

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin,  
Schwerpunkt Gastroenterologie und Stoffwechsel

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

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Funktionelle Charakterisierung der zellulären Rolle des  
Kandidatengens Valosin containing protein im Pankreaskarzinom**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Sven Schimanski**  
aus Niederwerrn

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 02.02.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Malte Buchholz

1. Korreferent: Prof. Dr. Jörg-Walter Bartsch

Für Anita und Holger

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das duktale Adenokarzinom des Pankreas.....	1
1.2	Vorläuferläsionen und molekularpathologische Grundlagen des PDAC ....	2
1.3	Der Kandidat Valosin-Containing Protein (VCP).....	5
1.4	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Buchholz.....	7
1.5	Zielsetzung der Arbeit .....	8
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>10</b>
2.1	Arbeits- und Verbrauchsmaterial.....	10
2.2	Laborgeräte.....	11
2.3	Puffer und Lösungen .....	13
2.4	Chemikalien .....	15
2.5	Kit-Systeme .....	17
2.6	Zellkultur.....	17
2.6.1	Zelllinien.....	17
2.6.2	Nährmedien und Kultivierungszubehör.....	18
2.7	Oligonukleotide.....	18
2.7.1	Primer zur cDNA-Synthese.....	18
2.7.2	Primer zur qRT-PCR .....	18
2.7.3	„Non silencing“-siRNA .....	19
2.7.4	Spezifische siRNAs .....	19
2.8	Rezept für Polyacrylamidgele .....	20
2.8.1	Rezept für Trenngele .....	20
2.8.2	Rezept für Sammelgele.....	20
2.8.3	Rezept für Stoppagele .....	20
2.9	Antikörper.....	21
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>22</b>
3.1	Zellbiologische Methoden .....	22
3.1.1	Kultivierung der verwendeten Zelllinien .....	22
3.1.2	Zellzählung und Aussäen von Zellen.....	22
3.1.3	Kryokonservierung .....	23
3.1.4	Transfektion mittels siRNA.....	23
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	24
3.2.1	Isolation von RNA .....	24
3.2.2	Synthese von cDNA .....	25
3.2.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	25
3.3	Proteinanalytische Methoden .....	26

3.3.1	Proteinextraktion .....	26
3.3.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	27
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese.....	27
3.3.4	Western-Blot.....	29
3.3.5	Ponceau-S-Färbung der Membran .....	29
3.3.6	Immundetektion und Chemolumineszenz.....	29
3.4	Viabilitätsassay MTT .....	30
3.5	Proliferationsassay BrdU .....	31
3.6	Statistische Auswertung .....	32
<b>4</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse.....</b>	<b>33</b>
4.1	Abbildungsverzeichnis.....	33
4.2	Tabellenverzeichnis.....	34
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
5.1	VCP-Expression in humanem Pankreasgewebe.....	35
5.2	Knockdown-Effizienz .....	36
5.3	Funktionelle Assays .....	37
5.3.1	MTT-Assay.....	37
5.3.2	BrdU-Assay.....	39
5.4	Western Blots.....	42
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
6.1	Einordnung der gewonnenen Ergebnisse in die Literatur .....	44
6.2	Proteinsynthese und proteotoxischer Stress in Karzinomzellen .....	46
6.3	RNA-Interferenz und Off-Target-Effekte .....	49
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>67</b>
10.1	Curriculum vitae.....	67
10.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	69
10.3	Danksagung.....	70
10.4	Ehrenwörtliche Erklärung .....	71

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas**

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist im Moment die vierthäufigste Krebstodesursache und wird bis zum Jahr 2030 voraussichtlich die zweithäufigste Krebstodesursache in den USA sein (Rahib et al. 2014). Übertroffen wird dies lediglich vom Bronchialkarzinom, dem Prostatakarzinom beim Mann bzw. dem Mammakarzinom bei der Frau und dem kolorektalen Karzinom (Siegel et al. 2018). Betrachtet man die prognostizierten Inzidenzraten und Mortalitätsraten für das Jahr 2018, so kann man sowohl in den USA als auch in Europa ein ähnliches Muster beobachten. Für beide Geschlechter wird die Inzidenzrate jeweils nur knapp über der Mortalitätsrate liegen (Bray et al. 2018; Malvezzi et al. 2018; Siegel et al. 2018).

Sieht man sich beim Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts die epidemiologischen Maßzahlen für die deutsche Bevölkerung an, so präsentiert sich ein ähnlich ernüchterndes Bild. Sowohl die Inzidenzraten als auch die Mortalitätsraten sind in den letzten Jahren trotz intensiver Forschungsbemühungen annähernd konstant geblieben. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ungefähr 9 %, das Pankreaskarzinom hat somit eine äußerst ungünstige Prognose (Robert Koch-Institut). Selbst bei primär erfolgreicher R0-Resektion des Tumors, also tumorfreien Resektionsrändern in der histologischen Beurteilung des Präparates, liegt die 5-Jahre-Überlebensrate lediglich bei etwa 25 % (Kedra et al. 2001). Ein Grund für diese fatale Prognose ist der häufig späte Diagnosezeitpunkt der Erkrankung, da das Pankreaskarzinom in frühen Stadien meist keine oder nur sehr unspezifische Symptome wie abdominale Schmerzen, Übelkeit und Gewichtsverlust verursacht (Keane et al. 2014). Somit sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lediglich etwa 10 - 20 % der Pankreaskarzinome resezierbar (Ilic and Ilic 2016). Weitere für den Patienten ungünstige Eigenschaften des Tumors sind frühe Rezidive und ein aggressives Metastasierungsverhalten sowie häufige Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie (Kamisawa et al. 1995; Kamisawa et al. 2016). Des Weiteren sind die genauen Ursachen für die Entstehung des Pankreaskarzinoms weitestgehend unbekannt (Ilic and Ilic 2016). Dennoch gibt es einige gesicherte Risikofaktoren, zu welchen unter anderem Zigarattenrauchen, Diabetes mellitus Typ I und II, Übergewicht und die chronische Pankreatitis zählen (Parkin et al. 2011; Batabyal et al. 2014; Aune et al. 2012; Ekblom et al. 1994). Außerdem wird davon ausgegangen, dass in etwa 5 – 10 % der Fälle eine genetische Prädisposition vorliegt (Anand et al. 2008). So haben beispielsweise Personen, bei denen zwei Verwandte ersten Grades am

Pankreaskarzinom erkrankt sind, ein doppelt so hohes Riskiko selbst am Pankreaskarzinom zu erkranken wie Personen mit blander Familienanamnese (Greer et al. 2007).

