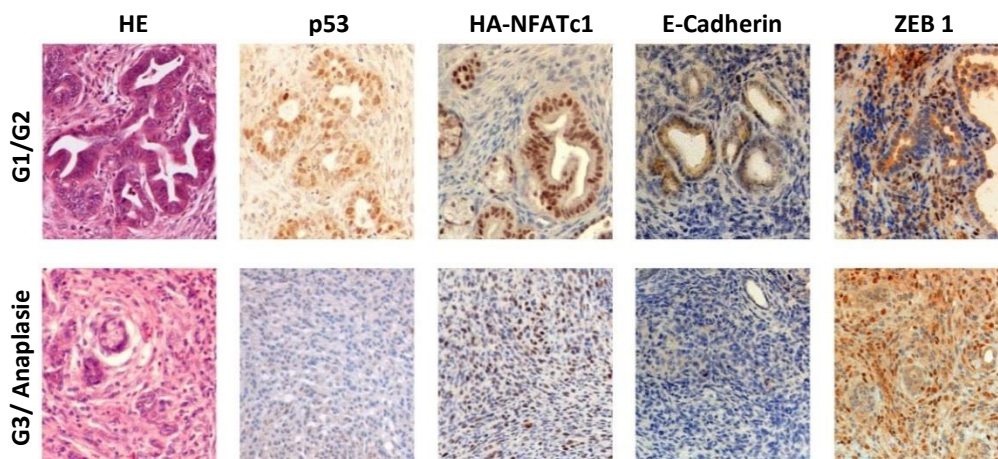


Abb. 10: HE-Färbung und immunhistochemische Analyse des Expressionsverhaltens von p53, HA-NFATc1, E-Cadherin und ZEB 1 in murinen Pankreastumoren verschiedener Differenzierungsgrade aus dem NKC-Mausmodell. Die Abbildungen stellen 20-fache Vergrößerungen dar.

Tumore mit guter bis mäßiger Differenzierung zeigen eine positive p53-Färbung sowie eine positive Färbung auf E-Cadherin, einem epithelialen Marker. Die Marker der epithelialen-mesenchymalen Transition, hier repräsentiert durch ZEB 1, werden hingegen in G1/ G2-Tumoren kaum exprimiert. Die Analyse schlecht differenzierter und völlig anaplastischer Tumore ergibt neben der fehlenden Expression von p53 ebenfalls die Abnahme der E-Cadherin-Expression im Vergleich zu besser

differenzierten Tumoren. Anaplastische Tumore sind in der Färbung auf den EMT-Marker ZEB 1 positiv.

Molekularbiologische und immunologische Experimente bestätigen diese Erkenntnisse (Abbildung 11).

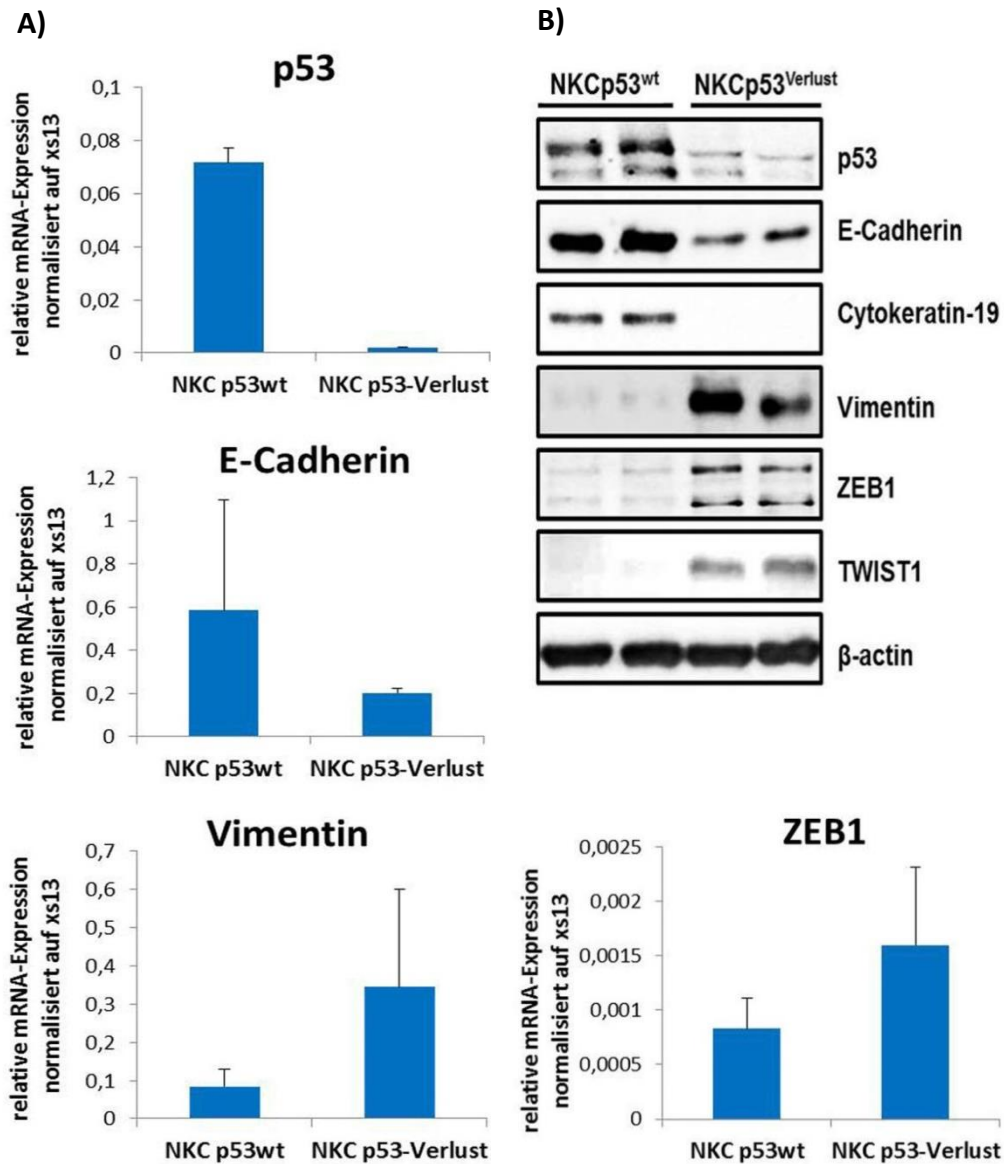


Abb. 11: Expressionsverhalten von EMT-Markern in murinen Pankreastumoren mit p53-Wildtyp und nach Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion. Aus den Pankreata von NKc-Mäusen wurde RNA (A) und Gesamtzelllysat (B) isoliert. Abbildung A zeigt die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$). Abbildung B demonstriert die Expression auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β -actin dient als Ladekontrolle.

Mit dem Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion, welcher mit zunehmendem Grad an Entdifferenzierung eintritt, nimmt die mRNA-Expression von E-Cadherin ab, während die des mesenchymalen Markers Vimentin steigt. Die Expression des EMT-Markers ZEB 1 auf mRNA-Ebene nimmt mit der Abnahme der p53-mRNA-Expression zu (Abbildung 11 A).

Die Analyse auf Proteinebene zeigt analoge Ergebnisse (Abbildung 11 B). In Proben mit Wildtyp-p53 ist die Expression der epithelialen Marker E-Cadherin und Cytokeratin-19 hoch, die von Vimentin und den EMT-Markern gering. Im Gegensatz dazu ergibt die Western Blot-Analyse in Proben mit verminderter p53-Expression ein nur schwaches Signal für epitheliale Marker, das Signal für Vimentin, ZEB 1 und TWIST 1 nimmt an Intensität im Vergleich zur p53-Wildtyp-Situation zu.

5.2 In vitro führt der *Knockdown* des Tumorsuppressors p53 zu erhöhter Expression von EMT-Markern

Aus den Pankreata von NKC-Mäusen mit gut bis mäßig differenzierten Tumoren wurden Zellen isoliert und kultiviert. Die hieraus resultierende Zelllinie wird im Folgenden NKC II genannt.

In NKC II-Zellen wurden nach erfolgreichem p53-*Knockdown* genomweite Genexpressionsanalysen durchgeführt, um herauszufinden welche Gene durch den *Knockdown* aktiviert bzw. inaktiviert werden. Hierfür wurde nach Aufreinigung und Quantifizierung der RNA durch *Microarray* eine *Gen Set Enrichment* Analyse (GSEA) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 A dargestellt. Beim Vergleich der Expressionsprofile der beiden Gruppen, p53-Wildtyp und p53-*Knockdown* ist festzustellen, dass mit Differenzierung und *Tumor fail-safe*-Mechanismen assoziierte Gene herunterreguliert, während Gene assoziiert mit epithelial-mesenchymaler Transition und Metastasierung hochreguliert werden.

In Abbildung 12 B ist eine *Heat Map* zur Visualisierung der Expressionsdaten verschiedener Marker vor und nach p53-*Knockdown* in NKC II-Zellen dargestellt. Die Inaktivierung von p53 durch siRNA führt zur Geninduktion des mesenchymalen Markers *Vimentin* und einiger EMT-Marker, wie *ZEB 1* und *TWIST 1*.

A)

Tumor fail-safe and differentiation		NES	FDR
1	KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	- 2,47	000
2	MCMURRAY_TP53_HRAS_COOPERATION_RESPONSE_DN	- 2,41	000
3	AMUNDSON_DNA_DAMAGE_RESPONSE_TP53	- 2,16	001
4	BIOCARTA_P53_PARHWAY	- 1,98	019
5	DUTTA_APOPTOSIS_VIA_NFKB	- 1,78	107
6	ONDER_CDH1_TARGETS_1_UP	- 1,70	173

EMT and metastasis		NES	FDR
1	WINNEPENINCKX_MELANOMA_METASTASIS_UP	2,69	000
2	SOTRIOU_BREAST_CANDER_GRADE_1_VS_3_U	2,61	000
3	KAUFFMANN_MELANOMA_RELAPSE_UP	2,51	000
4	BIDUS_METASTASIS_UP	2,31	000
5	JAEGER_METASTASIS_UP	2,10	000
6	BOYALT_LIVER_CANCER_SUBCLASS_G23_UP	2,01	003

B)



Abb. 12: Expressionsanalyse nach p53-*Knockdown* in NKC II-Zellen. NKC II-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen p53 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA isoliert. Abbildung A zeigt die *Gen Set Enrichment Analyse* nach *Microarray*. In B ist die *Heat map* der Genexpressionsdaten verschiedener Marker vor und nach p53-*Knockdown* dargestellt. Chd1 dient als Kontrolle.

Die Ergebnisse der RT-PCR und der Western Blot-Analyse gehen miteinander konform. In Zellen, die mit p53-siRNA transfiziert wurden, zeigt sich eine vermehrte Expression der EMT-Marker und des mesenchymalen Vimentins, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. E-Cadherin, ein epithelialer Marker, hingegen nimmt mit der verminderten p53-Expression auf Proteinebene ab (Abbildung 13).

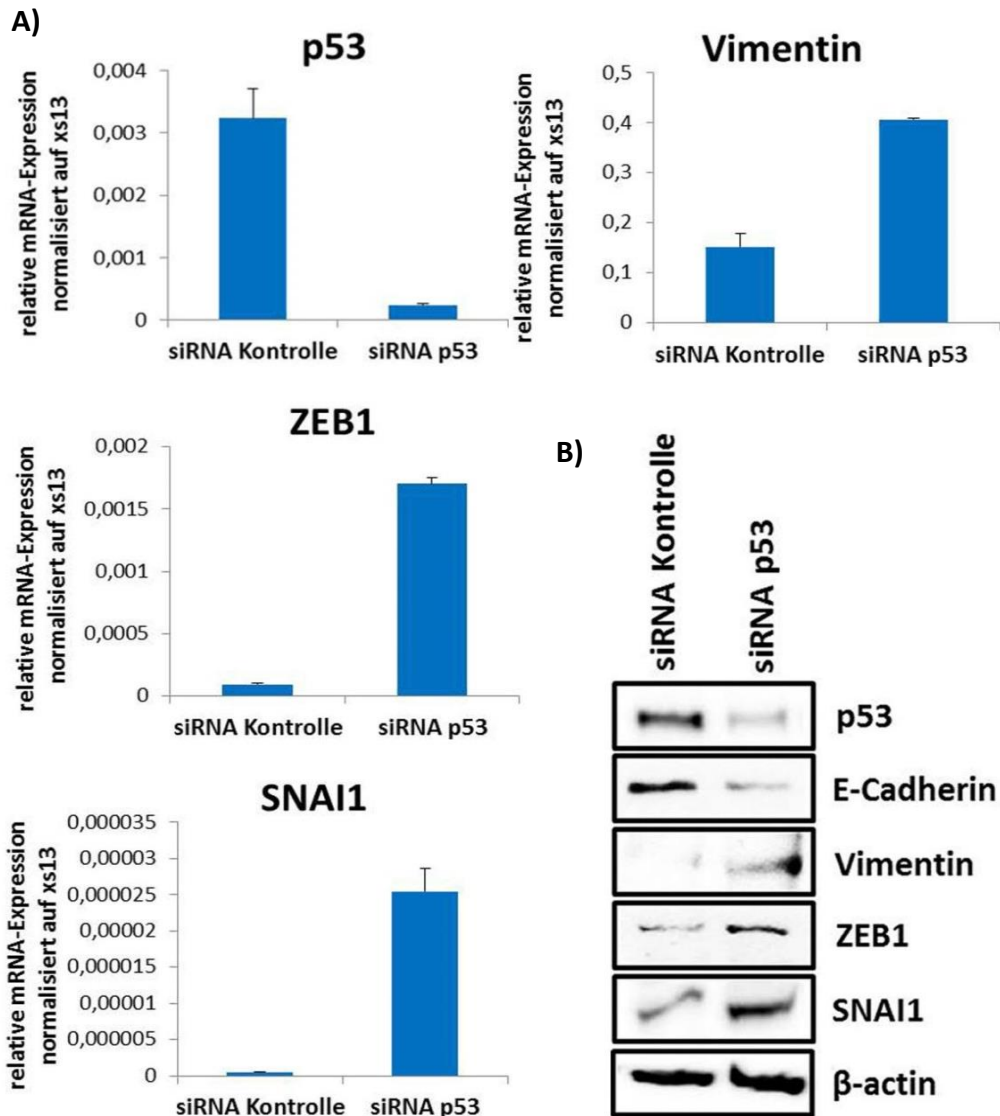


Abb. 13: Expressionsverhalten von EMT-Markern in NKC II-Zellen nach p53-Knockdown. NKC II-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen p53 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA (**A**) und Gesamtzelllysat (**B**) isoliert. Abbildung **A** zeigt die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,01$). Abbildung **B** demonstriert die Expression auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β -actin dient als Ladekontrolle.

Zusammenfassend führen die bisherigen Resultate zur Annahme, dass der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion, der während der Entdifferenzierung des duktaalen Pankreaskarzinoms stattfindet, in Induktion von EMT und damit einhergehender Invasion und Metastasierung mündet.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden funktionelle Untersuchungen in Form eines Zeitreihenexperimentes durchgeführt (Abbildung 14).

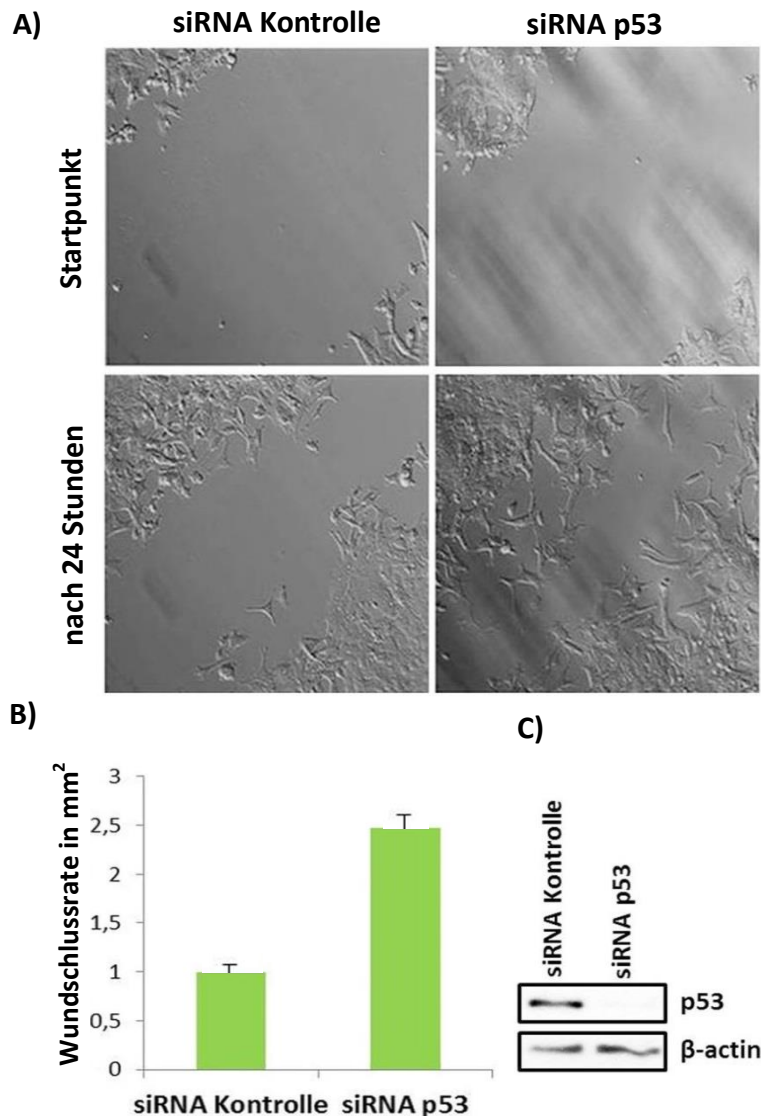


Abb. 14: Zeitreihenexperiment in NKC II-Zellen nach p53-Knockdown. NKC II-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen p53 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Abbildung **A** zeigt die Wunde zu Beginn und nach 24 Stunden, sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach p53-Konckdown. Abbildung **B** zeigt die Wundschlussrate beider Gruppen als Quantifizierung des Experiments ($p < 0,01$). **(C)** Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysat isoliert. Der Western Blot demonstriert den p53-Knockdown.

Zu Beginn des Experiments wurde eine Wunde in die besiedelten Zellkulturschalen eingebracht. Auf den Fotos in Abbildung 14 A ist die Annäherung der Wundränder nach 24 Stunden zu sehen. Die Wunde in den unbehandelten Kontrollzellen war nach Ablauf dieser Zeit weiter geöffnet als die Wunde in den Zellen, in denen p53 durch *Knockdown* inaktiviert wurde. Die Zellen gewinnen mit p53-Inaktivierung an Motilität. Dies spiegelt sich auch in der Wundschlussrate, der statistischen Analyse des Experiments, wider (Abbildung 14 B). Die Wundschlussrate der Zellen nach siRNA-Transfektion ist, im Vergleich zur Rate der Kontrollzellen, um das 2,5-fache gestiegen.

5.3 Verlust von p53 durch Mutation oder Deletion resultiert in der Entwicklung NFATc1 vermittelter anaplastischer, metastasierender Tumore

Wie bereits oben beschrieben führt die Kombination aus Kras- und NFATc1-Überexpression mit dem Hintergrund der Inaktivierung von p53 durch Mutation im Mausmodell zur Entwicklung aggressiver anaplastischer Pankreaskarzinome, an welchen die Tiere im Median innerhalb von 50 Tagen versterben (siehe Dissertationsschrift von Sophia Vogt 2016, AG Ellenrieder; Singh et al. 2015).