Derzeit ist die vollständige Resektion des Tumors die einzig kurative Therapieoption des Pankreaskarzinoms. Dabei werden bei Tumoren im Bereich des Pankreaskopfes vor allem die Duodenopankreatektomie mit Pylorusresektion (Kausch-Whipple-Operation) oder die Duodenopankreatektomie mit Erhalt des Pylorus (Operation nach Traverso-Longmire) durchgeführt (Hartwig et al. 2013; Basilico et al. 1998). Im Regelfall erhalten Patienten nach erfolgter Tumorresektion eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine, weil hierdurch sowohl das progressionsfreie Überleben als auch die Gesamtüberlebenszeit verbessert werden kann (Oettle et al. 2013; Kamisawa et al. 2016). Aktuell gibt es keine Studie, die den Vorteil einer neoadjuvanten Chemotherapie bei primär resezierbarem Pankreaskarzinom belegen kann (Klaiber et al. 2018). Allerdings laufen aktuell an verschiedenen Zentren Studien, die verschiedene neoadjuvante Therapieregime austesten (Klaiber et al. 2018; Schwarz et al. 2018). Der Vorteil einer neoadjuvanten Therapie ist auch in den Fällen unklar, in denen der Tumor zwar noch keine Fernmetastasen gebildet hat, jedoch bereits eine Infiltration in die großen umgebenden Blutgefäße vorliegt (Heinrich et al. 2011; Hackert et al. 2017). Im metastasierten Stadium stehen mittlerweile verschiedene Therapieregime zur Verfügung, welche der Monotherapie mit Gemcitabine hinsichtlich progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberlebenszeit überlegen sind. Dazu gehören zum einen die Therapie mit Gemcitabine und Erlotinib, einem Antagonisten des EGF-Rezeptors, und die Therapie mit Gemcitabine und Nab-Paclitaxel, an Albumin-Nanopartikel gebundenes Paclitaxel (Moore et al. 2007; Hoff et al. 2013). Zum anderen gibt es noch eine Kombination der Chemotherapeutika Folsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin (Conroy et al. 2011).

## **1.2 Vorläuferläsionen und molekularpathologische Grundlagen des PDAC**

Die drei häufigsten und am besten charakterisierten Vorläuferläsionen des invasiven Pankreaskarzinoms sind die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) (Fischer and Wood 2018). Seit 2015 werden alle drei genannten Vorläuferläsionen nur noch in low-grade oder in high-grade Läsionen eingeteilt. Dies ist der daraus abgeleiteten Konsequenz in der klinischen Praxis geschuldet, in welcher low-grade Läsionen lediglich beobachtet werden, high-grade Läsionen jedoch in der Regel reseziert werden (Basturk et al. 2015). Die PanIN-Läsionen wurden früher in PanIN-1a, PanIN-1b, PanIN-2 (dies entspricht

den jetzigen low-grade PanINs) und in PanIN-3 (entspricht den jetzigen high-grade PanINs) unterteilt (Basturk et al. 2015). Eine PanIN ist eine mikroskopische, flache oder papilläre, nicht-invasive epitheliale Neoplasie, welche durch unterschiedliche Mengen an Schleim und verschiedene Grade an Zelltypen charakterisiert ist (Hruban et al. 2001). Die Ursache dieser PanINs ist unbekannt, allerdings spielen wohl Faktoren wie Zigarettenrauchen und exzessiver Alkoholkonsum eine Rolle in deren Pathogenese (Sipos et al. 2009).

Mutationen im K-ras-Onkogen liegen in etwa 90-95 % aller Fälle eines Pankreaskarzinoms vor (Biankin et al. 2012). Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass es sich dabei meistens um Mutationen im Codon 12 des K-ras-Onkogens handelt, was letztlich in einem konstitutiv aktiven K-ras-Protein resultiert (Hruban et al. 1993; Smit et al. 1988; Takashima and Faller 2013). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass K-ras-Mutationen zu den sehr frühen Treiber Mutationen in der Progression von PanINs zählen. In mehr als 90 % aller PanINs lässt sich unabhängig von ihrem histologischen Differenzierungsgrad mindestens eine Veränderung im K-ras-Onkogen nachweisen (Fischer and Wood 2018; Kanda et al. 2012). K-ras ist an der Aktivierung verschiedener Signalwege in der Zelle beteiligt, darunter z. B. der RAF/MEK/MAPK-Signalweg oder der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg. Dadurch wird sowohl eine gesteigerte Zellproliferation angeregt als auch ein besseres Zellüberleben gewährleistet (Di Magliano and Logsdon 2013; Cox et al. 2015).

Neben verschiedenen Mutationen im K-ras-Onkogen treten in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms auch Mutationen in diversen Tumorsuppressorgenen auf (Fischer and Wood 2018). So lassen sich z.B. in über 80 % der Pankreaskarzinome inaktivierende Mutationen des CDKN2A/INK4-Gens nachweisen (Caldas et al. 1994). Dieses Gen codiert für das Zellzyklus-Protein p16. Indem es die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins inhibiert, wird der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (Hruban et al. 2006). Mutationen im Gen für p16 können teilweise bereits im Stadium PanIN-1 bzw. in low-grade PanINs nachgewiesen werden und nehmen mit Progression des PanIN-Grades bis hin zum invasiven Pankreaskarzinom an Häufigkeit zu (Furukawa et al. 2005). Des Weiteren können in der Karzinogenese des Pankreaskarzinoms auch die Gene für die beiden Tumorsuppressoren TP53 und DPC4/SMAD4 mutieren. Jedoch treten diese Mutationen fast ausschließlich in high-grade PanINs oder im invasiven Pankreaskarzinom auf (Lüttges et al. 2001; Wilentz et al. 2000). TP53 kann sowohl einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase als auch die Apoptose der Zellen induzieren, wenn beispielsweise DNA-Schäden oder oxidativer Stress in der Zelle vorliegen. Somit können bei fehlender bzw. verminderter Produktion von TP53 DNA-Reparaturmechanismen und apoptotische Signale in diesen Zellen



umgangen werden (Biegling et al. 2014; Lane 1992). In etwa 50 % der Pankreaskarzinome lassen sich inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens SMAD4 nachweisen (Xia et al. 2015). SMAD4 ist Bestandteil des TGF- $\beta$ -Signalwegs und bildet in diesem mit weiteren SMAD-Proteinen einen Transkriptionsfaktor (Zhang et al. 1997). Bei fehlender SMAD4-Expression resultieren letztlich ein verminderter TGF- $\beta$ -induzierter Zellzyklusarrest und mangelnde apoptotische Signale, was wiederum eine gesteigerte Proliferation der betroffenen Zellen zur Folge hat (Lin and Feng 2005).