Die Analyse der Leberpräparate ergab zusätzlich eine hohe Inzidenz an Makro- und Mikrometastasen. Auch mit Metastasen durchsetzte Lymphknoten konnten gefunden werden (Abbildung 15).

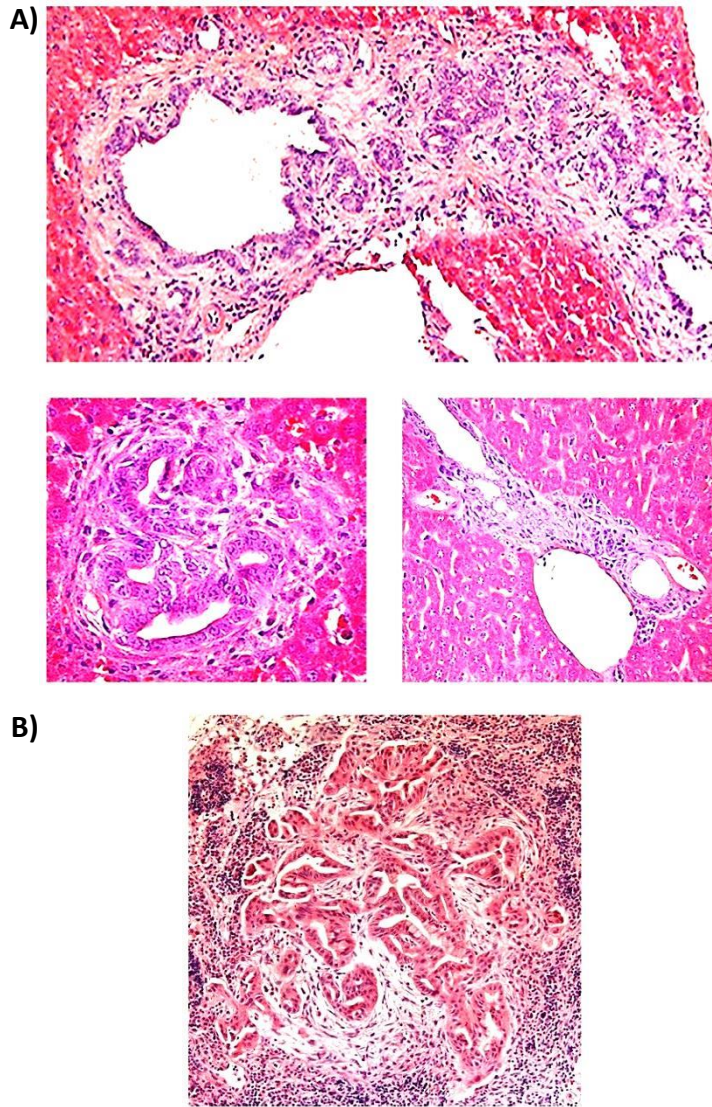


Abb. 15: HE-Färbungen von Lebermetastasen (A) und einer Lymphknotenmetastase (B) von Pankreaskarzinomen aus dem KNPC-Mausmodell.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die aus den Versuchen mit KNPC-Tieren gewonnenen Erkenntnisse aus dem Verlust der Tumorsuppressorfunktion oder dem, auf der Mutation des Tumorsuppressors begründeten, Zugewinn andere Funktionen von p53 resultiert, wurde in Kooperation mit Sophia Vogt ein weiteres Mausmodell generiert.

Wie auch im KNPC-Modell wurden hierfür die konstitutive Expression von *c.n.NFATc1* und *Kras^{G12D}* durch die pankreasspezifische Rekombinase p48-Cre forciert. Der Tumorsuppressor p53 wurde in diesem Modell jedoch nicht mutiert, sondern heterozygot deletiert. Der organspezifische p53-

Knockout wurde durch Einkreuzen der Rekombinase p48-Cre im Pankreas realisiert. Das hieraus resultierende *LSL-Kras^{G12D};c.n.NFATc1;p53^{wt/Δ}* ^{21,30-33}; *p48-Cre*-Modell wird im Folgenden als *KNP^{+/-}C* bezeichnet.

Bei *KNP^{+/-}C*-Mäusen konnte bereits ab einem Alter von drei Wochen ein vergrößertes und rundlich aufgetriebenes Abdomen festgestellt werden. Bei der Autopsie der Tiere stellt sich ein stark vergrößertes Pankreas mit soliden und zystischen Anteilen dar. Durch die Größenzunahme des Pankreas kommt es zur Verdrängung der Nachbarorgane, resultierend in einer prall-elastisch gefüllten Gallenblase und dilatierten Darmschlingen, sowie Aszitesbildung. Weiterhin sind in Abbildung 16 makroskopisch sichtbare Metastasen in der entnommenen Leber zu erkennen.

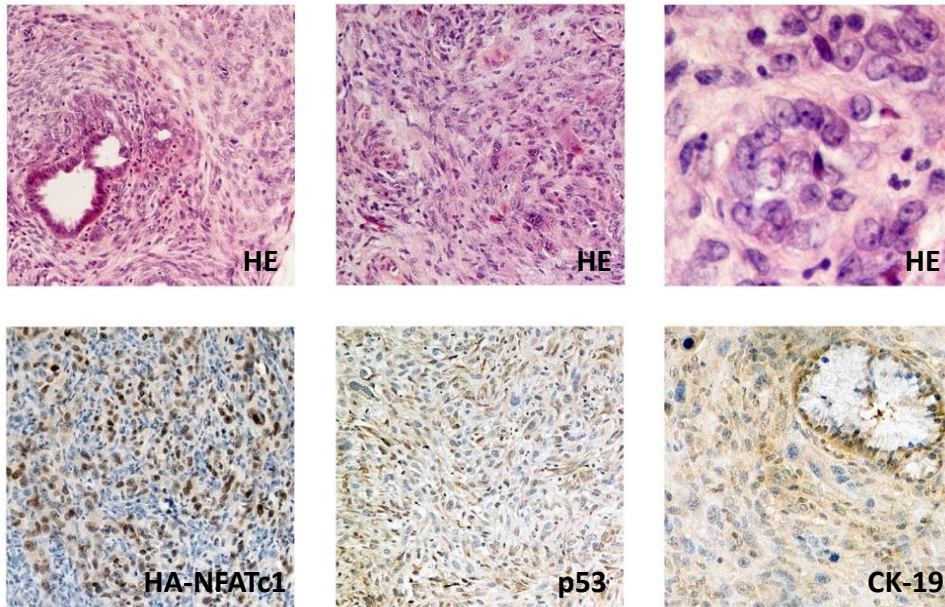


Abb. 16: Charakterisierung der *KNP^{+/-}C*-Maus (Makroskopie). Repräsentative Darstellung des Profils, des eröffneten Bauchsitus sowie des entnommenen Pankreas und der Leber einer *KNP^{+/-}C*-Maus im Alter von 59 Tagen.

In der HE-Färbung der Pankreaspräparate ist der hohe Grad an Entdifferenzierung bis hin zur völligen Anaplasie der Tumore zu erkennen. Die Immunhistochemie in Abbildung 17 A zeigt eine positive HA-NFATc1-Färbung bei negativer p53-Kernfärbung. Zusätzlich ist die negative CK-19-Färbung in anaplastischen Arealen abgebildet.

Auch die entnommenen Leberpräparate wurden mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt (Abbildung 17 B). Hier stellen sich neben den makroskopisch sichtbaren Metastasen zahlreiche Mikrometastasen dar.

A) Pankreas



B) Leber

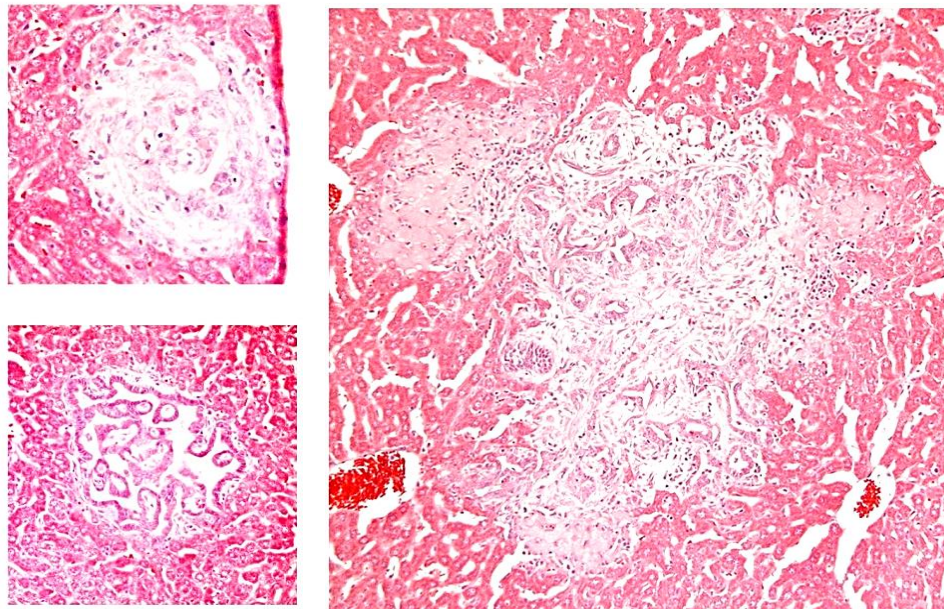


Abb. 17: Charakterisierung der KNP^{+/-} C-Maus (Mikroskopie). **A)** HE-Färbung und immunhistochemische Analyse des Expressionsverhaltens von HA-NFATc1, p53 und CK-19 des entnommenen Pankreasgewebes. **B)** HE-Färbung von Leberschnitten. Für die Immunhistochemie wurden die Gewebsschnitte mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, die Visualisierung erfolgte mit DAB.

Die Überlebensdauer von Tieren des $KNP^{+/-}C$ -Modells liegt im Durchschnitt bei 63 Tagen (Abbildung 18 A), ist demnach vergleichbar mit dem medianen Überleben der $KNPC$ -Mäuse. In Abbildung 18 B sind die Kaplan-Meier-Kurven im Vergleich mit jenen von $p48-Cre$ - und NKC -Mäusen, welche im Durchschnitt deutlich länger (140 Tage) überleben, dargestellt.

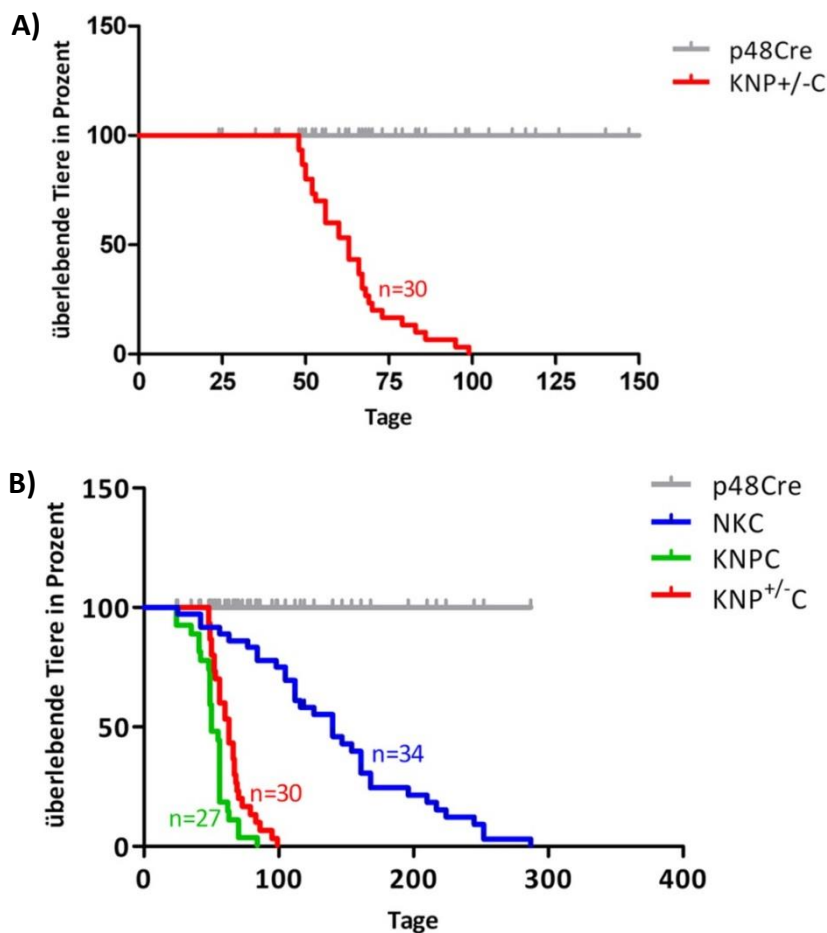


Abb. 18: Kaplan-Meier-Überlebenskurven der $KNP^{+/-}C$ - (A) bzw. NKC -, $KNPC$ - und $KNP^{+/-}C$ -Mäuse im Vergleich (B). Die Daten von $p48-Cre$ -Mäusen wurden als Kontrolle in die Kurven eingefügt. Jede Stufenbildung repräsentiert einen Todesfall. $P < 0,0001$ für $KNPC$ bzw. $KNP^{+/-}C$ gegen NKC (Log-Rang-Test im Zwei-Gruppenvergleich).

Das ähnliche phänotypische Verhalten des $KNPC$ - und $KNP^{+/-}C$ -Genotyps zeigt, dass in erster Linie der Verlust der $p53$ -Tumorsuppressorfunktion die Progression des duktales Adenokarzinoms des Pankreas fördert und nicht,

wie es für anderen Karzinomarten bekannt ist, eine *Trp53-gain-of-function*-Mutation.

Zur weiteren Analyse werden in Abbildung 19 gut bis mäßig differenzierte Tumore aus dem NKC-Modell mit anaplastischen Tumoren von KNPC- und $KNP^{+/-}$ C-Mäusen bezüglich ihres Expressionsverhaltens verschiedener Proteine verglichen.

Hier zeigt sich eine mit dem Grad der Entdifferenzierung zunehmende, positive HA-NFATc1-Färbung, dies geht mit den Erkenntnissen von Baumgart et al. (2012) konform.

Während NKC-Tumore E-Cadherin exprimieren, fällt die entsprechende Färbung anaplastischer Tumore negativ aus. Das Ergebnis der Vimentin-Färbung verhält sich gegenläufig, NKC-Tumore sind negativ, anaplastische Tumore positiv auf Vimentin anfärbbar.

Des Weiteren wurde eine immunhistochemische Färbung auf ZEB 1, als Vertreter der EMT-Marker, durchgeführt. Hier zeigt sich in mäßig differenzierten Tumoren aus dem NKC-Mausmodell keine positive Kernfärbung. In KNPC- bzw. $KNP^{+/-}$ C-Tumoren, welche anaplastisch entdifferenziert sind, ist die Färbung auf nukleär lokalisiertes ZEB 1 positiv.

Die Zusammenschau der bisherigen Resultate lässt darauf schließen, dass sich Pankreaskarzinomzellen während der Tumorprogression einer epithelial-mesenchymale Transition unterziehen und dies zur Entdifferenzierung des Tumors führt.

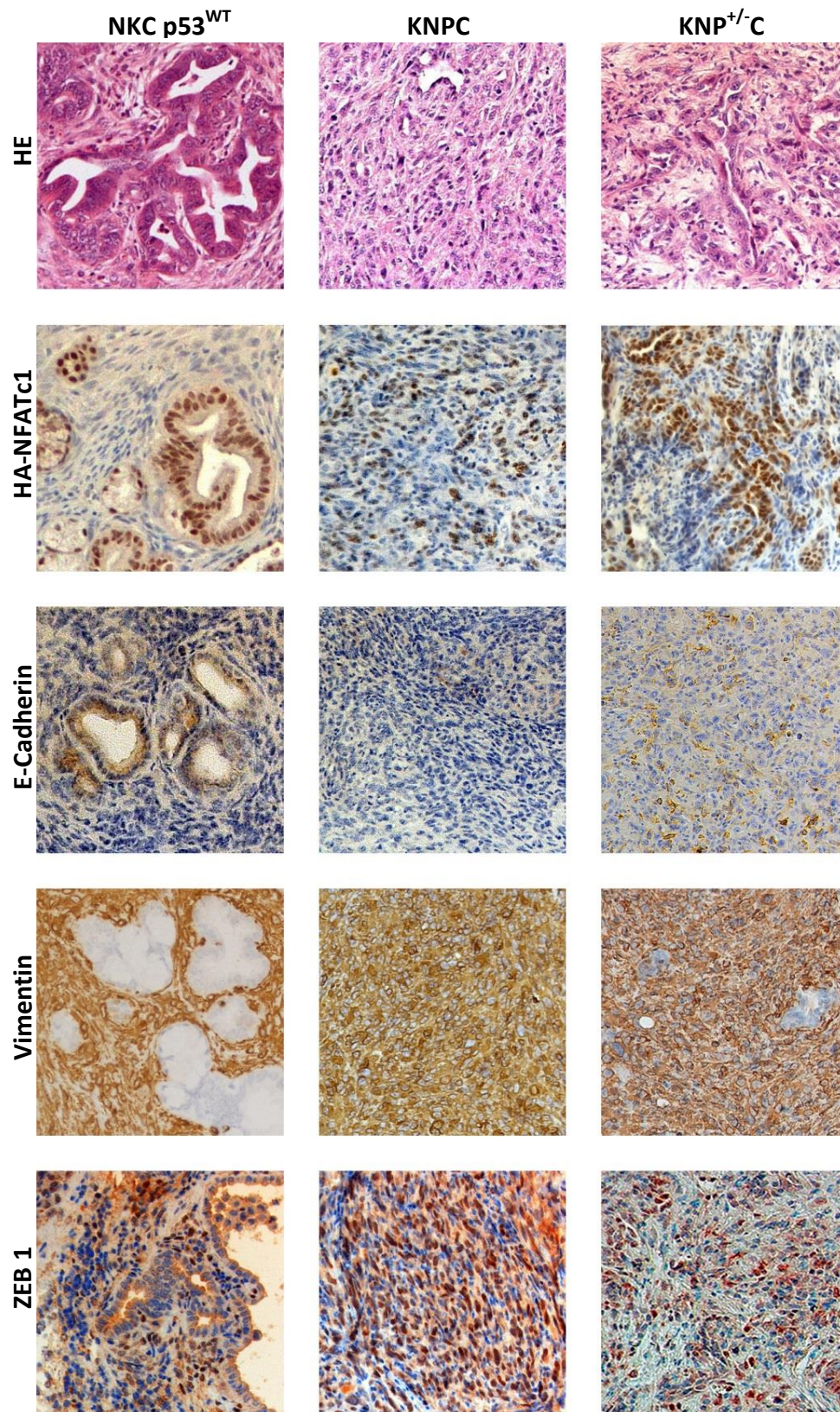


Abb. 19: HE-Färbung und immunhistochemische Analyse des Expressionsverhaltens von HA-NFATc1, E-Cadherin, Vimentin und ZEB 1 in Pankreastumoren aus dem NKC-, KNPC- bzw. KNP^{+/-}C-Mausmodell. Die Abbildungen stellen 20-fache Vergrößerungen dar. Für die Immunhistochemie wurden die Pankreasschnitte mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, die Visualisierung erfolgte mit DAB.

5.4 MicroRNA-200c hemmt die Expression von EMT-Markern

In den verschiedenen Zelllinien wurden nach Überexpression bzw. Inhibition von miRNA-200c und miRNA-34a Experimente durchgeführt. Abhängig von der Aktivität von p53 ist das Expressionsniveau dieser MicroRNAs in NKC II-Zellen hoch, in KNPC 001-Zellen niedrig. Reziprok dazu verhält sich die Expression von EMT-Markern, da diese durch miRNA-200c und miRNA-34a gehemmt wird.

Da p53 in KNPC 001-Zellen inaktiv ist, entfällt dessen fördernde Wirkung auf die miRNA-Expression. Folglich ist das Expressionsniveau der mesenchymalen und EMT-Marker hoch. Durch Überexpression von miR-200c und miR-34a verliert im Western Blot das Signal von sowohl Vimentin als auch ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 an Intensität, die Expression dieser Proteine sinkt (Abbildung 20).

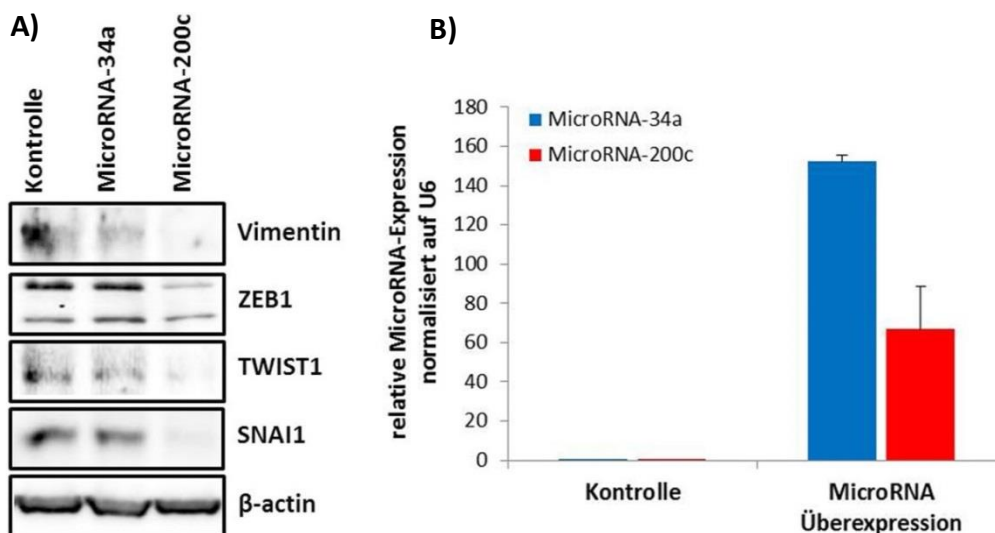


Abb. 20: Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach Überexpression verschiedener MicroRNAs. KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit Mimics der MicroRNA-34a und MicroRNA-200c transfiziert. Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysate (A) und RNA (B) isoliert. Abbildung A demonstriert die Expression der EMT-Marker auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β-actin dient als Ladekontrolle. In Abbildung B ist die Überexpression der MicroRNAs, normalisiert auf U6, grafisch dargestellt ($p < 0,01$).

In NKC II-Zellen werden unter der Kontrolle von p53 ausgereifte MicroRNAs exprimiert. Wird hier die Expression von miRNA-200c bzw. miRNA-34a inhibiert, so fällt deren hemmende Wirkung auf die Expression von mesenchymalen Proteinen und EMT-Markern ab, das Signal von Vimentin, ZEB 1 und TWIST 1 im Western Blot nimmt an Intensität zu (Abbildung 21).

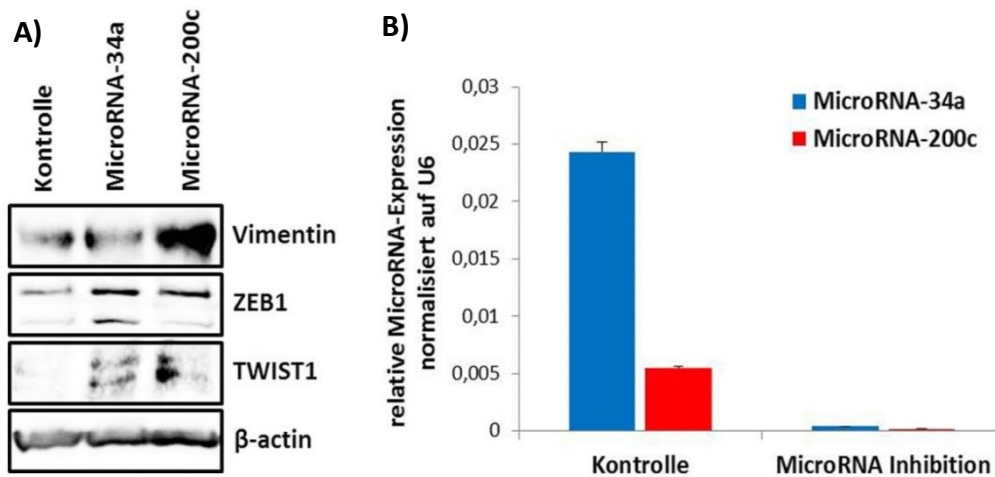


Abb. 21: Expressionsverhalten von EMT-Markern in NKC II-Zellen nach Inhibition verschiedener MicroRNAs. NKC II-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit AntagoMirs der MicroRNA-34a und MicroRNA-200c transfiziert. Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysate (A) und RNA (B) isoliert. Abbildung A demonstriert die Expression der EMT-Marker auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β-actin dient als Ladekontrolle. In Abbildung B ist die Inhibition der MicroRNAs, normalisiert auf U6, grafisch dargestellt ($p < 0,01$).

Da die Expression und Ausreifung von MicroRNAs unter der Kontrolle des Tumorsuppressors p53 steht und der *Knockdown* von p53, wie oben gezeigt, zu einer Motilitätszunahme der Zellen führt, stellt sich die Frage, ob die Veränderung der Motilität ein von MicroRNAs provoziertes Effekt ist. Um diese zu beantworten wurde ein Zeitreihenexperiment durchgeführt.

In KNPC 001-Zellen die mit Mimics der miR-200c transfiziert wurden, bewegten sich in 24 Stunden die Wundränder kaum aufeinander zu, während sich die Wunde in der Zellkulturschale der unbehandelten Kontrollzellen vollständig schloss. Die Wundschlussrate, also die Motilität

der Zellen, ist nach miR-200c-Überexpression deutlich reduziert (Abbildungen 22 A und 22 B).

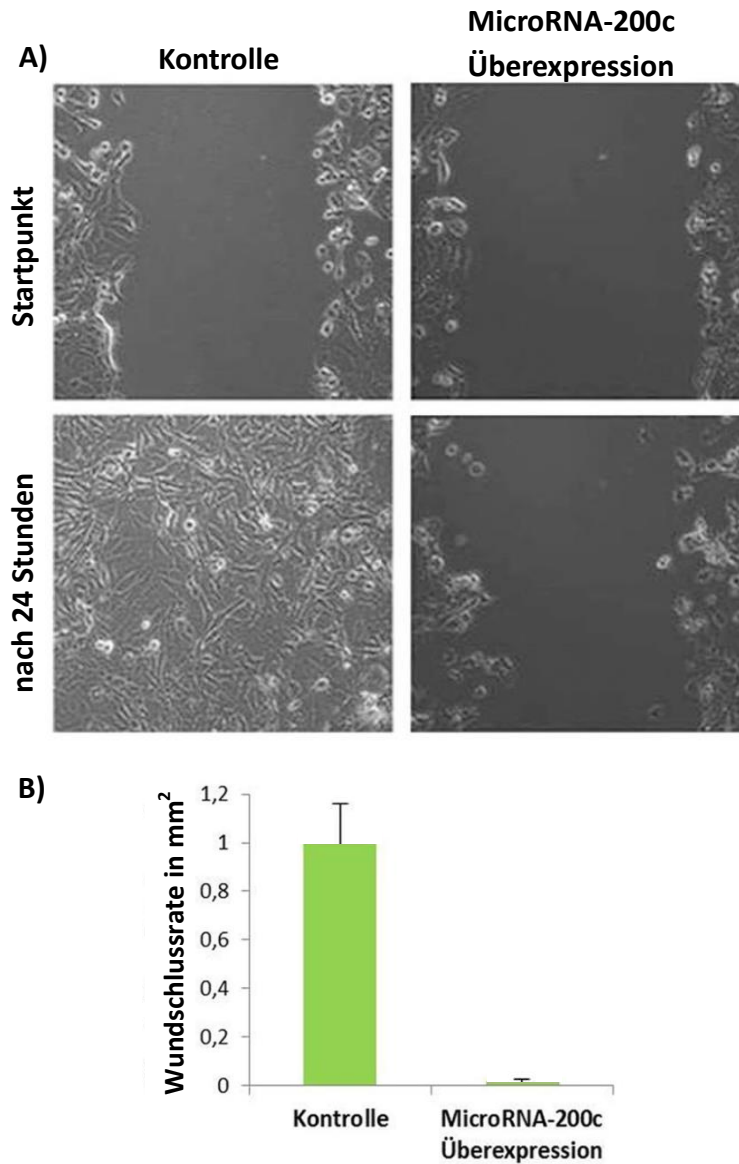


Abb. 22: Zeitreihenexperiment in KNPC 001-Zellen nach Überexpression von miRNA-200c. KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit Mimics der MicroRNA-200c transfiziert. Abbildung A zeigt die Wunde zu Beginn und nach 24 Stunden, sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach miRNA-200c-Überexpression. Abbildung B zeigt die Wundschlussrate beider Gruppen als Quantifizierung des Experiments ($p < 0,01$).

Nach 24 Stunden wurde zusätzlich die RNA beider Zellgruppen isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt. E-Cadherin steigt mit dem Expressionslevel von miR-200c an. Die

Expression der mRNA für Vimentin und die EMT-Marker ZEB 1 und SNAI 1 wird durch die Überexpression der MicroRNA reduziert.

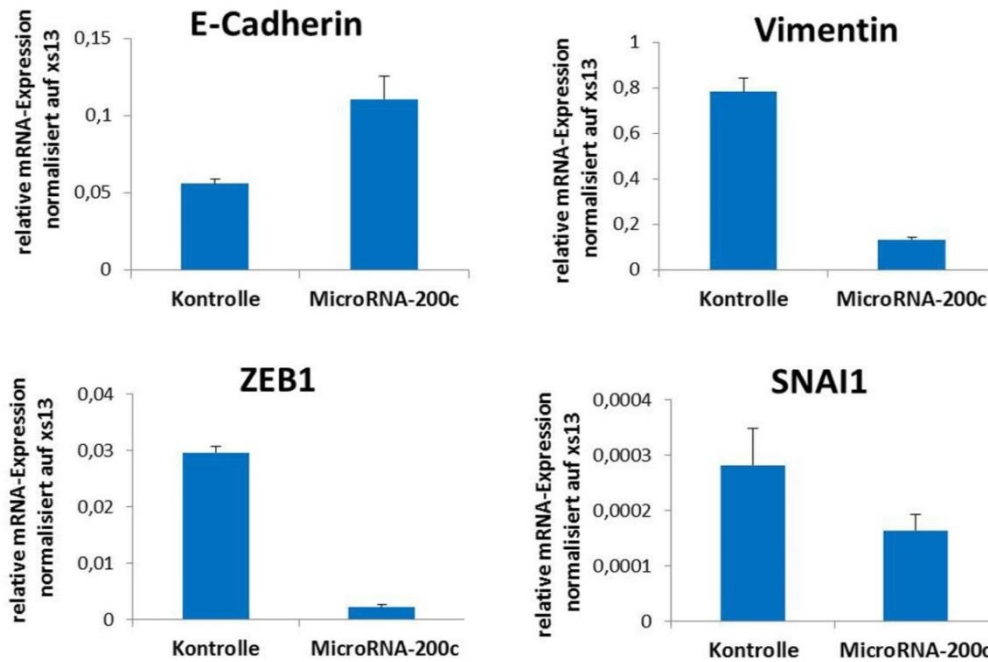


Abb. 23: Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach Überexpression von miRNA-200c. Nach 24 Stunden wurde RNA aus den Zellen des Zeitreihenexperimentes (Abbildung 22) isoliert. Die Abbildungen zeigen die mRNA-Expression der EMT-Marker nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$).

5.5 In murinen Pankreastumoren mit NFATc1-Überexpression steigt das Expressionsniveau der EMT-Marker im Vergleich zur NFATc1-Wildtyp-Situation an

Um herauszustellen, dass nicht alleine der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion für die Progression des Pankreaskarzinoms gen Entdifferenzierung und Metastasierung verantwortlich ist, wird im Folgenden ein Vergleich von KPC- und KNPC-Maustumoren vorgenommen. In diesen Modellen sind *Kras* und *Trp53* gleichermaßen mutiert, der Unterschied liegt in der konstitutiven Überexpression von nukleärem NFATc1 im KNPC-Modell.

Aus Pankreata repräsentativer Tiere beider Gruppen wurden RNA und Gesamtzelllysate isoliert. Es wurde eine qRT-PCR durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt und zeigen, dass Tumore mit überexprimiertem NFATc1 ein höheres Expressionsniveau der mRNA für die EMT-Marker ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 aufweisen als Tumore aus dem KPC-Modell. Die Expression von Vimentin ist in KNPC-Tumoren ebenfalls hochreguliert, E-Cadherin verhält sich reziprok.

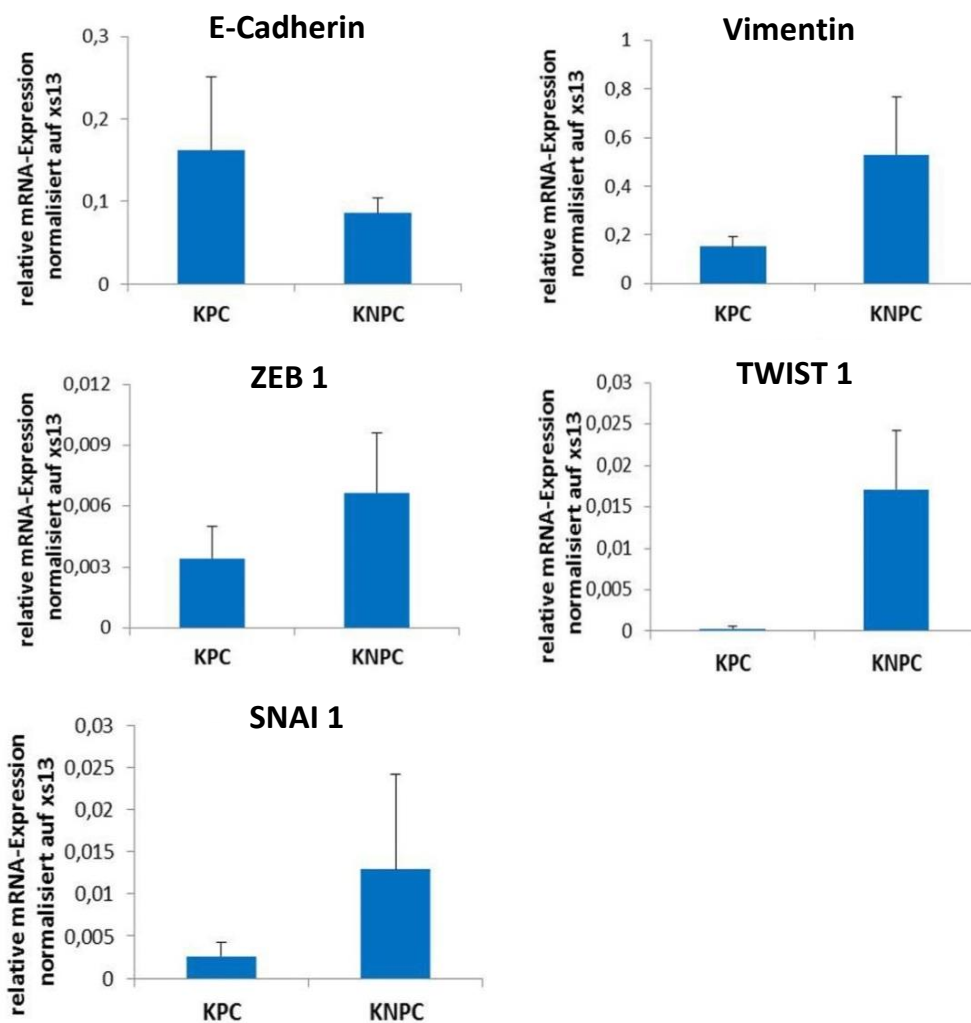


Abb. 24: mRNA-Expression von EMT-Markern in murinen Pankreastumoren aus dem KPC- und KNPC-Modell im Vergleich. Aus den Pankreata von KPC-Mäusen und KNPC-Mäusen wurde RNA isoliert. Die Abbildungen zeigen die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$).

Auf Proteinebene (Abbildung 25) zeigt sich ein ähnliches Ergebnis, ZEB 1 und SNAI 1 sowie die mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin zeigen in Tumoren aus dem KNPC-Modell eine höhere Expression als in KPC-Tumoren, während die Expression von Cytokeratin-19 als epithelialer Marker mit ansteigender NFATc1-Expression abnimmt.

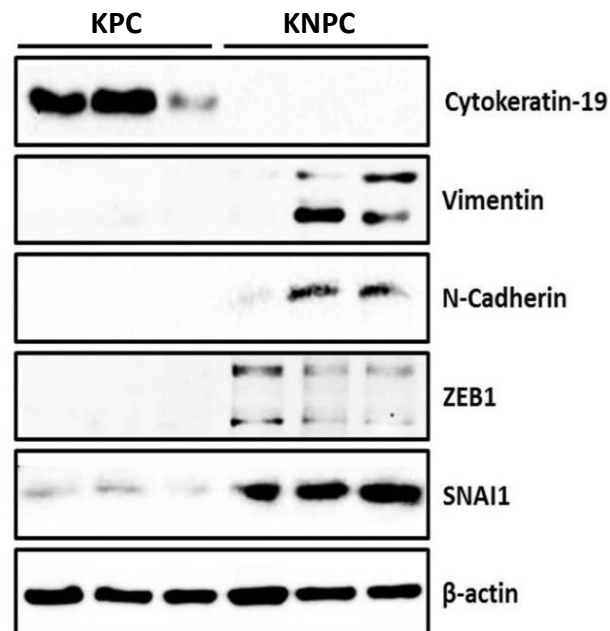


Abb. 25: Proteinexpression von EMT-Markern in murinen Pankreastumoren aus dem KPC- und KNPC-Modell im Vergleich. Aus den Pankreata von KPC-Mäusen und KNPC-Mäusen wurde Gesamtzelllysat isoliert. Die Abbildung zeigt die Expression auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β -actin dient als Ladekontrolle.

Diese Erkenntnisse konnten *in vitro* bestätigt werden.

5.6 In vitro resultiert der *Knockdown* von NFATc1 in der Reduktion der Expression von EMT-Markern in murinen sowie in humanen Zelllinien

KNPC 001-Zellen wurden mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert. Mit der isolierten RNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt.

Abbildung 26 zeigt, dass nach *Knockdown* von NFATc1 die mRNA-Expression von Vimentin und den EMT-Markern ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 abnimmt.