Neben den eigentlichen Tumorzellen spielt auch deren Umgebung, das sogenannte Tumorstroma, eine sehr wichtige Rolle in der Biologie des Pankreaskarzinoms (Kota et al. 2017). Dabei sind zum einen pankreatische Sternzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und diverse Immunzellen wichtige zelluläre Bestandteile dieses Tumorstromas. Zum anderen besteht das Tumorstroma aus wichtigen nicht zellulären Komponenten wie Kollagen und Fibronectin sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in der extrazellulären Matrix gespeichert sind (Chu et al. 2007; Korc 2007). Diese Synthese eines voluminösen Tumorstromas um die eigentlichen Tumorzellen wird desmoplastische Stromareaktion genannt und wird von den Tumorzellen initiiert, indem sie verschiedene proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren (Xu et al. 2014; Wilson et al. 2014; Hidalgo and Hoff 2012). Darunter befinden sich beispielsweise TGF- $\beta$ 1, PDGF oder TNF- $\alpha$ , welche die pankreatischen Sternzellen und Fibroblasten aktivieren. Diese sezernieren daraufhin diese große Mengen an Proteinen, die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (Xu et al. 2014; Wilson et al. 2014). Der hohe Gehalt an Kollagenfasern im Tumorstroma und die damit einhergehende Kompression der Blutgefäße bedingen eine Hypovaskularisierung des Pankreaskarzinoms. Diese bedingt eine reduzierte Anflutung von zytostatisch wirksamen Medikamenten an die Karzinomzellen, was in der Resistenzentwicklung des PDAC zwar letztlich eine untergeordnete, aber dennoch nennenswerte Rolle spielt (Olive et al. 2009; Erkan et al. 2009). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix sind die sogenannten Matrix-Metalloproteinasen, welche eine Degradation derselben bewirken, wodurch die Tumorzellen aus ihrem Zellverbund migrieren und letztlich Metastasen bilden können (Bonnans et al. 2014).

Aufgrund der großen Bedeutung des Tumorstromas und des zunehmenden Erkenntnisgewinns über dessen Funktionsweise, werden zunehmend Therapiestrategien entwickelt, die sich gezielt gegen bestimmte Komponenten des Stromas bzw. dessen Interaktion mit den Tumorzellen richten (Rucki and Zheng 2014; Stromnes et al. 2014). Ein Ziel waren in mehreren Studien die bereits erwähnten Matrix-Metalloproteinasen (Kota et

al. 2017). Jedoch konnte bis jetzt kein Inhibitor entwickelt werden, der alleine oder in Kombination mit Gemcitabine ein besseres Gesamtüberleben als die Monotherapie mit Gemcitabine erzielen konnte. Die Rolle der Tumor-Stroma-Interaktion muss also noch genauer untersucht werden, um in Zukunft effizientere Therapiestrategien entwickeln zu können (Bramhall et al. 2001; Bramhall et al. 2002; Moore et al. 2003; Kota et al. 2017).

### **1.3 Der Kandidat Valosin-Containing Protein (VCP)**

Das Protein VCP (valosin-containing protein), auch p97 oder in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Cdc48 genannt, gehört zur Superfamilie der AAA+ ATPasen (ATPases associated with various cellular activities) und spielt somit eine große Rolle in verschiedenen, voneinander unabhängigen zellulären Prozessen (Song et al. 2003; Peters et al. 1990). Da VCP zwei Domänen mit einer Nukleotidbindungsstelle besitzt, gehört es innerhalb dieser Superfamilie zum Typ 2 (Peters et al. 1990). Das Protein wurde 1982 erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Cdc48 beschrieben (Moir et al. 1982). In der Mitte der 1980er Jahre wurde VCP dann erstmals in Säugetierzellen nachgewiesen (Koller and Brownstein 1987). Beim Vergleich der beiden Proteine VCP und Cdc48 fällt eine hohe Sequenzhomologie der Aminosäuren von fast 70 % auf. VCP enthält also evolutionär hoch konservierte Aminosäuresequenzen (Fröhlich et al. 1991). VCP lässt sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisen (Peters et al. 1990). Allerdings kommt es auch an den Membranen diverser Zellorganellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, den Mitochondrien und Endosomen vor (Latterich et al. 1995; Rabouille et al. 1995; Xu et al. 2011; Ramanathan and Ye 2012). VCP ist ein Homooligomer, welches aus sechs Protomeren besteht (Peters et al. 1990). Jedes dieser Protomere gliedert sich in eine N-terminale Domäne, zwei ATPase-Domänen und eine C-terminale Domäne (Banerjee et al. 2016). Somit bildet sich das Hexamer, dessen Aufbau durch zwei übereinanderliegende Ringschichten gekennzeichnet ist. Die N-terminale Domäne und die angrenzende ATPase-Domäne bilden die obere Ringschicht, die zweite ATPase-Domäne und die C-terminale Domäne bilden die untere Ringschicht (Huyton et al. 2003).