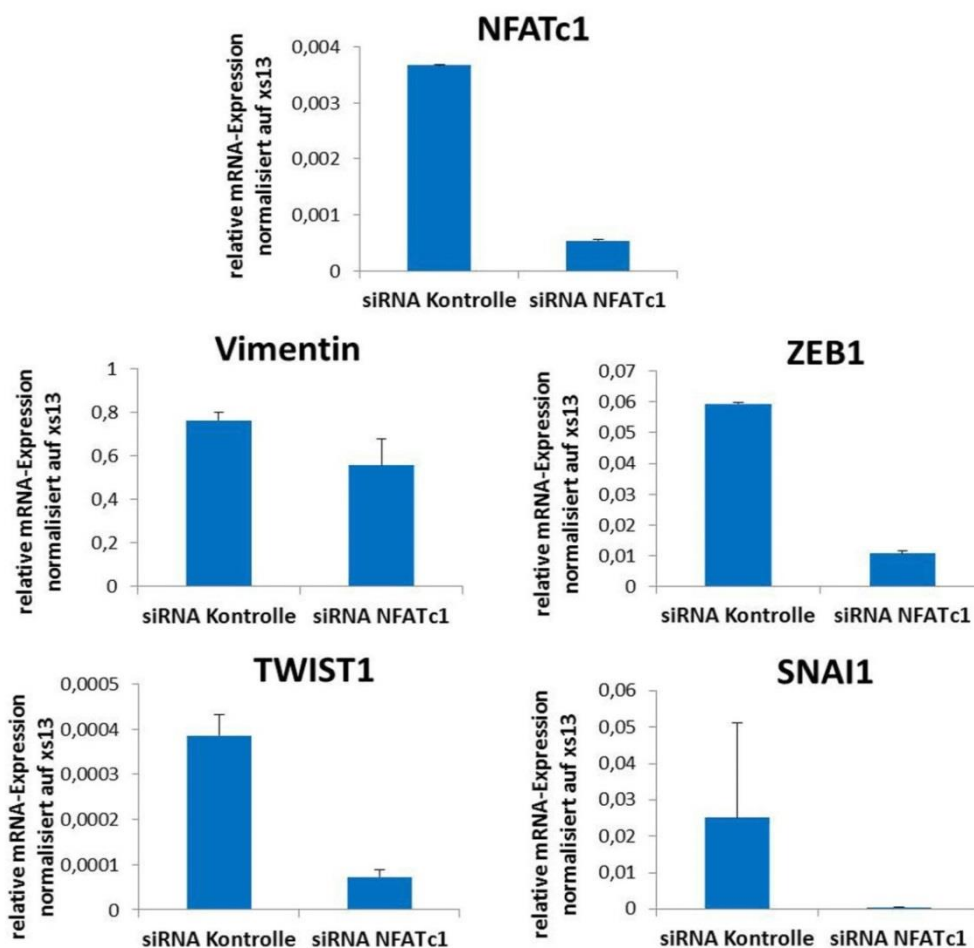


Abb. 26: Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach **NFATc1-Knockdown**. KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA isoliert. Die Abbildungen zeigen die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$).

Die Western Blot-Analyse (Abbildung 27) ergab ebenfalls eine reduzierte Expression von EMT-Markern und Vimentin sowie N-Cadherin in den mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfizierten Zellen. Die Expression von E-Cadherin nimmt hingegen zu.

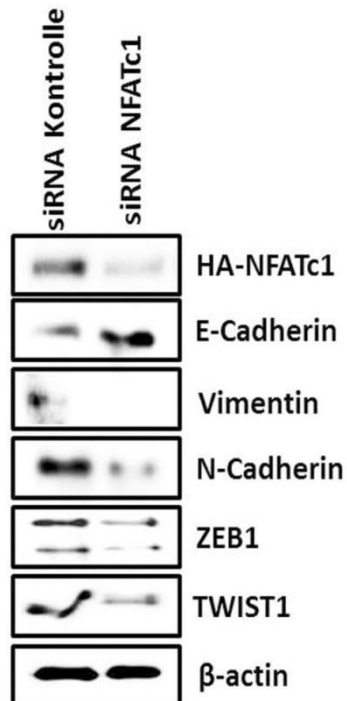


Abb. 27: Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach **NFATc1-Knockdown**. KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysate isoliert. Die Abbildung demonstriert die Expression auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β -actin dient als Ladekontrolle.

Auch aus $KNP^{+/-}$ C-Tumoren isolierten Zellen wurde eine Zelllinie erstellt, diese wird im Folgenden KNPC del3 genannt. Es wurde eine qRT-PCR nach NFATc1-Knockdown durch siRNA durchgeführt. Analog zu den Ergebnissen in KNPC 001-Zellen nimmt mit verminderter NFATc1-Expression das Expressionslevel von Vimentin, TWIST 1 und SNAI 1 ab (Abbildung 28).

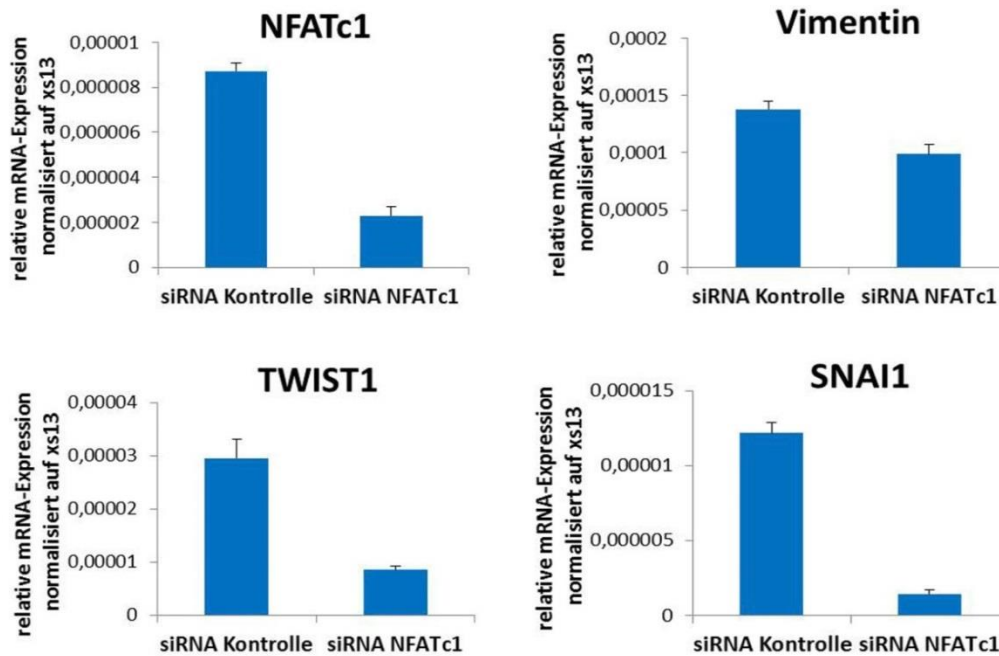


Abb. 28: Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC del3-Zellen nach NFATc1-Knockdown. Murine KNPC del3-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA isoliert. Die Abbildungen zeigen die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$).

Da sich KNPC-Maustumore neben dem höheren Grad an Entdifferenzierung auch durch den früheren Zeitpunkt der Invasion und Metastasierung gegenüber KPC-Tumoren präsentieren, galt es zu überprüfen, ob NFATc1 einen Einfluss auf die Motilität und damit die Fähigkeit zur Invasion der Zellen hat.

Zu diesem Zweck wurden KNPC 001-Zellen mit CsA behandelt um den NFATc1-Signalweg zu blockieren. Die behandelten Zellen wurden parallel zu unbehandelten Kontrollzellen 24 Stunden lang unter dem Mikroskop beobachtet und die Wundschlussrate beider Zellpopulationen wurde ermittelt. Wie in Abbildung 29 dargestellt, nimmt die Motilität der Zellen nach CsA-Behandlung ab, in der behandelten Zellkulturschale schloss sich die Wunde innerhalb von 24 Stunden nicht. Folglich sinkt die Wundschlussrate durch NFATc1-Inhibition.

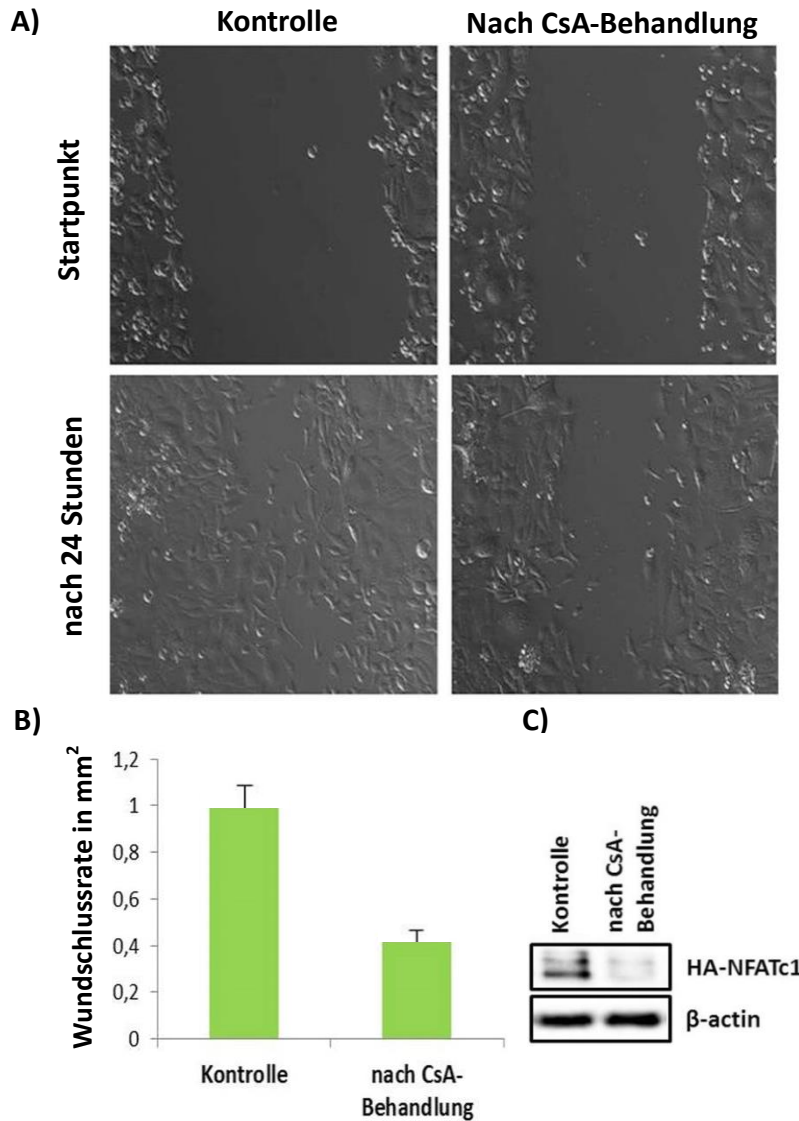


Abb. 29: Zeitreihenexperiment in KNPC 001-Zellen nach CsA-Behandlung. KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit CsA (1 $\mu\text{m}/\text{ml}$) bzw. H_2O behandelt. Abbildung **A** zeigt die Wunde zu Beginn und nach 24 Stunden, sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach CsA-Behandlung. Abbildung **B** zeigt die Wundschlussrate beider Gruppen als Quantifizierung des Experiments ($p < 0,01$). **(C)** Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysate isoliert. Der Western Blot demonstriert den Effekt der CsA-Behandlung.

Zusammenfassend hat NFATc1 einen induzierenden Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition und deren Marker. Konsistent hiermit, steigt die Motilität und damit die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung in Tumoren die konstitutiv nukleäres NFATc1 exprimieren.

Zur Bestätigung der Relevanz dieser Erkenntnisse wurden zusätzlich Versuche in den humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien L3.6 und Panc-1 durchgeführt. Auch in diesen Zelllinien findet eine hohe Expression von NFATc1 bei verminderter p53-Expression statt.

Durch Transfektion von gegen NFATc1 gerichteter siRNA konnte die Expression des EMT-Markers SNAI 1 auf Proteinebene in L3.6-Zellen inhibiert werden (Abbildung 30).

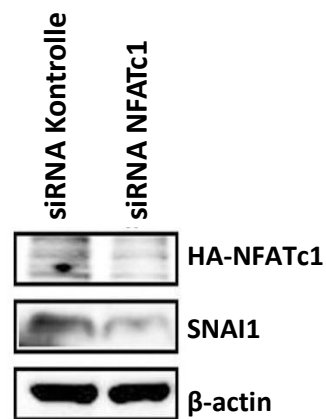


Abb. 30: Expressionsverhalten von EMT-Markern in L3.6-Zellen nach NFATc1-Knockdown. Humane L3.6-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen NFATc1 gerichteter siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde Gesamtzelllysate isoliert. Die Abbildung zeigt die Expression auf Proteinebene nach Western Blot-Analyse. β -actin dient als Ladekontrolle.

Analog dem Versuch in KNPC 001-Zellen wurden Panc 1-Zellen mit CsA behandelt und hinsichtlich ihrer Motilität untersucht. Die Wundränder der behandelten Zellkultur sind nach 24 Stunden weiter voneinander entfernt als die der unbehandelten Zellen. Die Wundschlussrate nimmt durch NFATc1-Inhibition ab (Abbildungen 31 A-C).

Nach Abschluss des Zeitreihenexperimentes wurde mRNA aus den Zellkulturschalen isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Hier bestätigen sich die vorherigen Ergebnisse. Durch Blockade des NFAT-Signalweges sinkt die Expression von Vimentin und den EMT-Markern wie zum Beispiel TWIST 1 (Abbildung 31 D).

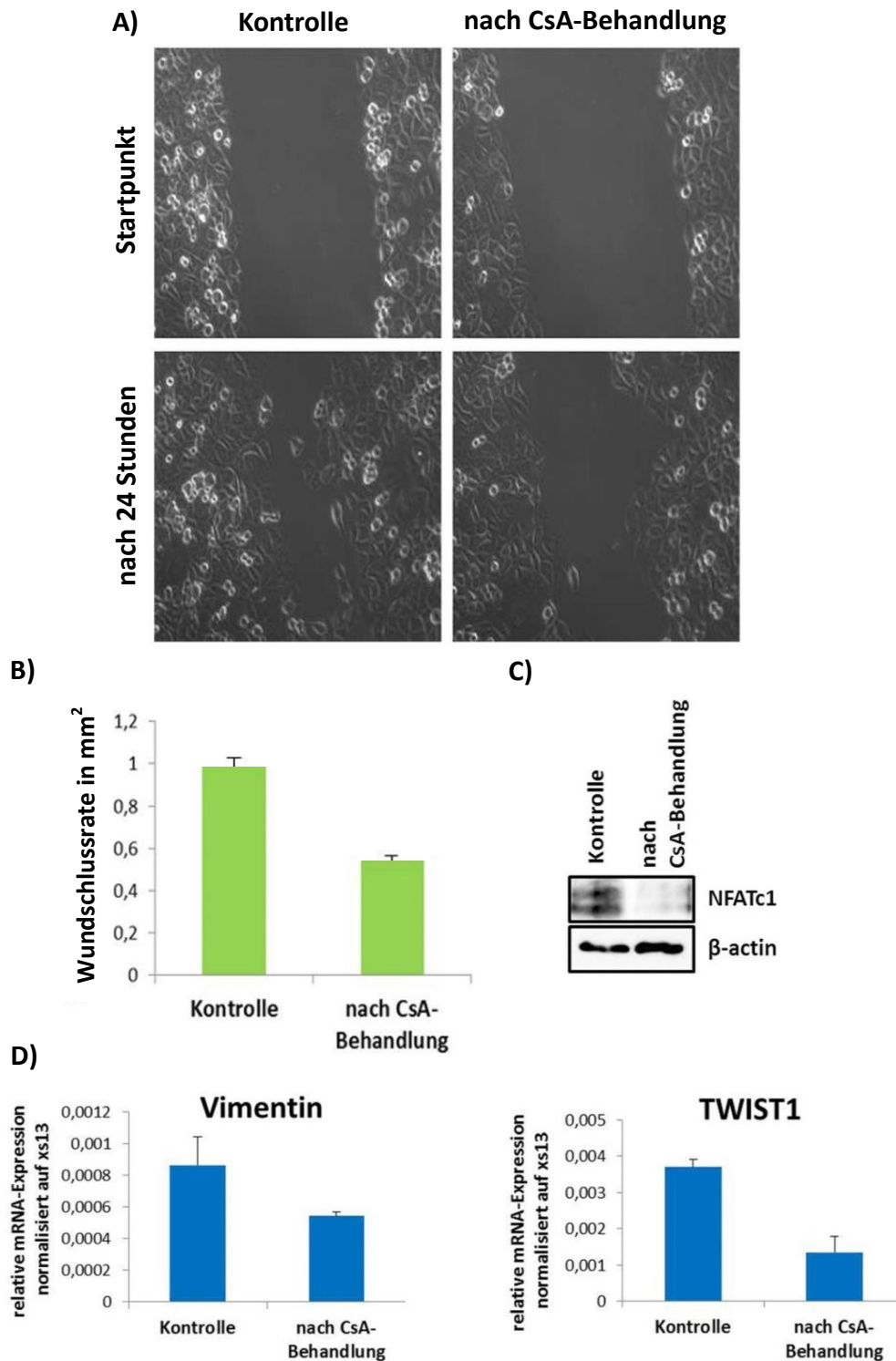


Abb. 31: Zeitreihenexperiment in Panc 1-Zellen nach Behandlung mit Cyclosporin A.

Humane Panc 1-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit 1 µl CsA/ ml Kulturmedium bzw. H₂O behandelt. Nach 24 Stunden wurde RNA und Gesamtzelllysat isoliert. Abbildung **A** zeigt die Wunde zu Beginn und nach 24 Stunden, sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach CsA-Behandlung. Abbildung **B** zeigt die Wundschlussrate beider Gruppen als Quantifizierung des Experiments ($p < 0,05$). **(C)** Der Western Blot demonstriert den Effekt der CsA-Behandlung auf Proteinebene. **(D)** Die Grafiken zeigen die mRNA-Expression der EMT-Marker nach Durchführung einer qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$).

Folglich führt auch in humanen Pankreastumoren eine NFAT-Überexpression zu gesteigerter EMT, invasivem Verhalten und Fernmetastasierung.

5.7 NFATc1 bindet an Enhancern der EMT-Marker *ZEB 1* und *TWIST 1*

Im Folgenden wird dargestellt, wie durch NFATc1 eine epithelial-mesenchymale Transition induziert wird.

In murinen KNPC 001-Zellen sowie in humanen L3.6-Zellen wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) der Antikörper gegen IgG, NFATc1 und acetyliertes H₃K₂₇ an Enhancern von EMT-Markern durchgeführt.

Die ChIP in KNPC 001-Zellen ergab den Nachweis einer Bindung von NFATc1 am *ZEB 1*- und *TWIST 1*-Enhancer sowie einer Aktivierung der Enhancer, repräsentiert durch die Bindung der H₃K₂₇ac-Antikörper (Abbildung 32).

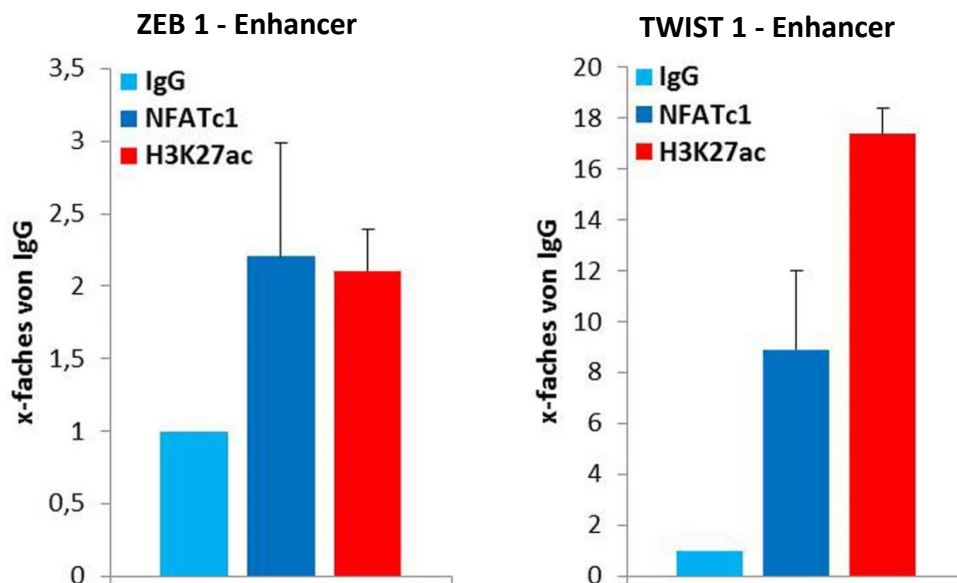


Abb. 32: Chromatin-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen. Murine KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet. Die ChIP wurde unter Präzipitation der Antikörper gegen NFATc1, H₃K₂₇ac und IgG durchgeführt. Die mit Hilfe einer qRT-PCR ermittelten Ergebnisse zeigen die Bindung am Enhancer von *ZEB 1* bzw. *TWIST 1* als prozentualen Anteil des Inputs + Standardabweichung ($p < 0,01$).

Die in der humanen Zelllinie L3.6 durchgeführte ChIP zeigte analoge Ergebnisse (Abbildung 33). Auch hier findet eine Enhancer-Aktivierung von *ZEB 1* und *TWIST 1* durch NFATc1-Bindung statt.

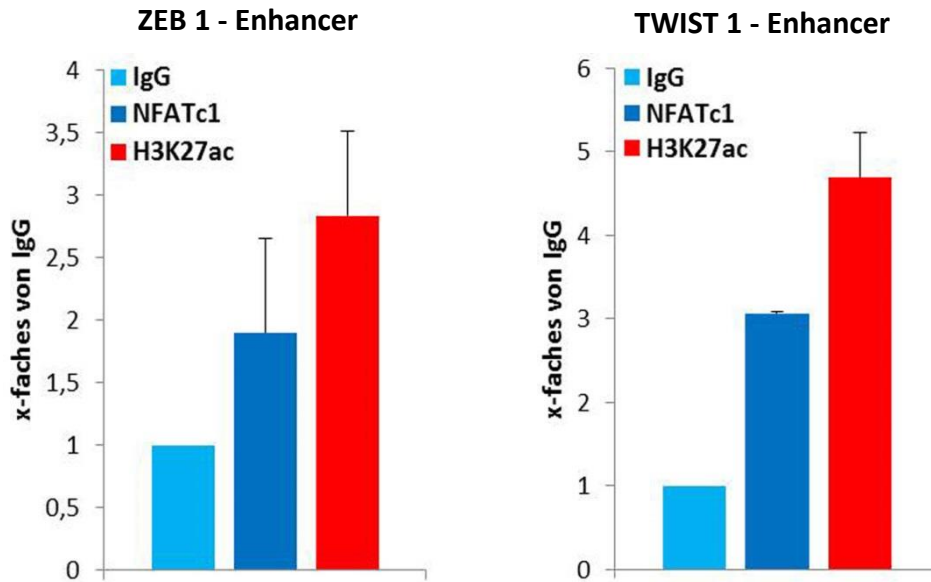


Abb. 33: Chromatin-Immünpräzipitation in L3.6-Zellen. Humane L3.6-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet. Die ChIP wurde unter Präzipitation der Antikörper gegen NFATc1, H₃K₂₇ac und IgG durchgeführt. Die mit Hilfe einer qRT-PCR ermittelten Ergebnisse zeigen die Bindung am Enhancer von *ZEB 1* bzw. *TWIST 1* als prozentualen Anteil des Inputs + Standardabweichung ($p < 0,05$).

NFATc1 induziert durch Enhancer-Bindung die Transkription der EMT-Marker *ZEB 1* und *TWIST 1*. Somit initiiert NFATc1 eine epithelial-mesenchymale Transition in murinen sowie in humanen Pankreaskarzinomzellen.

5.8 SOX2-Knockdown nach NFATc1-Überexpression führt zu verminderter Expression von EMT-Markern in murinen und in humanen Zelllinien

Da in Vorarbeiten der AG Ellenrieder der Transkriptionsfaktor SOX 2 als zentraler Regulator der Progression des Pankreaskarzinoms identifiziert werden konnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch dessen Einfluss auf die Expression von EMT-Markern untersucht (Singh et al. 2015).

In verschiedenen Zelllinien mit konstitutiv überexprimiertem NFATc1 wurden nach Transfektion mit gegen SOX 2 gerichteter siRNA Expressionsanalysen mittels qRT-PCR durchgeführt. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der qRT-PCR in KNPC 001-Zellen dargestellt. Ein *Knockdown* von SOX 2 geht mit verminderter Expression von ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 auf mRNA-Ebene einher.

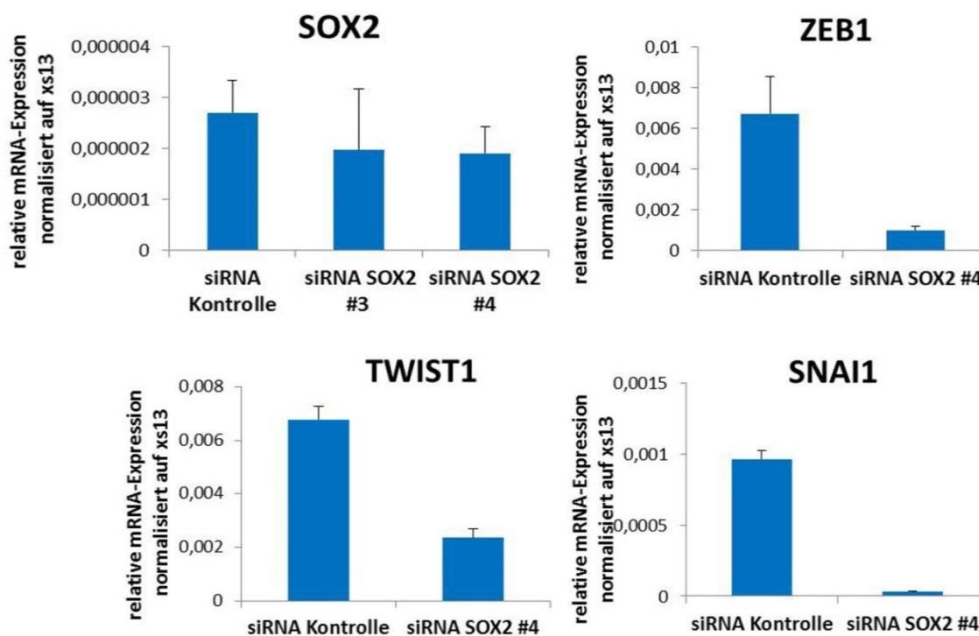


Abb. 34: Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach SOX 2-Knockdown. Murine KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit verschiedener gegen SOX 2 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA isoliert. Die siRNA #4 erwies sich am wirksamsten, weswegen im Folgenden ausschließlich diese transfiziert wurde. Gezeigt ist die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR in Form der Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,01$).

Dieses Experiment wurde zusätzlich in humanen Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt. Auch hier zeigt sich eine verminderte mRNA-Expression von Vimentin sowie den EMT-Markern nach SOX 2-Knockdown (Abbildung 35).

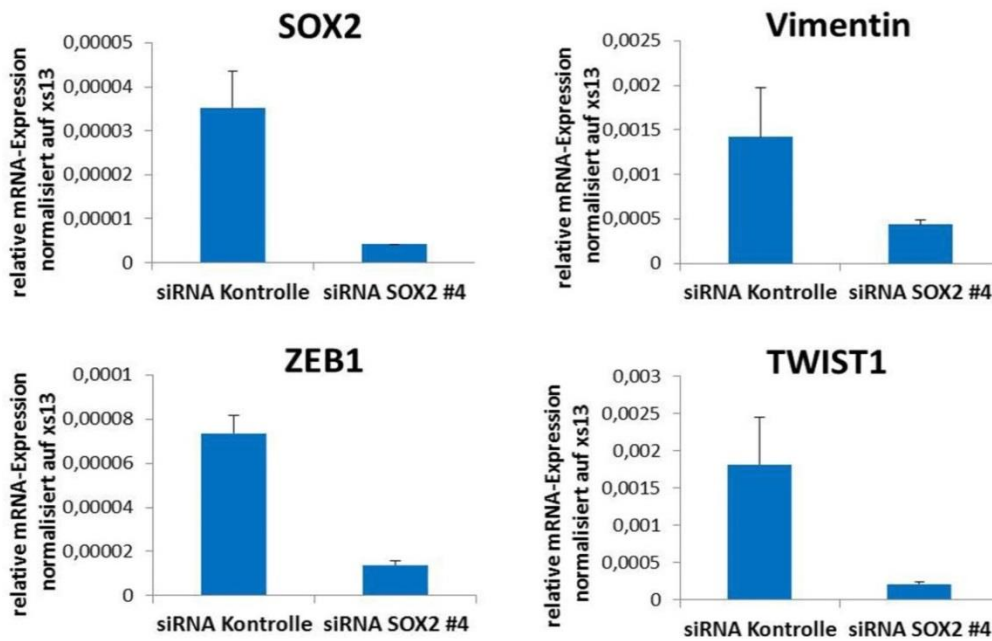


Abb. 35: Expressionsverhalten von EMT-Markern in L3.6-Zellen nach SOX 2-Knockdown. Humane L3.6-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen SOX 2 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurde RNA isoliert. Die Abbildungen demonstrieren die mRNA-Expression nach Durchführung einer qRT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte + Standardabweichung normalisiert auf die Expression von xs13 ($p < 0,05$).

Die Resultate der Analyse des Expressionsverhaltens von EMT-Markern nach SOX 2-Knockdown führen zur Annahme, dass neben p53 und NFATc1 auch SOX 2 durch die Induktion von EMT Einfluss auf die Motilität der Tumorzellen nimmt. Diese Hypothese wurde mittels eines Zeitreihenexperimentes und der Ermittlung der Wundschlussrate überprüft.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Wunde in der Zellkulturschale der Kontrollgruppe nach 24 Stunden geschlossen ist. In der Zellkulturschale der mit siRNA transfizierten Zellen sind die Wundränder nach Ablauf der Zeit noch immer voneinander

entfernt, die Wunde schloss sich nicht. Dies spiegelt sich in der verminderten Wundschlussrate nach SOX 2-Knockdown wider.

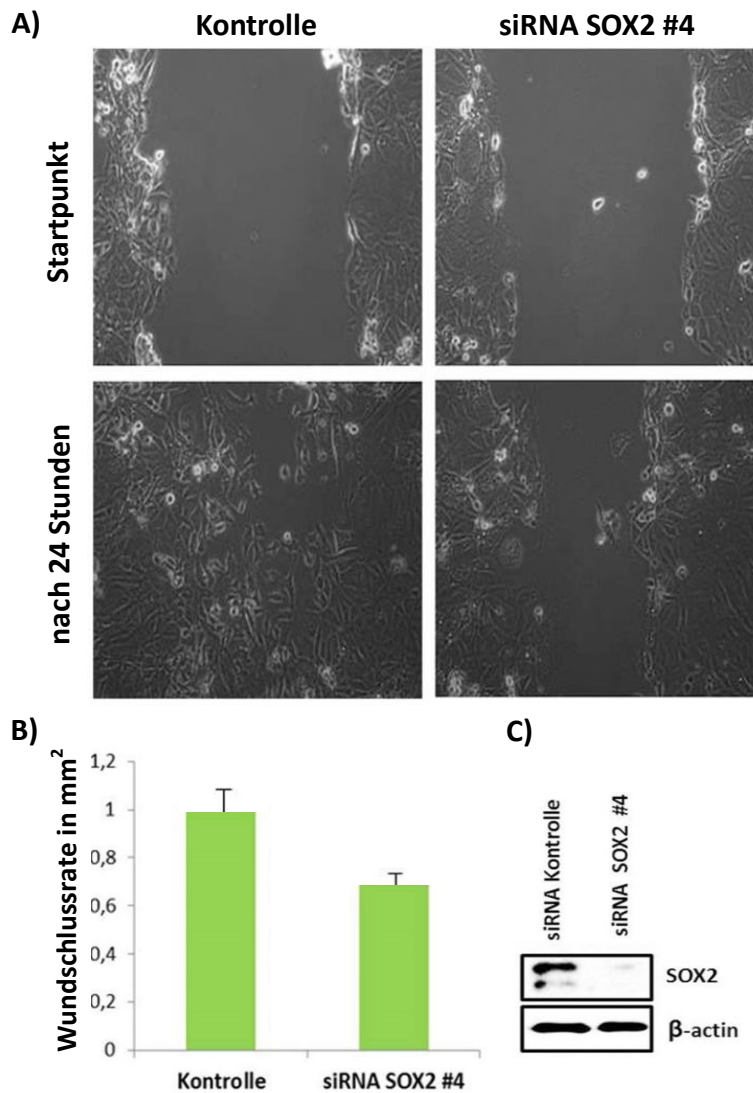


Abb. 36: Zeitreihenexperiment in KNPC 001-Zellen nach SOX 2-Knockdown. Murine KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen SOX 2 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 24 Stunden Beobachtungszeit wurde RNA und Gesamtzelllysat isoliert. Abbildung **A** zeigt die Wunde zu Beginn und nach 24 Stunden, sowohl in der Kontrollgruppe als auch nach SOX 2-Knockdown. Abbildung **B** zeigt die Wundschlussrate beider Gruppen als Quantifizierung des Experiments ($p < 0,05$). **(C)** Der Western Blot demonstriert den Effekt der siRNA auf Proteinebene.

Die Expression des Transkriptionsfaktors SOX 2 geht demnach mit einer Induktion der Expression von EMT-Markern einher. Außerdem wird die Motilität von Tumorzellen durch SOX 2 positiv beeinflusst.

5.9 NFATc1 und SOX 2 sind im Zellkern kolokalisiert und interagieren

Die oben aufgedeckten Effekte der SOX 2-Expression finden in Zellen mit NFATc1-Überexpression statt. Es ist bekannt, dass NFATc1 seine Funktionen durch Interaktion mit Bindungspartnern ausübt. Im Folgenden soll deswegen überprüft werden, ob NFATc1 und SOX 2 als Bindungspartner agieren.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde eine gemeinsame Lokalisation von NFATc1 und SOX 2 im Zellkern nachgewiesen, was auf eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren hindeutet (Abbildung 37).

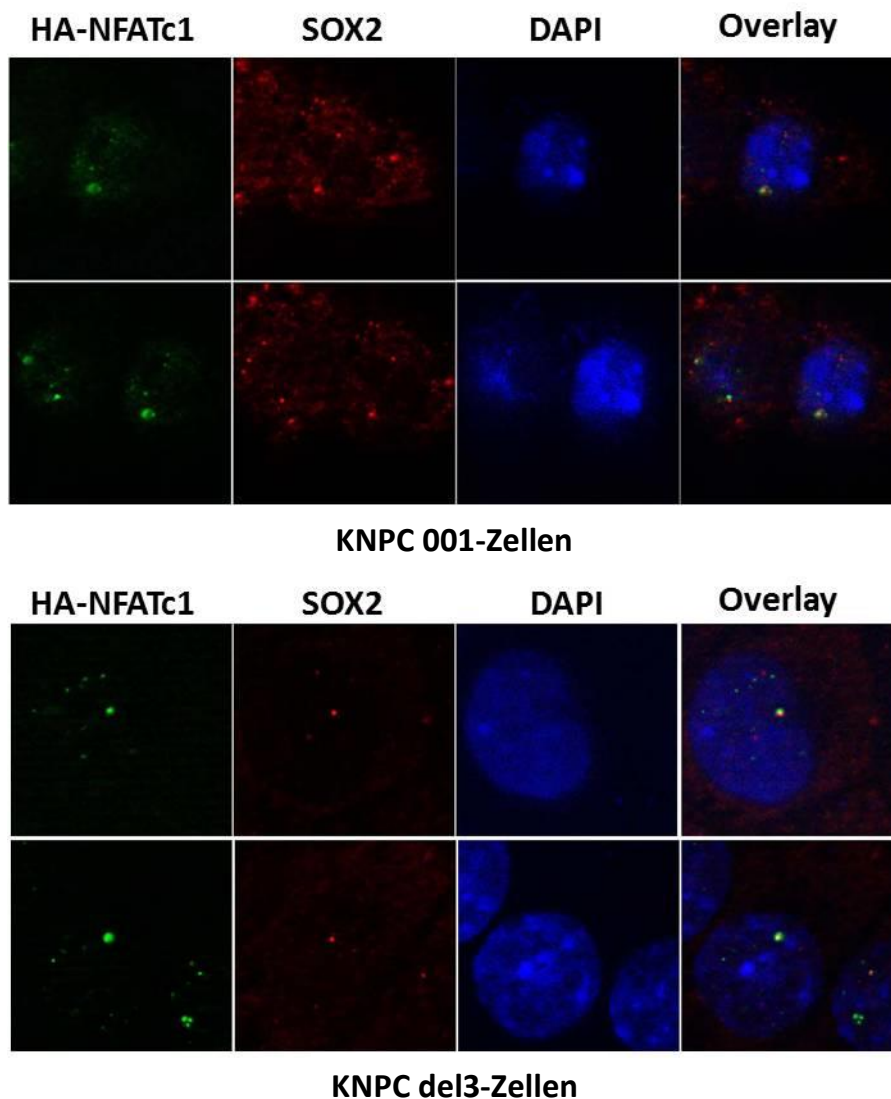


Abb. 37: Co-Immunfluoreszenzfärbung von HA-NFATc1 und SOX 2 in KNPC 001- und KNPC del3-Zellen.

Zur Überprüfung dieser Erkenntnisse wurde eine Co-Immunpräzipitation von HA-NFATc1 und SOX 2 in KNPC 001-Zellen durchgeführt.

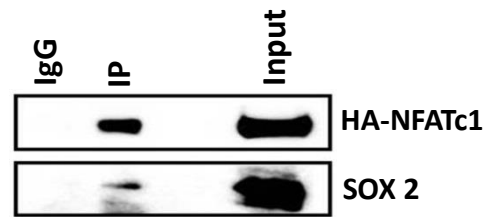


Abb. 38: Co-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen. Die Co-IP 24 Stunden nach Transfektion von HA-NFATc1 und SOX 2 demonstriert nach Präzipitation von HA-NFATc1 die biochemische Interaktion mit SOX 2. IgG dient als Negativkontrolle.

Abbildung 38 zeigt als Ergebnis eine biochemische Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren und bestätigt, dass SOX 2 ein Bindungspartner von NFATc1 ist.

5.10 SOX 2 beeinflusst die Bindung von NFATc1 an Enhancern der EMT-Marker *TWIST 1* und *SNAI 1*

Welchen Einfluss SOX 2 als Bindungspartner auf NFATc1 ausübt, wurde mittels Durchführung einer Chromatin-Immunpräzipitation überprüft.

In KNPC 001-Zellen wurde ein *Knockdown* von SOX 2 durch siRNA hervorgerufen. Es wurde unter Präzipitation der Antikörper gegen IgG, NFATc1 und acetyliertes H₃K₂₇ an Enhancern von EMT-Markern eine ChIP, sowohl nach *SOX 2-Knockdown*, als auch in Kontrollzellen durchgeführt. Abbildung 39 zeigt eine verminderte Bindung von NFATc1- bzw. H₃K₂₇ac-Antikörpern an Enhancern von *TWIST 1* und *SNAI 1* nach *SOX 2-Knockdown*.