Wie bereits erwähnt spielt VCP in verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle. Funktionell bedeutsam ist es vor allem für die Proteinhomeostase innerhalb eukaryotischer Zellen (Meyer et al. 2012). Der erste und bisher am besten für VCP untersuchte Mechanismus ist die Endoplasmatische Retikulum assoziierte Proteindegradation (ERAD). Dabei werden letztlich fehlerhaft gefaltete Proteine des Endoplasmatischen Retikulums eliminiert (Ye et al. 2017). Zunächst müssen die Proteine durch einen Retrotranslokationskomplex aus dem Lumen des

Endoplasmatischen Retikulums in das Zytosol gelangen (Ye et al. 2017). Maßgeblich daran beteiligt ist die Ubiquitin-Protein-Ligase Hrd1, welche die Proteine zuerst bindet, an diese dann eine Polyubiquitin-Kette anfügt und abschließend Anteile des Proteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol verlagert (Stein et al. 2014). In diesem Prozess kommt es außerdem zu einer Autophosphorylierung, was möglicherweise eine erhöhte Substratspezifität von Hrd1 bewirkt (Baldrige and Rapoport 2016). Im nächsten Schritt wird nun VCP an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums rekrutiert, was vor allem durch den Proteinkomplex aus den Proteinen Ufd1 und Npl4 vermittelt wird (Stein et al. 2014; Ye et al. 2001). Mittels Hydrolyse von ATP kann VCP nun das gesamte Protein durch den Retrotranslokationskomplex in das Zytosol befördern und die Dislokation des Proteins von der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gewährleisten (Stein et al. 2014). Abschließend stellt VCP das fehlgefaltete Protein dem Proteasom zur Degradation bereit (Ye et al. 2017). Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist aber noch nicht endgültig aufgedeckt (Zhang and Ye 2014). Es gibt Studien, die nahelegen, dass in *Saccharomyces cerevisiae* Cdc48 direkt an die 20S-Untereinheit des Proteasoms bindet und somit ein direkter Transport des abzubauenen Proteins stattfindet (Zhang and Ye 2014; Barthelme and Sauer 2012). Ein derartiges Modell konnte für das humane VCP bislang nicht nachgewiesen werden (Zhang and Ye 2014). Dafür gibt es aber Hinweise darauf, dass spezielle Adapterproteine gewissermaßen als Shuttle zwischen VCP und dem Proteasom fungieren. Ein Beispiel dafür sind die Proteine Erasin und Ubiquitin, wobei Erasin eine Verbindung zwischen VCP und Ubiquilin herstellt. Ubiquitin stellt schließlich das Adapterprotein zwischen Erasin und dem Proteasom dar (Zhang and Ye 2014; Lim et al. 2009).

Darüber hinaus spielt VCP in weiteren zellulären Prozessen der Proteindegredation eine Rolle. Im Verlauf der sogenannten Mitochondrium assoziierten Proteindegredation (MAD) extrahiert VCP Polypeptide aus der äußeren Membran der Mitochondrien und stellt sie vergleichbar dem Vorgang der ERAD dem Proteasom zum Abbau bereit (Xu et al. 2011; Hemion et al. 2014).

Abschließend gilt zu erwähnen, dass VCP bereits cotranslational an der Degradation von naszierenden Polypeptidketten am Ribosom beteiligt ist. Dieser Prozess wird Ribosom assoziierte Proteindegredation genannt (Ye et al. 2017). Zwei Arbeitsgruppen haben in *S. cerevisiae* einen Proteinkomplex aus der Ubiquitin-Ligase Ltn1, den akzessorischen Proteinen Tae2 und Rqc1 und dem VCP-Homolog Cdc48 sowie dessen heterodimeren Cofaktor Ufd1-Npl4 entdeckt (Meyer and Wehl 2014; Brandman et al. 2012; Defenouillère

et al. 2013). Auch bei diesem Vorgang extrahiert Cdc48 letztlich das Polypeptid vom Ribosom und stellt es dem Proteasom zum Abbau bereit (Verma et al. 2013).

Eine weitere, zentrale Aufgabe von VCP ist die Gewährleistung der Genomstabilität (Vaz et al. 2013). So spielt VCP beispielsweise eine maßgebliche Rolle darin, die DNA-Reparatur nach Doppelstrangbrüchen zu organisieren (Dantuma et al. 2014). Wichtig für diesen Mechanismus ist zunächst die Ubiquitylierung Chromatin-assoziiierter Proteine durch die Ubiquitin-Ligase RNF8 (Mailand et al. 2007; Huen et al. 2007). Wie bereits in anderen Prozessen dargestellt, kann VCP auch hier mittels seines heterodimeren Cofaktors Ufd1-Npl4 an die ubiquitylierten Proteine binden (Meerang et al. 2011). In der Folge extrahiert VCP die ubiquitylierten Proteine vom Ort des Doppelstrangbruchs (Ramadan et al. 2007; Verma et al. 2011). Somit können sich nun Proteine an das Chromatin anlagern, die zur Reparatur des Doppelstrangbruchs benötigt werden (Meerang et al. 2011). So entfernt VCP beispielsweise das Protein L3MBTL1 vom Chromatin-assoziierten Histon H4, sodass das zur DNA-Reparatur benötigte Protein 53BP1 an exakt die gleiche Stelle binden kann (Min et al. 2007; Acs et al. 2011).

Als weitere wichtige Funktion von VCP ist abschließend noch die Regulierung verschiedener Signalwege der Zelle zu nennen (Meyer and Wehl 2014). So kann VCP beispielsweise den NF- $\kappa$ B-Signalweg auf unterschiedlichen Wegen aktivieren (Ye et al. 2017). Nach Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  bindet VCP mittels seines Cofaktors Ufd1-Npl4 an das inhibitorische Protein I $\kappa$ -B $\alpha$  und stellt es dem Proteasom zum Abbau bereit. Somit wird NF- $\kappa$ B freigesetzt und kann nun in den Zellkern gelangen und dort die Expression proinflammatorischer Gene aktivieren (Dai et al. 1998; Li et al. 2014). Beim alternativen Weg der NF- $\kappa$ B-Aktivierung lagert sich letztlich ein Komplex aus der Ubiquitin-Ligase SCF<sup>TRCP</sup>, VCP und dessen Cofaktor Ufd1-Npl4 an die inaktive Untereinheit p100 an. Nach Ubiquitylierung und partieller Degradation durch das Proteasom kann die aktive Untereinheit p52 und deren Cofaktor RelB als Heterodimer in den Kern translozieren und dort als Transkriptionsfaktor wirken (Zhang et al. 2015; Fusco et al. 2008).