Folglich fördert SOX 2 durch Interaktion die Bindung von NFATc1 an Enhancern von EMT-Markern. Dies führt zur Aktivierung der Enhancer, also zur Induktion der Expression der entsprechenden Gene.

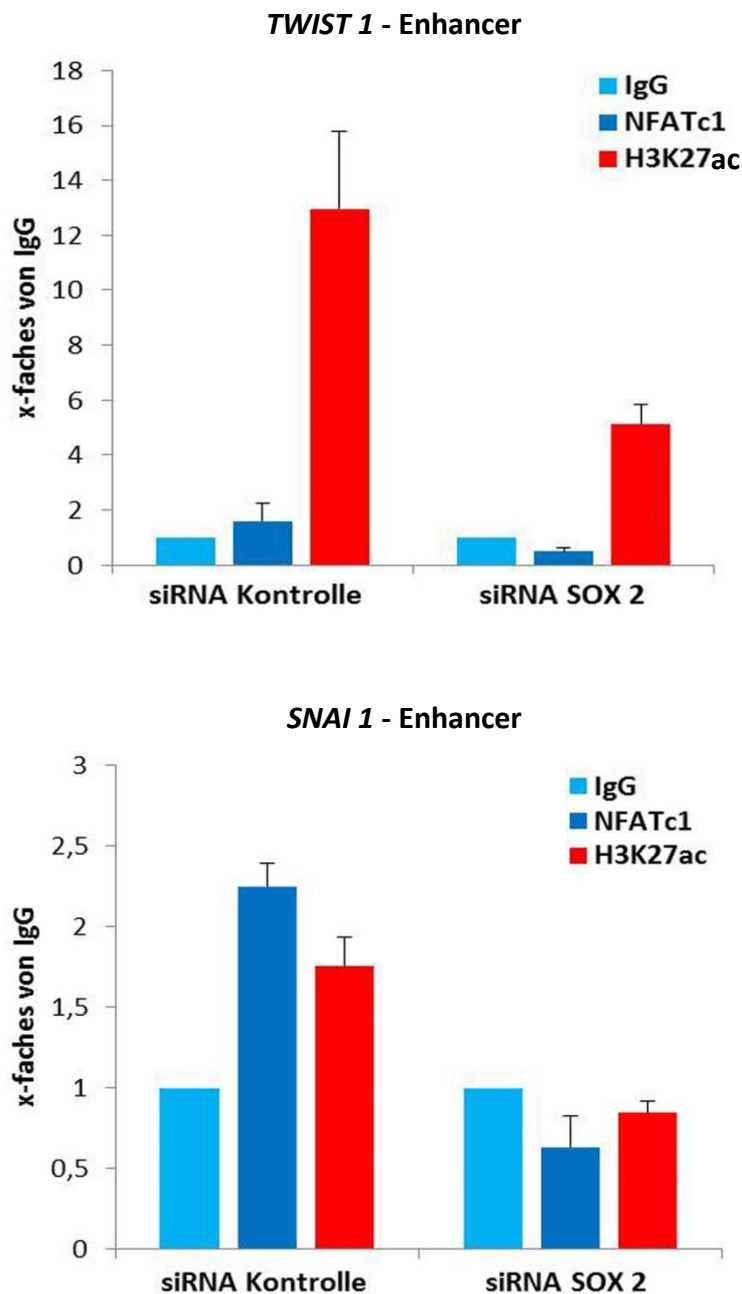


Abb. 39: Chromatin-Immünpräzipitation in KNPC 001-Zellen nach SOX2-Knockdown. Murine KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit gegen SOX 2 gerichteter siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Die ChIP wurde unter Präzipitation der Antikörper gegen NFATc1, H₃K₂₇ac und IgG durchgeführt. Die Bindung am *TWIST 1*- bzw. *SNAI 1*-Enhancer ließ sich mit Hilfe einer qRT-PCR unter Verwendung der entsprechenden Primer nachweisen. Abgebildet ist die Bindung an den Enhancern als prozentualen Anteil der Inputbindung + Standardabweichung ($p < 0,01$).

5.11 Der Tumorsuppressor p53 beeinflusst über MicroRNA-Induktion den Effekt der Bindungspartner NFATc1 und SOX 2

Bisher wurden zwei Mechanismen der Regulation von EMT und Zellmotilität erarbeitet: p53 wirkt via MicroRNA-Induktion hemmend, während NFATc1 durch Interaktion mit SOX 2 fördernd wirkt. Als logische Konsequenz musste nun hinterfragt werden ob diese beiden Mechanismen in Zusammenhang stehen.

Hierfür wurde erneut eine Co-IP in KNPC 001-Zellen durchgeführt. In diesen Zellen wurde allerdings durch Transfektion mit Mimics die miRNA-200c überexprimiert, also ein intakter p53-Signalweg simuliert. Der Vergleich der Bindung von SOX 2 und NFATc1 gegenüber derer in Kontrollzellen mit geringer miRNA-Expression, ergibt eine reduzierte Interaktion von SOX 2 und NFATc1 nach miRNA-200c-Überexpression durch verminderte SOX 2-Expression (Abbildung 40).

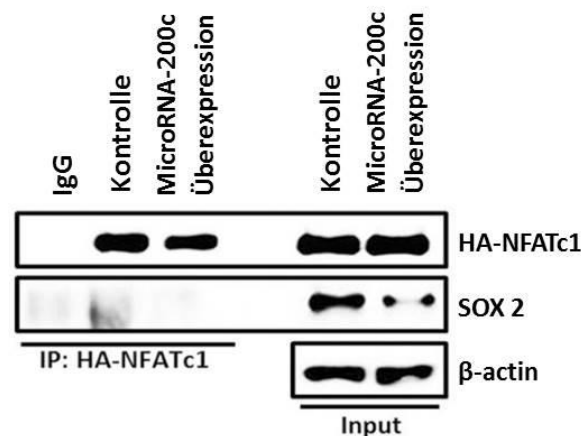


Abb. 40: Co-Immünpräzipitation in KNPC 001-Zellen. Murine KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit Mimics der MicroRNA-200c transfiziert. Nach 24 Stunden wurden Antikörper gegen HA-NFATc1 und SOX 2 zugeführt und nach weiteren 24 Stunden Gesamtzelllysat für die Co-IP gewonnen. Im Western Blot zu sehen ist die biochemische Interaktion zwischen HA-NFATc1 und SOX 2 in der Kontrollgruppe, welche nach miRNA-200c-Überexpression abnimmt. In den Inputproben ist die verminderte Expression von SOX 2 nach miRNA-200c-Überexpression gezeigt. IgG dient als Negativkontrolle.

Zur Überprüfung dieses Resultates wurde eine ChIP in KNPC 001-Zellen nach Transfektion mit Mimics der MicroRNA-200c durchgeführt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 41 dargestellt.

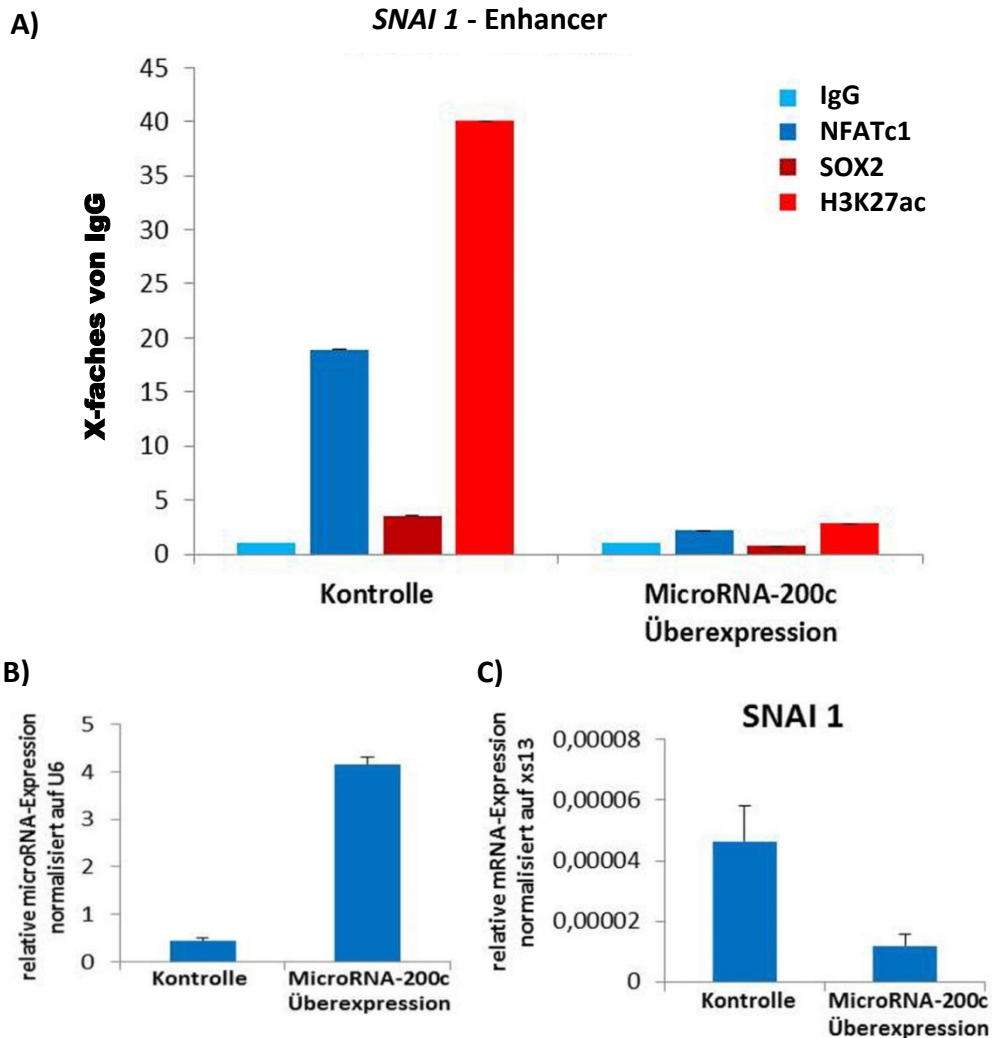


Abb. 41: Chromatin-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen nach MicroRNA-200c-Überexpression. Murine KNPC 001-Zellen wurden in Kulturmedium gezüchtet und mit Mimics der MicroRNA-200c transfiziert. Abbildung A zeigt das Ergebnis der CHIP, welches durch eine qRT-PCR ermittelt wurde. Die angegebenen Antikörper wurden präzipitiert. Gezeigt ist die Bindung am *SNAI 1*-Enhancer als prozentualer Anteil der Inputbindung + Standardabweichung ($p < 0,05$). **B)** Die qRT-PCR demonstriert die Überexpression der miRNA-200c normalisiert auf U6 während **C** den Effekt der miRNA-200c-Überexpression auf *SNAI 1* (normalisiert auf xs13) zeigt ($p < 0,01$).

Hohe Expressionslevel von miRNA-200c, welche durch p53 hervorgerufen werden, resultieren in einer verminderten Bindung von NFATc1 und SOX 2 am *SNAI 1*-Enhancer und somit in reduzierter Aktivität des Enhancers, repräsentiert durch verminderte H₃K₂₇-Acetylierung. Folglich wird der EMT-Marker signifikant weniger exprimiert (Abbildung 41 C).

6. Diskussion

6.1 Konstitutiv nukleär exprimiertes NFATc1 führt im Pankreas zur Akzeleration der Tumorgenese

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine der aggressivsten Tumorentitäten mit hoher Mortalität (Maitra und Hruban 2008). Begründet ist dies unter anderem in der Fähigkeit der Tumorzellen sich einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zu unterziehen, was zur Umorganisation des Zytoskeletts und zum Verlust der apikobasalen Polarität der Zellen führt (Polyak und Weinberg 2009; Thiery 2002; Satoh et al. 2015). Für die Transition verantwortlich sind unter anderem die EMT-Marker ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1, welche als Transkriptionsfaktoren die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und Intermediärfilamenten hemmen und die Expression mesenchymaler Proteine fördern. Somit wird es Tumorzellen ermöglicht den Zellverbund zu verlassen und in entfernte Organe zu invadieren um Fernmetastasen zu bilden (Brabletz und Brabletz 2010). Des Weiteren können Tumorzellen durch epithelial-mesenchymale Transition stammzellähnliche Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Regeneration, Proliferation sowie Resistenz gegenüber Apoptosesignalen und Chemotherapeutika, erlangen. Das Vorkommen solcher Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften begründet den hohen Grad an Malignität des Pankreaskarzinoms (Brabletz et al. 2005; Herreros-Villanueva et al. 2014).

Der *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) c1 ist ein durch Inflammation induzierbarer Transkriptionsfaktor, welcher in Zellen des Immunsystems Differenzierung und Apoptoseinduktion reguliert (Hogan et al. 2003). Auch außerhalb des Immunsystems hat NFATc1 essenzielle Aufgaben, zum Beispiel während der embryonalen Entwicklung. Hier agiert der Transkriptionsfaktor als Aktivator von EMT (Li et al. 2011). Außerdem konnte in aus humanen und murinen Pankreastumoren isolierten Zellen während der Progression von Vorläuferläsionen - den PanINs - bis hin zum

invasiven Karzinom eine zunehmende NFAT-Expression nachgewiesen werden (Buchholz et al. 2006).

In Vorarbeiten der AG Ellenrieder konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch Induktion einer Inflammation im Pankreas transgen veränderter Mäuse NFATc1 aktiviert wird und onkogene Aktivität aufnimmt. Die durch Kras-Überexpression geförderte Karzinogenese im Pankreas wird durch NFATc1-Überexpression stark beschleunigt und führt zur Formation von Vorläuferläsionen des PDAC (Baumgart et al. 2014). Hierfür bindet NFATc1 an Enhancern von EMT-Markern und induziert deren Expression, was mit Hilfe einer Chromatin-Immunpräzipitation in murinen und humanen Zelllinien erwiesen wurde. NFATc1 ist jedoch nicht alleine für die Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms verantwortlich.

6.2 Der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion führt mit dem Hintergrund von konstitutiv exprimiertem NFATc1 zu EMT der Tumorzellen und Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms

Die von der AG Ellenrieder durchgeführte Analyse von NKC-Maustumoren mit hohem Grad an Entdifferenzierung, welche Metastasen bilden, enthüllte eine, gegenüber besser differenzierten Tumoren verminderte Expression von p53 (siehe Abbildung 10, Seite 65). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit Arbeiten anderer Gruppen, die zeigen, dass der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion zu Tumorzell-entdifferenzierung und Tumorprogression führen kann (Pinho et al. 2011; Szychot et al. 2013).

Jedoch reicht auch der Verlust der tumorsuppressiven Funktion von p53 alleine nicht aus um EMT und Entdifferenzierung hervorzurufen. So zeigte sich in Arbeiten von Hingorani et al. (2005) mit dem KPC-Mausmodell, dass eine p53-Mutation gemeinsam mit der Überexpression von Kras zur Entwicklung von gut bis mäßig differenzierten, aber nur kaum zur Progression zu entdifferenzierten Tumoren führt.

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalyse mittels *Microarray*, GSEA und *Heat Map*-Erstellung (siehe Abbildung 12, Seite 68) in Zellen aus gut differenzierten NKC-Tumoren, welche mit gegen p53 gerichteter siRNA transfiziert wurden, zeigen eine gesteigerte Aktivierung von Genen für EMT, Metastasierung und auch Stammzeleigenschaften. Mittels Zeitreihenexperimenten konnte außerdem eine gesteigerte Migrationsfähigkeit der Zellen nach p53-*Knockdown* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14, Seite 70). In Einzelzellversuchen bestätigte sich eine Zunahme der Expression der EMT-Marker sowie mesenchymaler Proteine und eine verminderte Expression epithelialer Marker nach p53-Inaktivierung (siehe Abbildungen 11, Seite 66 und 13, Seite 69). Insgesamt konnte so erwiesen werden, dass der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion zu EMT und Entdifferenzierung von NFATc1-überexprimierten Pankreaskarzinomen führt.

Die unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse generierten Mausmodelle (KNPC und $KNP^{+/-}C$) zeigen fast identische Phänotypen (Dissertationsschrift von Sophia Vogt 2016, AG Ellenrieder) und die gleiche klinische Symptomatik, was dafür spricht, dass in der Tat der Verlust der Homozygotie des Wildtyp-p53 die Progression der Tumore gen Entdifferenzierung vorantreibt und nicht etwa der Zugewinn onkogener Fähigkeiten des mutierten p53. Gleiches Ergebnis ging aus Hingorani's Arbeiten mit dem KPC-Mausmodell (Hingorani et al. 2005) hervor.

Der Phänotyp und die klinische Symptomatik muriner Tumore stimmen mit denen humaner Tumore weitgehend überein. Die Tumore wachsen lokal invasiv und zeigen eine Metastasierung in die Leber. Die Tiere leiden unter Kachexie, während das mit Aszites gefüllte Abdomen rundlich aufgetrieben ist. Des Weiteren kommt es zur Obstruktion der Gallenwege und des Dünndarms. Das mediane Überleben von unter 65 Tagen zeigt die Aggressivität dieser Karzinome. Die histologische Analyse ergab in nahezu allen Tumoren mit konstitutiv exprimiertem NFATc1 und dem Verlust der

p53-Tumorsuppressorfunktion vollständige Entdifferenzierung und vermehrte Expression der EMT-Marker. In Zeitreihenexperimenten zeigte sich zudem eine hohe Motilität dieser Zellen (siehe Kapitel 5.3, 5.5 und 5.6).

Zusammenfassend demonstrieren all diese Erkenntnisse, dass die Zellhomöostase und Zellphysiologie im Pankreaskarzinom durch ein Zusammenspiel aus NFATc1- und p53-vermittelten Signalwegen reguliert wird. Eine Störung des Gleichgewichts dieser Signalwege führt zu EMT und Entdifferenzierung, zum Zugewinn stammzellähnlicher Eigenschaften der Tumorzellen und letztlich zur Formation von Fernmetastasen.

6.3 NFATc1-Expression führt zur Induktion von und Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor SOX 2

Der Stammzellfaktor SOX 2 konnte bereits als zentraler Mediator während der Progression gen Entdifferenzierung von PDACs identifiziert werden. Dieser Transkriptionsfaktor ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit von undifferenzierten embryonalen Stammzellen und fördert die Tumorgenese in zahlreichen epithelialen Tumoren, wie auch dem Pankreaskarzinom (Herreros-Villanueva et al. 2013; Sarkar und Hochedlinger 2013; Herreros-Villanueva et al. 2014). So konnte in entdifferenzierten Tumoren mit NFATc1-Überexpression ein hohes Expressionsniveau von SOX 2 nachgewiesen werden. Der Nachweis eines direkten Einflusses von NFATc1 auf SOX 2 konnte durch NFATc1-*Knockdown* induzierte Expressionsabnahme von SOX 2 sowohl in humanen als auch in murinen Tumorzellen erbracht werden (Dissertationsschrift von Sophia Vogt 2016, AG Ellenrieder).

Eine Chromatin-Immunpräzipitation, durchgeführt in murinen KNPC- bzw. humanen L3.6-Zellen, zeigt eine Bindung von NFATc1 an hochkonservierten Bindungsstellen innerhalb des SOX 2-Enhancers, die auf eine NFATc1-getriggerte Expression von SOX 2 schließen lässt (siehe Abbildungen 32,

Seite 90 und 33, Seite 91). Weitere Experimente in diesen Zelllinien führten zum Result einer reduzierten Expression von EMT-Markern nach SOX 2-*Knockdown* (siehe Kapitel 5.8; Singh et al. 2015).