#### **1.4 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Buchholz**

In einer vorangegangenen Arbeit der AG Buchholz (Klinik für Gastroenterologie, Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Marburg) wurde in einem Screening unter Zuhilfenahme einer shRNA-Bibliothek nach Genen gesucht, deren Expressionsprodukte sich potenziell zur zielgerichteten Krebstherapie eignen. Für dieses Screening, welches in Kooperation mit der

AG Hoheisel, Abteilung „Functional Genome Analysis“, am DKFZ Heidelberg durchgeführt wurde, wurde die „*Decipher shRNA-Library*“ von Collecta verwendet. Diese mit einem Barcode markierte shRNA-Bibliothek enthielt mehrere verschiedene shRNAs für jedes Gen, um potenzielle funktionelle Effekte auf die spezifische Expressionshemmung des jeweiligen Gens zurückführen und somit off-target-Effekte so weit wie möglich ausschließen zu können. Zur Transduktion der BxPC3-Zellen mit der shRNA-Bibliothek wurden Lentiviren als Vektor verwendet. Um diejenigen Zellen herausfiltern zu können, die nicht erfolgreich transduziert wurden, wurde anschließend eine Selektion mittels des Nukleosid-Antibiotikums Puromycin durchgeführt. Im nächsten Schritt wurde eine Hochdurchsatzsequenzierung im Illumina HiSeq®-System durchgeführt, wodurch alle shRNAs identifiziert werden konnten, welche erfolgreich in die BxPC3-Zellen transduziert wurden. Als nächstes folgte ein Zeitraum von neun Tagen, in dem die Zellen kultiviert wurden. Im Anschluss an dieses Intervall wurde erneut eine Hochdurchsatzsequenzierung durchgeführt, um Differenzen bezüglich der stabil integrierten shRNAs im Vergleich zur ersten Sequenzierung feststellen zu können. Somit konnten letztlich Gene identifiziert werden, die für das Überleben der Zellen unerlässlich sind. Ein Gen bzw. dessen Expressionsprodukt wurden jedoch nur dann als potenzielles Ziel eingeordnet, wenn mindestens drei genspezifische shRNAs ein Absterben der Zelle bewirkt hatten. Aus der somit erhaltenen Liste an Genen, wurden nun diejenigen Gene herausgefiltert, deren codiertes Protein in seiner katalytischen Aktivität prinzipiell mit einem Inhibitor gehemmt werden kann. Eines dieser Gene war das in dieser Arbeit charakterisierte VCP. Für dessen codiertes Protein existieren zwar schon diverse Inhibitoren, allerdings wurden mit diesen bisher noch keine Versuche zur funktionellen Charakterisierung im Pankreaskarzinom durchgeführt.

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas stellt nach wie vor eine der Tumorentitäten dar, die aufgrund ihres aggressiven biologischen Verhaltens und ihres häufig späten Diagnosezeitpunktes eine äußerst ungünstige Prognose aufweist. Trotz intensiver Forschungsbemühungen in den letzten Jahrzehnten konnte die Prognose des duktales Adenokarzinoms des Pankreas kaum verbessert werden. Die einzig kurative Therapie stellt immer noch die R0-Resektion bei primär operablen Patienten dar.

Daher besteht die dringende Notwendigkeit, dass auch an Therapieformen geforscht wird, welche über die konventionellen onkologischen Therapieansätze, also Chemotherapie, Radiatio

und Chirurgie, hinausgehen. Eine Behandlungsform ist beispielsweise die sogenannte „Zielgerichtete Krebstherapie“ bzw. „*Targeted Therapy*“. Hierbei wird für die verschiedenen Tumorentitäten nach molekularen Zielstrukturen gesucht, welche beispielsweise an Prozessen wie Zellproliferation, Stoffwechselfvorgängen oder Angiogenese beteiligt sind und für die jeweilige Tumorart eine besonders wichtige Rolle spielen.

Um solche potenziellen Zielstrukturen identifizieren zu können, wurden in den letzten Jahren verschiedene Hochdurchsatzanalysen durchgeführt, unter anderem das unter Kapitel 1.4 erwähnte Screening mittels shRNA-Bibliothek der AG Buchholz. Letztlich konnte somit zwar eine Vielzahl potenzieller Kandidatengene ermittelt werden, einen Rückschluss auf die spezifische zelluläre Funktion des jeweiligen Genproduktes konnte man allerdings nicht ziehen.

Das Ziel dieser Arbeit war somit die funktionelle Charakterisierung von VCP in den Pankreaskarzinomzellen. Mittels funktioneller Assays sollten zunächst die Auswirkungen der Herunterregulierung von VCP auf die Proliferation sowie auf die Viabilität der Zellen untersucht werden. Im nächsten Schritt sollten mithilfe von proteinanalytischen Methoden erste Erkenntnisse gewonnen werden, welche zellulären Mechanismen durch die Repression von VCP beeinflusst werden. Das Hauptaugenmerk sollte hierbei auf Proteine des Zellzyklus sowie auf Proteine, die an apoptotischen Prozessen beteiligt sind, gelegt werden.

## 2 Material

### 2.1 Arbeits- und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Amersham Protran Nitrocellulose Membran; 0,2 µm	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D)
Amersham Protran Nitrocellulose Membran; 0,45 µm	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, D)
Blotting Paper MN 218	Machery-Nagel GmbH (Düren, D)
Combitips advanced 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
DNA Low Binding Tubes 2 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Falcon 15 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Falcon 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Kosmetiktuch	Igefa (Ahrensfelde, D)
Latexhandschuhe, puderfrei	Semperit GmbH (Wien, A)
MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Applied Biosystems (Thermo Scientific (Massachusetts, USA))
Mikrotestplatte, 96-Well, F	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen Diamond D10 D200 D1000	Gilson (Middelston, USA)
Präzisionswischtücher	Kimtech Science (Reigate, UK)
Reagiergefäße, Polypropylen 0,5 ml 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)

2,0 ml 2,0 ml ohne Stopfen	
Serologische Pipetten 2 ml 5 ml 10 ml 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
TC-Flasche T75, Standard	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, D)
Zählkammer Neubauer improved	PlanOptik (Elsoff, D)
Zellschaber Greiner Bio-One	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)

Tabelle 1: Arbeits- und Verbrauchsmaterial

## 2.2 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems (Thermo Scientific (Massachusetts, USA))
AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet International, Inc. (Edison, USA)
Autoklav 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V. (Breda, NL)
Chemocam Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen, D)
Einkanalpipetten Discovery Comfort DV 10C (0,5-10 µl) DV 20C (2-20 µl) DV 200C (20-200 µl) DV 1000C (100-1000 µl)	Abimed (Langenfeld, D)
Feinwaage BP 110 S	Sartorius AG (Göttingen, D)



Gefrierschrank	Liebherr (Bulle, CH)
Heracell 240i CO2 Inkubator	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Kühlschrank	Liebherr (Bulle, CH)
Lichtmikroskop	Olympus (Shinjuku, JPN)
Mikroplatten-Luminometer Centro LB960	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildach, D)
Mini Trans-Blot <sup>®</sup> Cell	BioRad Laboratories GmbH (München, D)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories GmbH (München, D)
Minizentrifuge Sprout	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)
Multipipette <sup>®</sup>	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Multiskan FC	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
NanoDrop 1000 Photospektrometer	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, D)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin, D)
Pipettboy Acu	Integra Biosciences (Zizers, CH)
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage 1.2	Thermoscientific (Massachusetts, USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Tiefkühlager Hera freeze	Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)
Vortexer Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments (Schwabach, D)
Vortexer VF2	IKA Labortechnik (Staufen, D)
Wippschüttler PMR-30	Grant Instruments (Royston, GB)
Zentrifuge Heraceus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Zentrifuge Heraceus Pico 17	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)

*Tabelle 2: Laborgeräte*

### 2.3 Puffer und Lösungen

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert
10% APS	1 g Ammoniumpersulfat 10 ml Aqua destillata	-
Blocklösung (5%)	2 g Milchpulver 40 ml TBST	-
10x Blottingpuffer	250 nM Tris Base 1,92 M Glycin mit Aqua destillata auf einen Liter auffüllen	8,3
1x Blottingpuffer	10% 10x Blottingpuffer 20% Methanol absolut in Aqua destillata	8,3
10x Laufpuffer	250 nM Tris Base 1,92 M Glycin 1% SDS mit Aqua destillata auffüllen	8,3
1x Laufpuffer	10% 10x Laufpuffer in Aqua destillata	8,3
1x Lysepuffer	50 mM HEPES (1M, pH 7,5) 150 mM NaCl 1mM EGTA 10% Glycerin 1% Triton-X-100 100 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	
MTT-Reagenz	5 mg Thiazolylblau 1 ml PBS	-
MTT-Solubilisations-Puffer	8 ml 2-Propanolol	-

	1 ml Triton-X-100 1 ml HCl (1M)	
Sammelgellösung	25 ml Sammelgellpuffer 59 ml Aqua destillata 16 ml Acrylamidlösung (30%)	
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris Base 0,4% SDS mit Aqua destillata auf 100 ml auffüllen	6,8
4x SDS Probenpuffer	253 nM Tris HCl 0,05% Bromphenolblau 40% Glycerol 2% SDS mit Aqua destillata auf 50 ml auffüllen	6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base 0,4% SDS mit Aqua destillata auf 100 ml auffüllen	8,8
10x Tris-gepufferte Natrium-Chloridlösung (TBS)	24,2 g Tris Base 80g NaCl 15 ml HCL (37%) Mit Aqua destillata auf 1l auffüllen	7,6
1x Tris-gepufferte Natrium-Chloridlösung mit Tween20 (TBST)	10% 10x TBS 0,1% Tween20 mit Aqua destillata auf 1l auffüllen	7,6
1x Trypsin	450 ml PBS 50 ml 10x Trypsin-EDTA	-

*Tabelle 3: Puffer und Lösungen*

## 2.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Propanolol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acrylamid: Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun (Melsungen, D)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis (Heidelberg, D)
EGTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Ethanol absolute	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Glycerin	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Glycerol	Arcos Organics (Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
HEPES	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
iTaq Universal SYBR®Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH (Californien, USA)
Kälberserumalbumin (FBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Lipofectamin RNAiMax	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Methanol ≥ 99,8 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))

Milchpulver	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
PageRuler™ prestained protein ladder	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Ponceau S Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Protease Arrest™	G-Biosciences (St. Louis, USA)
Salzsäure 1 M	Fischer Scientific (Thermo Scientific (Massachusetts, USA))
Salzsäure rauchend 37% (HCl)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Tetranatriumpyrophosphatdecahydrat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Thiazolylblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Trinatriumtetraoxovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Triton-X-100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Tween® 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH (Merck KGaA (Darmstadt, D))

Tabelle 4: Chemikalien

## 2.5 Kit-Systeme

Kit-System	Verwendungszweck	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (chemiluminiscent)	BrdU-Proliferationsassay	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Clarity™ Western ECL Substrate	Western Blotentwicklung	BioRad Laboratories GmbH (München, D)
Omniscript RT Kit	cDNA-Synthese	Quiagen (Hilden, D)
peqGold Total RNA Kit	RNA Isolierung	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen, D)
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay	Proteinbestimmung	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)

Tabelle 5: Kit-Systeme

## 2.6 Zellkultur

### 2.6.1 Zelllinien

Zelllinie	Abstammung	Referenz
PaTu-8988t	Lebermetastase eines humanen Pankreaskarzinoms	(Elsässer et al. 1992)
SUIT2-007	Lebermetastase eines humanen Pankreaskarzinoms	(Iwamura et al. 1987)
BxPC3	Humanes Pankreaskarzinom	(Tan et al. 1986)

Tabelle 6: Zelllinien

## 2.6.2 Nährmedien und Kultivierungszubehör

Nährmedium/Kultivierungszubehör	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low Glucose, Pyruvate	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (PBS)	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Fötales Bovines Serum (FBS)	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Trypsin-EDTA (0,25%)	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPMI Medium 1640	GIBCO, Life Technologies (Carlsbad, USA)

Tabelle 7: Nährmedien und Kultivierungszubehör

## 2.7 Oligonukleotide

### 2.7.1 Primer zur cDNA-Synthese

Name	Sequenz	Hersteller
Oligo dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)