Der NFATc1-SOX 2-Signalweg stellt demnach einen der Mechanismen dar, welche die Entdifferenzierung duktaler Adenokarzinome des Pankreas fördern. Durch *Sphere-forming*-Experimente konnte zusätzlich belegt werden, dass dieser Signalweg in der Regulation stammzellähnlicher Eigenschaften von Tumorzellen des Pankreaskarzinoms involviert ist (Singh et al. 2015).

Wie einleitend beschrieben, übt NFATc1 seine Funktionen gemeinsam mit Bindungspartnern aus, was die Grundlage der zell- und situationspezifischen Genregulation durch NFATc1 bildet (Mancini und Toker 2009). Die Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung zeigt eine gemeinsame Lokalisation der Transkriptionsfaktoren NFATc1 und SOX 2 im Zellkern (siehe Abbildung 37, Seite 95). Die Co-Immunpräzipitation erwies, dass NFATc1 nicht nur die Expression von SOX 2 induziert, sondern SOX 2 auch als Bindungspartner von NFATc1 agiert (siehe Abbildung 38, Seite 96). Folglich führt der *Knockdown* von SOX 2 zu einer verminderten Bindung von NFATc1 an den Enhancern von EMT-Markern. Die Ergebnisse der durchgeführten CHIP in KNPC 001-Zellen zeigen eine nach SOX 2-*Knockdown* verminderte NFATc1-Bindung sowie reduzierte Enhancer-Aktivierung, repräsentiert durch verminderte H₃K₂₇-Acetylierung am *TWIST 1*- und *SNAI 1*-Enhancer (siehe Abbildung 39, Seite 97).

Welcher Mechanismus genau den Einfluss von SOX 2 auf die NFATc1-Wirkung verursacht, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht konkretisiert werden. Verschiedene Möglichkeiten sind denkbar und müssten in Folgearbeiten auf ihre Richtigkeit überprüft werden. SOX 2 interagiert nachgewiesenermaßen mit NFATc1, ob der Transkriptionsfaktor aber gleichzeitig direkt die DNA bindet ist bisher ungewiss. Auch wäre eine Schleifenbildung möglich, das hieße, dass NFATc1 sowohl den Enhancer als

auch SOX 2 bindet, SOX 2 gleichzeitig aber auch an anderer Stelle an die DNA angelagert ist (Abbildung 42).

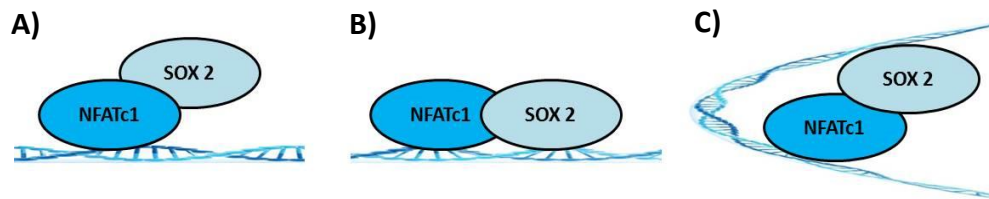


Abb. 42: Schematische Darstellung dreier Möglichkeiten zur Interaktion von SOX 2 und NFATc1. **A)** Im Komplex aus NFATc1 und SOX 2 bindet lediglich NFATc1 an der DNA **B)** SOX 2 bindet gleichzeitig an der DNA und an NFATc1. **C)** NFATc1 und SOX 2 binden an unterschiedlichen Stellen der DNA und verursachen durch Interaktion eine Schleifenbildung.

Nach Induktion der Expression von SOX 2 durch NFATc1 kommt es zur Komplexbildung der beiden Transkriptionsfaktoren. Dieser Komplex führt wiederum zur Induktion von EMT und somit zur Entdifferenzierung des Pankreaskarzinoms. Jedoch geschieht dies vor dem Hintergrund einer *p53*-Inaktivierung. Diese Erkenntnis zeigt, dass intaktes *p53* den NFATc1-SOX 2-Signalweg unterdrückt.

6.4 Der *p53*-miRNA-Signalweg wirkt hemmend auf EMT, Entdifferenzierung und Fernmetastasierung des Pankreaskarzinoms

Einer der zahlreichen Mechanismen, die durch *p53* als „Wächter des Genoms“ kontrolliert werden, ist die Regulation der Expression und Ausreifung von MicroRNAs. Als Transkriptionsfaktor fördert *p53* direkt die Expression von Mitgliedern der MicroRNA-Familien 34 und 200 (Chang et al. 2011; Ikeda et al. 2012; Hermeking 2010; Navarro und Lieberman 2015). In der Mehrzahl humaner Tumore konnte ein gestörtes Expressionsmuster von MicroRNAs nachgewiesen werden, welches zur Modulation der Expression kritischer Gene der Zellhomöostase führt (Feng et al. 2011; Rachagani et al. 2015). So auch im Pankreaskarzinom: Über 200

verschiedene MicroRNAs werden hier in veränderter Quantität exprimiert (Ali et al. 2012; Rachagani et al. 2015; Satoh et al. 2015). Die Funktion von MicroRNAs besteht darin, die Expression von Proteinen durch Bindung der entsprechenden mRNA zu inhibieren oder zu fördern (Bartel 2009; Vasudevan et al. 2007). Durch die Vielzahl von MicroRNAs, bisher konnten über 700 verschiedene beschrieben werden, ist dieser Mechanismus von großer Bedeutung für die Regulation von Zellphysiologie und Zellproliferation (Feng et al. 2011).

In Zellen aus Tumoren des NKC- und KNPC-Modells, mit *Trp53*-Inaktivierung, zeigte sich eine Reduktion der Expression von miRNA-200c und miRNA-34a (Dissertationsschrift von Sophia Vogt 2016, AG Ellenrieder). Diese MicroRNAs hemmen die Translation der angelagerten mRNA und üben in den verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien inhibierende Effekte auf die Expression der EMT-Marker ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 aus. Diese Erkenntnis geht konform mit Ergebnissen anderer Studien (Brabletz und Brabletz 2010; Pinho et al. 2011). Intaktes p53 induziert die Expression und fördert die Reifung von MicroRNAs, wie miRNA-200c und miRNA-34a (Navarro und Lieberman 2015). Folglich wird über den p53-miRNA-Signalweg die Expression der EMT-Marker ZEB 1, TWIST 1 und SNAI 1 inhibiert.

Dieses Resultat wurde durch die AG Ellenrieder in Einzelzellversuchen bestätigt. Die Transfektion von AntagoMiRs in NKC II-Zellen führt zu gesteigerter Expression der EMT-Marker (Dissertationsschrift von Sophia Vogt 2016, AG Ellenrieder), während die Reexpression der miRNAs mittels Mimics in Zelllinien mit *p53-Knockdown* zu einer Abnahme der Expression der EMT-Marker (siehe Kapitel 5.4; Dissertationsschrift von Sophia Vogt 2016, AG Ellenrieder) und des Stammzellfaktors SOX 2 führt (Singh et al 2015).

Die Induktion der Expression von miRNAs durch p53 führt somit insgesamt zur Blockade des NFATc1-SOX 2-Signalweges und zur Hemmung der

Entdifferenzierung, der Migrationsfähigkeit und der Ausbildung stammzellähnlicher Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen.

6.5 **Schlussfolgerung:** **NFATc1 und p53 regulieren in gegenläufigen Signalwegen EMT, Entdifferenzierung und Metastasierung des Pankreaskarzinoms**

NFATc1 fördert durch SOX 2-abhängige Induktion von EMT-Markern epithelial-mesenchymale Transition und bewirkt so einen stammzellähnlichen Zustand der Tumorzellen. Der NFATc1-SOX 2-Signalweg ist dem p53-miRNA-Signalweg entgegengesetzt, welcher inaktiviert sein muss, um Entdifferenzierung, Tumorprogression und Dissemination zuzulassen. Dies konnte sowohl im transgenen Mausmodell als auch in humanen PDACs nachgewiesen werden. Es existiert folglich ein hierarchisch strukturiertes Netzwerk von Signalwegen zur Regulation der Zellplastizität im duktalem Pankreaskarzinom, in welchem p53 dominant über den NFATc1-Signalweg ist. Das Expressionslevel der kontrahierenden Transkriptionsfaktoren NFATc1 und p53 ist entscheidend für die Ausprägung des Phänotyps der Tumorzellen, hat also einen Einfluss darauf, ob sich das Karzinom epithelial differenziert oder anaplastisch entdifferenziert präsentiert.

Der Stammzellfaktor SOX 2 bildet in diesem Netzwerk die zentrale Schaltstelle. Durch die Induktion der Expression und Förderung der Ausreifung von MicroRNAs wirkt p53 hemmend auf die Expression von SOX 2. Erst der Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion ermöglicht NFATc1 durch Induktion der Expression von SOX 2 und schließlich Interaktion und Komplexbildung mit dem Stammzellfaktor die Expression von EMT-Markern zu fördern. Dadurch wird eine epithelial-mesenchymale Transition initiiert und die Tumorzellen erhalten stammzellähnliche Eigenschaften. Dies führt letztlich zu Entdifferenzierung und Fernmetastasierung des duktalem Adenokarzinoms des Pankreas.

Die antidrom wirkenden Signalwege von NFATc1 und p53 sind schematisch in Abbildung 43 dargestellt.

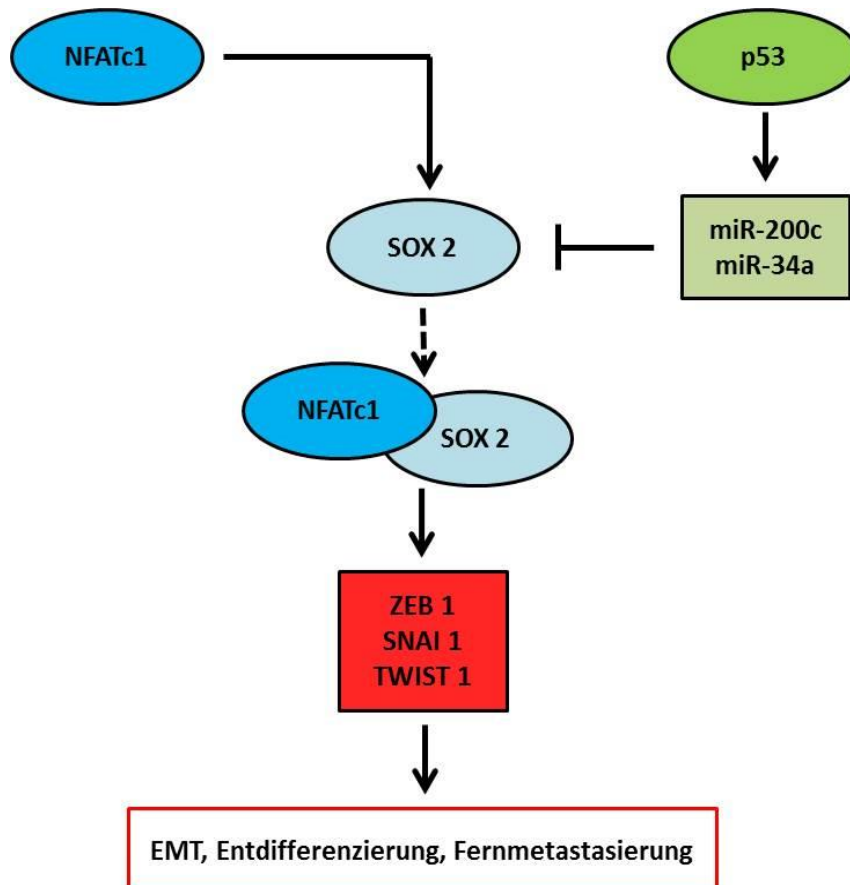


Abb. 43: Schematische Darstellung des Netzwerkes von Signalwegen zur Regulation der Zellplastizität im dukalen Adenokarzinom des Pankreas.

Die Identifikation des Regulationsmechanismus der Plastizität von PDACs bringt neue zielgerichtete Ansätze in der Therapie des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas hervor. So stellt die pharmakologische Blockade des NFATc1-SOX 2-Signalweges ein hohes therapeutisches Potential für Patienten mit Pankreaskarzinomen dar, da so die Migration von Tumorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften und somit die prognosebestimmende Fernmetastasierung unterdrückt werden kann.

7. Literaturverzeichnis

- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M et al. (2007): The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/sj.onc.1210508.
- Ali S, Saleh H, Sethi S, Sarkar FH, Philip PA (2012): MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. In: *British journal of cancer*. DOI: 10.1038/bjc.2012.383.
- Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N et al. (2011): Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. In: *PLoS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0026740.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA (2005): The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. In: *Development (Cambridge, England)*. DOI: 10.1242/dev.01907.
- Bartel DP (2009): MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Baumgart S, Chen N-M, Siveke JT, König A, Zhang J-S, Singh SK et al. (2014): Inflammation-induced NFATc1-STAT3 transcription complex promotes pancreatic cancer initiation by KrasG12D. In: *Cancer discovery*. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0593.
- Baumgart S, Glesel E, Singh G, Chen N-M, Reutlinger K, Zhang J et al. (2012): Restricted heterochromatin formation links NFATc2 repressor activity with growth promotion in pancreatic cancer. In: *Gastroenterology*. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.11.001.
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA (2002): Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/sj.onc.1205416.
- Bollrath J, Greten F. R. (2009): IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. In: *EMBO reports*. DOI: 10.1038/embor.2009.243.
- Brabletz S, Brabletz T. (2010): The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? In: *EMBO reports*. DOI: 10.1038/embor.2010.117.
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005): Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. In: *Nature reviews. Cancer*. DOI: 10.1038/nrc1694.
- Brune K, Abe T, Canto M, O'Malley L, Klein AP, Maitra A et al. (2006): Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. In: *The American journal of surgical pathology*.

Buchholz M, Ellenrieder V (2007): An emerging role for Ca²⁺/calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*.

Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G et al. (2006): Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. In: *The EMBO journal*. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601246.

Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T (2008): A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. In: *EMBO reports*. DOI: 10.1038/embo.2008.74.

Chang CJ, Chao CH, Xia W, Yang JY, Xiong Y, Li CW et al. (2011): p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. In: *Nature cell biology*. DOI: 10.1038/ncb2173.

Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, Oriss TB, Watkins SC, Clipstone N, Ray A (2003): Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. In: *The Journal of experimental medicine*. DOI: 10.1084/jem.20021170.

Chen N-M, Singh G, Koenig A, Liou G-Y, Storz P, Zhang J-S et al. (2015): NFATc1 Links EGFR Signaling to Induction of Sox9 Transcription and Acinar-Ductal Transdifferentiation in the Pancreas. In: *Gastroenterology* 148 (5), S. 1024-1034.e9. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.01.033.

Crabtree GR, Olson E. N. (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. In: *Cell*.

Davies JA (1996): Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. In: *Acta anatomica (Basel)*.

Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B, Klöppel G (2005): Pancreatic fibrosis associated with age and ductal papillary hyperplasia. In: *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. DOI: 10.1007/s00428-005-0032-1.

di Magliano MP, Logsdon CD (2013): Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. In: *Gastroenterology*. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.071.

Dong P, Karaayvaz M, Jia, N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J, Sakuragi N (2013): Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2012.334.

Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W (2011): Tumor suppressor p53 meets microRNAs. In: *Journal of molecular cell biology*. DOI: 10.1093/jmcb/mjq040.

Goldstein S (1990): Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. In: *Science (New York, N.Y.)*.

Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR (2001): Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. In: *Cell*.

Hahn S, Jackstadt R, Siemens H, Hüntten S, Hermeking H (2013): SNAIL and miR-34a feed-forward regulation of ZNF281/ZBP99 promotes epithelial-mesenchymal transition. In: *The EMBO journal*. DOI: 10.1038/emboj.2013.236.

Hengartner MO (2000): The biochemistry of apoptosis. In: *Nature*. DOI: 10.1038/35037710.

Hermeking H (2010): The miR-34 family in cancer and apoptosis. In: *Cell death and differentiation*. DOI: 10.1038/cdd.2009.56.

Herreros-Villanueva M, Bujanda L, Billadeau DD, Zhang J-S (2014): Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. In: *World journal of gastroenterology* 20 (9), S. 2247–2254. DOI: 10.3748/wjg.v20.i9.2247.

Herreros-Villanueva M, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR et al. (2013): SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. In: *Oncogenesis*. DOI: 10.1038/oncsis.2013.23.

Hessmann E, Schneider G, Ellenriede V, Siveke JT (2015): MYC in pancreatic cancer. Novel mechanistic insights and their translation into therapeutic strategies. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2015.216.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH et al. (2005): Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. In: *Cancer Cell*. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.04.023.

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A (2003): Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. In: *Genes & development*. DOI: 10.1101/gad.1102703.

Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr H-J, Hotz HG (2007): Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2926.

Hruban RH, Maitra A, Goggins M (2008): Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. In: *International journal of clinical and experimental pathology*.

Huth J, Buchholz M, Kraus JM, Molhave K, Gradinaru C, v Wichert G, Gress TM, Neumann H, Kestle, HA (2011): TimeLapseAnalyzer: multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy. In: *Computer methods and programs in biomedicine*. DOI: 10.1016/j.cmpb.2011.06.002.

Ikeda Y, Tanji E, Makino N, Kawata S, Furukawa T (2012): MicroRNAs associated with mitogen-activated protein kinase in human pancreatic cancer. In: *Molecular cancer research*. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0035.

Immervoll H, Hoem D, Kugarajh K, Steine SJ, Molven A (2006): Molecular analysis of the EGFR-RAS-RAF pathway in pancreatic ductal adenocarcinomas: lack of mutations in the BRAF and EGFR genes. In: *Virchows Archiv: an international journal of pathology*. DOI: 10.1007/s00428-006-0191-8.

Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M, Berns A (2001): Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. In: *Nature genetics*. DOI: 10.1038/ng747.

Jönsson M, Dejmek J, Bendahl P-O, Andersson T (2002): Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. In: *Cancer research*.

Kalluri R, Weinberg R. A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *The Journal of clinical investigation*. DOI: 10.1172/JCI39104.

Kao S-C, Wu H, Xie J, Chang C-P, Ranish JA, Graef IA, Crabtree GR (2009): Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. In: *Science (New York)*. DOI: 10.1126/science.1166562.

König A, Fernandez-Zapico ME, Ellenrieder V (2010): Primers on molecular pathways--the NFAT transcription pathway in pancreatic cancer. In: *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*. DOI: 10.1159/000315035.

Kranenburg O (2005): The KRAS oncogene: past, present, and future. In: *Biochimica et biophysica acta*. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.10.001.

Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB, Tom W, Paner GP, Szmulewitz RZ, Vander Griend DJ (2013): Sox2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. In: *PLoS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0053701.

Kwok WK, Ling M-T, Lee T-W, Lau TCM, Zhou C, Zhang X et al. (2005): Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. In: *Cancer research*. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3785.

Lane D, Levine A. (2010): p53 Research. The Past Thirty Years and the Next Thirty Years. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a000893.

Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. In: *Nature*. DOI: 10.1038/358015a0.