Tabelle 8: Primer zur cDNA-Synthese

### 2.7.2 Primer zur qRT-PCR

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Hersteller
ARHGAP10	5'-CCAGAGAAGAGTTGGA-3'	5'-CTCCTAAGTTTCATCA-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
CAPZB	5'-GTGCACTCGTCTTAGA-3'	5'-CGGTCAATGAGCTGTT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
CDON	5'-TTAACCGAGCACATGT-3'	5'-GTCAGACAAGTATTTT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
DECR2	5'-TCGCATCCTTCTAAGC-3'	5'-CAGGCATTGCCAGATT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
DTL	5'-GGTCTGAAATAAGAGA-3'	5'-GGACTTCGTGGATTCT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
MRPS11	5'-ATCACAGACACAATCC-3'	5'-GGCTTGAGGTCCAAGT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)

RAE1	5'-CTGGCCTTGCCAGATT-3'	5'-ACCCACTTGGTTAGGA-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
RPLP0	5'-TGGGCAAGAAATGATG-3'	5'-AGTTTCTCCAGGTTGT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
PFAS	5'-TCTCAGCGGAAATCTG-3'	5'-TCTGAACCACTTTCCT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
PHB	5'-TCCCTACCAACCAAGT-3'	5'-GCGTGCTGCCAAATGCT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
STK3	5'-ACAAGGAATCAGTTGT-3'	5'-CTGTCACATTTATGGA-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
TRIP13	5'-TCACAGCCCATTGAGT-3'	5'-TTTCTGTCTCATTTTC-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)
VCP	5'-CTGCTTCTTTGGAACA-3'	5'-AGGAGAGGAACAATCT-3'	Biomers GmbH (Ulm, D)

Tabelle 9: Primer zur qRT-PCR

### 2.7.3 „Non silencing“-siRNA

Name	Katalognummer	Hersteller
Silencer <sup>®</sup> Negative Control #2 siRNA	AM4637	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)

Tabelle 10: "Non silencing"-siRNA

### 2.7.4 Spezifische siRNAs

Name	siRNA ID	Hersteller
VCP-siRNA1	119275	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
VCP-siRNA2	119277	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
VCP-siRNA3	191743	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)

Tabelle 11: Spezifische siRNAs



## 2.8 Rezept für Polyacrylamidgele

### 2.8.1 Rezept für Trenngele

	10% Gel	12% Gel	15% Gel
<b>Aqua destillata</b>	4,4 ml	3,6 ml	2,4 ml
<b>Trenngelpuffer</b> <b>Protokoll (siehe Kapitel 2.3)</b>	3 ml	3 ml	3 ml
<b>Acrylamid-Lösung (30%)</b>	4 ml	4,8 ml	6 ml
<b>Glycerol</b>	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
<b>APS 10%</b>	20 µl	20 µl	20 µl
<b>TEMED</b>	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 12: Rezept für Trenngele

### 2.8.2 Rezept für Sammelgele

<b>Sammelgel</b>	
Sammelgellösung	4 ml
APS 10%	10 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 13: Rezept für Sammelgele

### 2.8.3 Rezept für Stoppagele

<b>Stoppgel</b>	
Trenngellösung	500 µl
APS 10 %	2,5 µl
TEMED	2,5 µl

Tabelle 14: Rezept für Stoppagele

## 2.9 Antikörper

Name	Gewinnungstier	Verdünnung	Hersteller
anti-Caspase-3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
anti-Cyclin A	Kaninchen	1:1.000	Santa Cruz (Dallas, USA)
anti-Cyclin D1	Kaninchen	1:500	Abcam (Cambridge, UK)
anti-p21 Waf1/Cip1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
anti-p27	Kaninchen	1:500	Santa Cruz (Dallas, USA)
anti-PARP	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
anti- $\beta$ -Actin HRP-gekoppelt	Maus	1:10.000	Sigma-Aldrich GmbH (St. Louis, USA)
anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Ziege	1:10.000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

*Tabelle 15: Antikörper*

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien**

Die Zelllinien PaTu-8988t und SUI2-007 wurden mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) versetzt wurde, kultiviert. Für die Zelllinie BxPC3 wurde RPMI-1640 als Medium verwendet, welches ebenfalls mit 10 % FBS versetzt wurde. Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator gelagert, wobei täglich sowohl die Morphologie der Zellen als auch die Dichte ihres Wachstums kontrolliert wurde.

Um eine kontinuierliche Proliferation der Zellen gewährleisten zu können, wurden die Zelllinien PaTu-8988t und SUI2-007 zweimal wöchentlich, die Zelllinie BxPC3 einmal wöchentlich passagiert, was bei einer Konfluenz von ungefähr 75 % der Fall war. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin versetzt und je nach Zelllinie 3 bis 5 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurde frisches Medium hinzugegeben, um die Reaktion des Trypsins zu stoppen. Abhängig von der Verdopplungszeit der Zelllinie wurden nun Verdünnungen zwischen 1:3 und 1:15 hergestellt und in neue Kulturflaschen mit frischem Medium überführt.

#### **3.1.2 Zellzählung und Aussäen von Zellen**

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dabei wurden die Zellen zunächst resuspendiert und anschließend zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert, wo sie sich gleichmäßig verteilten. Dies geschieht durch Kapillarkräfte, welche sich bei korrekter Auflage des Deckglases bilden. Anschließend wurden jeweils die Zellen in den vier Eckquadranten gezählt und danach deren arithmetischer Mittelwert gebildet. Da jedes dieser vier Eckquadrate ein Volumen von 0,1 µl hatte, musste man den erhaltenen Mittelwert noch mit dem Faktor  $1 \times 10^4$  multiplizieren, um die Zellzahl pro 1 ml Zellsuspension zu ermitteln.

### **3.1.3 Kryokonservierung**

Sollten Zellen für einen unbestimmten Zeitraum aufbewahrt werden, so wurden diese in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde für etwa 3 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt. Als Gefrierschutzmittel für das erhaltene Zellpellet wurden 2 ml einer 10 % DMSO-Lösung (10 % DMSO in FBS) verwendet. Das Zellpellet wurde über Nacht bei -80°C in einem Propanolol-haltigen Kryo-Container eingefroren, wodurch eine langsame und gleichmäßige Abkühlung gewährleistet wurde. Am nächsten Tag konnten die Zellen dann zur länger andauernden Lagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Sollten die Zellen wieder in Kultur genommen werden, so wurden diese bei 37°C aufgetaut, um anschließend in eine Kulturflasche mit etwa 15 ml frischen Mediums pipettiert zu werden. Wenn sich die lebenden Zellen angeheftet hatten, wurde das Medium gewechselt, was in der Regel etwa 24 h später der Fall war.