- Lee J, Jang K-T, Ki C-S, Lim T, Park YS, Lim HY et al. (2007): Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma. In: *Cancer*. DOI: 10.1002/cncr.22559.
- Li X, Zhu L, Yang A, Lin J, Tang F, Jin S et al. (2011): Calcineurin-NFAT signaling critically regulates early lineage specification in mouse embryonic stem cells and embryos. In: *Cell Stem Cell*. DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.027.
- Lim J, Thiery J. P. (2012): Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. In: *Development (Cambridge, England)*. DOI: 10.1242/dev.071209.
- Liu J, Zhang C, Feng Z (2013): Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica*. DOI: 10.1093/abbs/gmt144.
- Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, Rao A (1999): NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Lu Y, Futtner C, Rock JR, Xu X, Whitworth W, Hogan BLM, Onaitis MW (2010): Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. In: *PLoS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0011022.
- Maitra A, Hruban R. H. (2008): Pancreatic cancer. In: *Annual review of pathology*. DOI: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305.
- Mancini M, Toker A. (2009): NFAT Proteins: Emerging Roles in Cancer Progression. In: *Nature reviews. Cancer*, S. 810–819.
- Mani SA, Guo W, Liao M-J, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY et al. (2008): The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
- Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann M-L, Ventura R, Pileri SA et al. (2005): The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. In: *British journal of haematology*. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05313.x.
- Martínez-Martínez S, Redondo J. M. (2004): Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. In: *Current medicinal chemistry*.
- Miglio U, Oldani A, Mezzapelle R, Veggiani C, Paganotti A, Garavoglia M, Boldorini R (2014): KRAS mutational analysis in ductal adenocarcinoma of the pancreas and its clinical significance. In: *Pathology, research and practice*. DOI: 10.1016/j.prp.2014.01.011.
- Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF (2007): VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. In: *Annual review of pathology*. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925.

- Nakhai H, Sel S, Favor J, Mendoza-Torres L, Paulsen F, Duncker GIW, Schmid RM (2007): Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. In: *Development (Cambridge, England)*. DOI: 10.1242/dev.02781.
- Navarro F, Lieberman J. (2015): miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. In: *PloS one* 10 (7), S. e0132767. DOI: 10.1371/journal.pone.0132767.
- Neal JW, Clipstone N. A. (2001): Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. In: *The Journal of biological chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.M004888200.
- Neal JW, Clipstone N. A. (2003): A constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. In: *The Journal of biological chemistry*. DOI: 10.1074/jbc.M300528200.
- Nikorowitsch J (2016): Charakterisierung eines transgenen Mausmodells zur Kooperation zwischen NFATc1 und KrasG12D in der Pankreaskarzinogenese. Philipps-Universität Marburg, Innere Medizin.
- Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A (2004): A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. In: *Molecular and cellular biology*.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P (2010): TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. DOI: 10.1101/cshperspect.a001008.
- Oren M (2003): Decision making by p53: life, death and cancer. In: *Cell death and differentiation* 10 (4), S. 431–442. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401183.
- PálmerHG, Larriba MJ, García JM, Ordóñez-Morán P, Peña C, Peiró S et al. (2004): The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. In: *Nature medicine*. DOI: 10.1038/nm1095.
- Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lin-Lee Y-C, Ford RJ (2005): Constitutive NF-kappaB and NFAT activation in aggressive B-cell lymphomas synergistically activates the CD154 gene and maintains lymphoma cell survival. In: *Blood*. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1167.
- Pinho AV, Rooman I, Real FX (2011): p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*.
- Polyak K, Weinberg R. A. (2009): Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. In: *Nature reviews. Cancer*. DOI: 10.1038/nrc2620.
- Rachagani S, Macha MA, Heimann N, Seshacharyulu P, Haridas D, Chugh S, Batra SK (2015): Clinical implications of miRNAs in the pathogenesis, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. In: *Advanced drug delivery reviews*. DOI: 10.1016/j.addr.2014.10.020.

Rizzino A (2009): Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*. DOI: 10.1002/wsbm.12.

Robert Koch Institut (2010): Bauchspeicheldrüse. Online verfügbar unter http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html.

Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H (2014): The p53/miR-34 axis in development and disease. In: *Journal of molecular cell biology*. DOI: 10.1093/jmcb/mju003.

Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Luber B, Busch R, Höfler H, Becker K-F (2002): Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. In: *The American journal of pathology*. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64464-1.

Saito T, Oda Y, Kawaguchi K, Sugimachi K, Yamamoto H, Tateishi N et al. uneyoshi, Masazumi (2004): E-cadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of E-cadherin inactivation in synovial sarcoma. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/sj.onc.1207960.

Sakaguchi K, Saito S, Higashimoto Y, Roy S, Anderson CW, Appella E (2000): Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. In: *The Journal of biological chemistry*.

Sarkar A, Hochedlinger K. (2013): The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. In: *Cell stem cell*. DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.007.

Satoh K, Hamada S, Shimosegawa T (2015): Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Journal of Gastroenterology*. DOI: 10.1007/s00535-014-0997-0.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. In: *Cell*.

Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988): Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. In: *Science (New York)*.

Singh SK, Chen N-M, Hessmann E, Siveke J, Lahmann M, Singh G et al. (2015): Antithetical NFATc1-Sox2 and p53-miR200 signaling networks govern pancreatic cancer cell plasticity. In: *The EMBO journal*. DOI: 10.15252/embj.201489574.

Sternberg N, Hamilton D (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. In: *Journal of molecular biology*.

Sugimachi K, Tanaka S, Kameyama T, Taguchi K-i, Aishima S-i, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M (2003): Transcriptional repressor snail and progression of human hepatocellular carcinoma. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*.

Sun C, Yamato T, Furukawa T, Ohnishi Y, Kijima H, Horii A (2001): Characterization of the mutations of the K-ras, p53, p16, and SMAD4 genes in 15 human pancreatic cancer cell lines. In: *Oncology reports*.

Szychot E, Brodkiewicz A, Peregud-Pogorzelski J (2013): Will therapies that target tumour suppressor genes be useful in cancer treatment? In: *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H et al. (2002): Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. In: *Developmental cell*.

Talmadge JE, Fidler I. J. (2010): AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. In: *Cancer research*. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040.

Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, Yanagihara K, Yuasa Y (2007): Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. In: *Journal of cancer research and clinical oncology*. DOI: 10.1007/s00432-006-0165-x.

Taylor WR, Stark G. R. (2001): Regulation of the G2/M transition by p53. In: *Oncogene*. DOI: 10.1038/sj.onc.1204252.

Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. In: *Nature reviews. Cancer*. DOI: 10.1038/nrc822.

Valtorta E, Misale S, Sartore-Bianchi A, Nagtegaal ID, Paraf F, Lauricella C et al. (2013): KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*. DOI: 10.1002/ijc.28106.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007): Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. In: *Science (New York, N.Y.)*. DOI: 10.1126/science.1149460.

Vogt S (2016): Mechanismus der NFATc1-abhängigen Regulation von Stammzeleigenschaften im Pankreaskarzinom. Philipps-Universität Marburg, Innere Medizin.

Vousden KH, Prives C. (2009): Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.037.

Wade M, Li Y-C, Wahl GM (2013): MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. In: *Nature reviews. Cancer*. DOI: 10.1038/nrc3430.

Williams TM, Moolten D, Burlein J, Romano J, Bhaerman R, Godillot A et al. (1991): Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. In: *Science (New York)*.

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C et al. (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.006.

Yang J, Mani SA, Weinberg RA (2006): Exploring a new twist on tumor metastasis. In: *Cancer research*. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3850.

Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS (2000): Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. In: *Circulation research*.

Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C et al. (2007): let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. In: *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.054.

Yun SJ, Kim W-J (2013): Role of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Bladder Cancer: From Prognosis to Therapeutic Target. In: *Korean journal of urology*. DOI: 10.4111/kju.2013.54.10.645.

Zhang P, Liu H, Xia F, Zhang QW, Zhang YY, Zhao Q et al. (2013): Epithelial-mesenchymal transition is necessary for acquired resistance to cisplatin and increases the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. In: *International journal of molecular medicine*. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1538.

Zhu L, Shi G, Schmidt CM, Hruban RH, Konieczny SF (2007): Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. In: *The American journal of pathology*. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061176.

8. Anhang

8.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abb.		Seite
1	Schematische Darstellung der primären Struktur von NFATc1-c4.	6
2	Schematische Darstellung des Ca ²⁺ -/Calcineurin-/NFAT-Signalweges.	7
3	Schematische Darstellung der onkogenen Mechanismen von p53 durch <i>gain-of-function</i> -Mutationen.	12
4	WHO-Grading von Pankreastumoren aus dem NKC-Mausmodell.	21
5	WHO-Grading von Pankreastumoren aus dem KNPC-Mausmodell.	22
6	Kaplan-Meier-Überlebenskurve der NKC-/KPC- und KNPC-Mäuse.	22
7	Kreuzungsschema zur Generierung der KNP ^{+/-} C-Mäuse.	33
8	p48Cre-vermittelte Aktivierung der inserierten Genkonstrukte <i>c.n.NFATc1</i> , <i>Kras</i> ^{G12D} und <i>p53flox</i> .	35
9	PCR-Analyse zum Nachweis des KNP ^{+/-} C-Genotyps.	38
10	HE-Färbung und immunhistochemische Analyse des Expressionsverhaltens von p53, HA-NFATc1, E-Cadherin und ZEB 1 in murinen Pankreastumoren verschiedener Differenzierungsgrade aus dem NKC-Mausmodell.	65
11	Expressionsverhalten von EMT-Markern in murinen Pankreastumoren mit p53-Wildtyp und nach Verlust der p53-Tumorsuppressorfunktion.	66
12	Expressionsanalyse nach p53- <i>Knockdown</i> in NKC II-Zellen.	68
13	Expressionsverhalten von EMT-Markern in NKC II-Zellen nach p53- <i>Knockdown</i> .	69
14	Zeitreihenexperiment in NKC II-Zellen nach p53- <i>Knockdown</i> .	70

15	HE-Färbungen von Lebermetastasen und einer Lymphknotenmetastase von Pankreaskarzinomen aus dem KNPC-Mausmodell.	72
16	Charakterisierung der KNP ^{+/-} C-Maus (Makroskopie).	73
17	Charakterisierung der KNP ^{+/-} C-Maus (Mikroskopie).	74
18	Kaplan-Meier-Überlebenskurven der KNP ^{+/-} C- bzw. NKC-, KNPC- und KNP ^{+/-} C-Mäuse im Vergleich.	75
19	HE-Färbung und immunhistochemische Analyse des Expressionsverhaltens von HA-NFATc1, E-Cadherin, Vimentin und ZEB 1 in Pankreastumoren aus NKC-, KNPC- bzw. KNP ^{+/-} C-Mausmodell.	77
20	Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach Überexpression verschiedener MicroRNAs.	78
21	Expressionsverhalten von EMT-Markern in NKC II-Zellen nach Inhibition verschiedener MicroRNAs.	79
22	Zeitreihenexperiment in KNPC 001-Zellen nach Überexpression von miRNA-200c.	80
23	Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach Überexpression von miR-200c	81
24	mRNA-Expression von EMT-Markern in murinen Pankreastumoren aus dem KPC- und KNPC-Modell im Vergleich.	82
25	Proteinexpression von EMT-Markern in murinen Pankreastumoren aus dem KPC- und KNPC-Modell im Vergleich.	83
26	Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach NFATc1- <i>Knockdown</i> .	84
27	Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach NFATc1- <i>Knockdown</i> .	85
28	Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC del3-Zellen nach NFATc1- <i>Knockdown</i> .	86
29	Zeitreihenexperiment in KNPC 001-Zellen nach CsA-Behandlung.	87

30	Expressionsverhalten von EMT-Markern in L3.6-Zellen nach NFATc1- <i>Knockdown</i> .	88
31	Zeitreihenexperiment in Panc 1-Zellen nach Behandlung mit Cyclosporin A.	89
32	Chromatin-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen.	90
33	Chromatin-Immunpräzipitation in L3.6-Zellen.	91
34	Expressionsverhalten von EMT-Markern in KNPC 001-Zellen nach SOX 2- <i>Knockdown</i> .	92
35	Expressionsverhalten von EMT-Markern in L3.6-Zellen nach SOX 2- <i>Knockdown</i> .	93
36	Zeitreihenexperiment in KNPC 001-Zellen nach SOX 2- <i>Knockdown</i> .	94
37	Co-Immunfluoreszenzfärbung von HA-NFATc1 und SOX 2 in KNPC 001- und KNPC del3-Zellen.	95
38	Co-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen.	96
39	Chromatin-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen nach SOX 2- <i>Knockdown</i> .	97
40	Co-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen.	98
41	Chromatin-Immunpräzipitation in KNPC 001-Zellen nach MicroRNA-200c-Überexpression.	99
42	Schematische Darstellung dreier Möglichkeiten zur Interaktion von SOX 2 und NFATc1.	105
43	Schematische Darstellung des Netzwerkes von Signalwegen zur Regulation der Zellplastizität im duktalem Adenokarzinom des Pankreas.	108

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab.		Seite
1	Verwendete Laborgeräte	24
2	Verwendete (Bio-)Chemikalien und Enzyme	25
3	Verwendete Kits	28
4	Verwendete Labormaterialien	29
5	Beschreibung und Eigenschaften der verwendeten Zelllinien	30
6	Sequenzen und Hersteller der für die Genotypisierung verwendeten Primer	37
7	PCR-Programme und Bandengröße der zu typisierenden Gene	37
8	Verwendete Antikörper für Immunhistochemie	41
9	Verwendete siRNA-Konstrukte	46
10	Verwendete Mimics	46
11	Verwendete AntagoMiRs	47
12	Verwendete Primärantikörper für die Western Blot-Analyse	52
13	Verwendete Sekundärantikörper für die Western Blot-Analyse	52
14	Verwendete Antikörper für Immunpräzipitation	53
15	Verwendete Antikörper für die Chromatin-Immunpräzipitation	56
16	Verwendete ChIP-Primer für murine Zellen	58
17	Verwendete ChIP-Primer für humane Zellen	58
18	Verwendete Primer für qRT-PCR in murinen Zellen	60
19	Verwendete Primer für qRT-PCR in humanen Zellen	61
20	Verwendete Primer für qRT-PCR-Analyse auf miRNAs	62
21	Verwendete Antikörper für Immunfluoreszenz	63

8.3 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ac	Acetyliert
AG	Arbeitsgruppe
AP	Aktivator-Protein
Bcl	<i>B-cell-lymphoma</i>
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
CA	Carcinoma
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CAM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CB	Calcineurin-Bindungsstelle
CDK	<i>Cyclin dependent kinases</i>
cDNA	<i>Complementary-DANN</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CK-1	Casein Kinase-1
CK-19	Cytokeratin-19
CRAC	<i>Ca²⁺ release activated channels</i>
Cre	<i>Cause of Recombination</i>

CsA	Cyclosporin A
CSC	<i>Cancer stem cells</i>
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
dest.	Destillata
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DYRK	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ESC	<i>Embryonic stem cells</i>
et al.	Et alii
FCS	Fetales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GNEF	<i>Guanosine nucleotide exchange factor</i>
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin

HDAC	Histon-Deacetylasen
HDM	<i>Human double minute</i>
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HMG	<i>High-mobility group</i>
HP	Heterochromatin Protein
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
InsP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Int	Intron
IP	Immunpräzipitation
IPMN	<i>Intraductal pancreatic mucinous neoplasia</i>
IRS	<i>Immunoreactive score</i>
k.o.	<i>Knock out</i>
Kras/KRAS	Kirsten rat sarcoma
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>Mitogen activated phosphorylated kinase</i>
MCN	<i>Mucinous cystic neoplasia</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
miRNA	Micro RNA
NES	<i>normalized enrichment score</i>

NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
NHR	NFAT-homologe Region
NL	Nukleäre Lokationssequenz
P	Phosphat-Ion
PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase-chain-reaction</i>
Rb	Retinoblastoma Protein
REG	Regulatorische Domäne
RHR	Rel-homologe Region
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
SA-β-Gal	<i>senescence-associated-β-galactosidase</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>

SP	Serin-Prolin
SRR	Serin-rich-region
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween[®] 20</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TET	Tetramerisierungsdomäne
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World health organization</i>
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZEB 1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

8.4 Schreibweisen

<i>Kursiv klein</i>	(z.B. <i>Trp53, Kras</i>)	murines Gen/ DNA
<i>KURSIV GROß</i>	(z.B. <i>TP53, KRAS</i>)	humanes Gen/ DNA
Nicht kursiv	(z.B. SOX 2, NFATc1)	RNA oder Protein (murin/ human)

8.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Ahrens, Arabin, Barth, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Best, Bürk, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Damanakis, Dannlowski, Daut, Decher, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Efe, Eilers, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fuchs-Wunkelmann, Geks, Glatzl, Görg C., Gress, Grimm, Henke, Hertl, Heverhagen, Heyse, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kill, Kim-Berger, Kircher, Kirschbaum, Klose, Köhler, König, Koolman, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Maier, Maisch, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Pantazis, Pape-Meyer, Peterlein, Plant, Renz, Rey del, Richter, Riera, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schneider, Schu, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Strick, Stiewe, Suske, Tackenberg, Teymoortasch, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wiegand, Wrocklage, Wulf, Zemlin, Zettl, Zoremba

8.6 Danksagung

Abschließend möchte ich einigen Personen danken, die wesentlich zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Volker Ellenrieder, der mich vor vier Jahren in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir das Thema dieser Arbeit vorschlug. Mit seiner ansteckenden Begeisterung für NFAT und das Pankreaskarzinom konnte er mein Interesse für dieses Thema wecken und meine Motivation über die Jahre aufrechterhalten. Durch konstruktive Kritik in langen Gesprächen und Diskussionen gab er mir stets die richtigen Denkanstöße. Seine humorvolle Art, auch außerhalb des Labors, hat dazu beigetragen, dass mir die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe große Freude bereitet hat.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Gress möchte ich mich bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in der Abteilung für Gastroenterologie der Universität Marburg anfertigen durfte.

Dr. Shiv Singh danke ich für die Betreuung während meiner Forschungsarbeit. Bei Kristina und Bettina bedanke ich mich herzlich für die Hilfe bei zahlreichen Experimenten und die Geduld, die sie mir als „Laboranfänger“ entgegengebracht haben. Ein herzliches Dankeschön an das komplette Team der AG Ellenrieder und an meine Mitdoktoranden! Ein besonderer Dank geht an Dr. med. Elisabeth Hessmann. Danke, dass ich mich jederzeit mit Fragen und Problemen an sie wenden konnte, sie hat über die ein oder andere kleine und große Krise hinweggeholfen.

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Ansgar Schmidt aus der Pathologie der Universität Marburg, der eine große Hilfe bei der Färbung der histologischen Präparate war und sich sehr viel Zeit für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen bezüglich der Immunhistologie genommen hat.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern. Nur durch ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung war es mir möglich Medizin zu studieren und damit diese Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke für die Geduld und das Verständnis während meines gesamten Studiums und insbesondere für die Möglichkeit ein Freisemester für das Schreiben der Dissertation nehmen zu können. Meiner Schwester Daniela Völker möchte ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Sie hat sich viel Zeit dafür genommen und mit zahlreichen Verbesserungsvorschlägen wesentlich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danke ich Sophia Vogt, die zum richtigen Zeitpunkt den Tipp hatte, dass in der AG Ellenrieder noch Doktoranden gesucht werden. Während unserer Zusammenarbeit wurde Sie eine sehr gute Freundin und gemeinsam gingen wir durch die „guten und schlechten Zeiten“ im Laboralltag. Wir verbrachten zahllose Stunden im Mausstall, und endlos lange Wochenenden im Labor doch durch ihre immer positive Einstellung und ansteckend gute Laune ließ ich mich gerne mitreißen. Danke für die vielen lustigen Momente und fröhlichen Stunden!

Danke an meine Marburger Freunde: Linda, Sophi, Anna-Lena, Hannes und Daniel, Julius, Eva, Katha, Caro, Franz und Claudi! Mit dem Abschluss dieser Arbeit geht für mich eine unvergesslich schöne Zeit in Marburg zu Ende.

Danke!