### **3.1.4 Transfektion mittels siRNA**

Grundlage aller Versuche, die darauf abzielten, die Relevanz und Funktion von VCP in den Karzinomzellen zu untersuchen, war die Transfektion der Zellen mit siRNA. Diese bindet im Sinne einer RNA-Interferenz nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die dazugehörige mRNA und bewirkt somit ein Gen-Silencing.

Hierzu wurden 24 h vor der Transfektion je nach geplantem Versuch die Zellen entweder in 6-Well- oder 96-Well-Platten ausgesät. In jedem Versuch wurden drei verschiedene siRNAs zur spezifischen Herunterregulierung von VCP verwendet. Diese unterschieden sich jeweils in ihren abweichenden Basensequenzen. Des Weiteren wurde eine Zellpopulation mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert, um etwaige Effekte auf die Zellen nicht der Transfektion an sich, sondern den spezifischen siRNAs zurechnen zu können. Eine Zellpopulation blieb gänzlich unbehandelt, sodass pro Versuch insgesamt fünf verschiedene Ansätze existierten. In den durchgeführten Versuchen wurden die transfizierten Zellen jeweils für etwa 20 h mit 10 nM siRNA bei 37°C inkubiert. Das Transfektionsprotokoll soll nun im Folgenden anhand eines Wells einer 6-Loch-Platte erläutert werden. Dabei wurden zunächst sowohl die jeweilige siRNA als auch das Transfektionsreagens RNAiMax in extra dafür hergestellten Transfektions-Tubes nach dem Schema in Tabelle 16 verdünnt.

Tube 1	Tube 2
1,15 µl siRNA	1 µl RNAiMax (PaTu- 8988t, BxPC3) 2 µl RNAiMax (SUIT2-007)
150 µl Medium Ø FBS	150 µl Medium Ø FBS

Tabelle 16: Transfektionsansatz

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die beiden Transfektionsansätze durch Pipettieren vermischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium aus dem Well der 6-Loch-Platte abgesaugt und 2 ml Vollmedium vorgelegt, um mit den 300 µl Transfektionsgemisch letztlich eine siRNA-Konzentration von 10 nM zu erreichen. Nun wurden die transfizierten Zellen für etwa 20 h inkubiert und anschließend das Medium gewechselt, um das Transfektionsgemisch von den Zellen zu entfernen.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Isolation von RNA

Um auf der Basis von cDNA eine quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) durchführen zu können, musste aus den Zellen zunächst RNA isoliert werden. Hierzu wurde das „peqGOLD Total RNA Kit“ der Firma „Peqlab Biotechnologies“ verwendet.

Zunächst wurde in jedes Well einer 6-Loch-Platte der im Kit vorhandene Lysepuffer pipettiert, um die Zellen aufzulösen. Anschließend wurde das Lysat auf eine *DNA Removing Column* gegeben und 1 min lang bei 12.000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Durchfluss mit gleichem Volumen 70%igem Ethanol vermischt und das Gemisch auf eine *PefectBind RNA Column* gegeben, welches 1 min lang bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Bei dieser Zentrifugation kann nun RNA ab einer Länge von 200 Nukleotiden an die Silikonmembran binden, welche sich am Boden der Säule befindet. Als nächstes schlossen sich zwei Waschschrte mit 500 µl *RNA Wash Buffer I* und 600 µl *RNA Wash Buffer II* an. Nach jedem Waschschrte wurde die Säule jeweils 15 sec lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach erneuter zweiminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm, wurde 30 µl RNase-freies Wasser auf den Boden der Säule pipettiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneuter einminütiger Zentrifugation bei 5.000 rpm, erhielt man im Durchfluss die gereinigte RNA.

Abschließend konnte nun mittels des *NanoDrop 1000 Photospektrometer* die Konzentration der isolierten RNA bestimmt werden und diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden, sofern sie nicht unmittelbar für weitere Versuche benötigt wurde.

### 3.2.2 Synthese von cDNA

Mithilfe des „Omniscrypt Reverse Transcription Kit“ war es nun möglich aus der gewonnenen RNA cDNA zu synthetisieren. Hierzu benötigte man pro Ansatz 1  $\mu\text{g}$  der jeweiligen RNA. Je nach daraus resultierendem Volumen wurde zur RNA noch RNase-freies Wasser gegeben, sodass sich ein Probevolumen von 14,1  $\mu\text{l}$  ergab. Dieses wurde anschließend mit 5,9  $\mu\text{l}$  eines Mastermix vermischt, welcher sich wie folgt zusammensetzte:

Mastermix	Volumen
Aqua destillata	1 $\mu\text{l}$
Reverse Transkriptase	0,5 $\mu\text{l}$
dNTP's Mix (5 mM)	2 $\mu\text{l}$
Puffer 10x	2 $\mu\text{l}$
Oligo-dT Primer (100 $\mu\text{M}$ )	0,4 $\mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>5,9 <math>\mu\text{l}</math></b>

Tabelle 17: Mastermix cDNA-Synthese

Somit ergab sich am Ende für jeden Ansatz ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ , welches sich aus 14,1  $\mu\text{l}$  RNA und RNase-freiem Wasser sowie 5,9  $\mu\text{l}$  Mastermix zusammensetzte.

Dieser Reaktionsansatz wurde nun 1 h lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Wenn die dadurch erhaltene cDNA nicht direkt verwendet wurde, so wurde diese bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Mittels quantitativer RealTime-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) konnte die Expression der zu untersuchenden Gene in den zuvor erhaltenen cDNA-Proben quantitativ untersucht werden. Verglichen mit dem Ablauf einer herkömmlichen PCR wird bei der qRT-PCR nach jedem Amplifikationszyklus die Menge der neu synthetisierten Nukleinsäuren in Echtzeit bestimmt, woher sich auch der Name des Verfahrens ableitet. Hierzu wurde der in

doppelsträngige DNA interkalierende, fluoreszierende Farbstoff SYBR Green verwendet. Dieser war Bestandteil des „SYBR® Green PCR Mastermix“ der Firma Applied Biosystems™.

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Mastermix	Volumen
SYBR® Green	10 µl
Primer forward (10 pmol)	0,2 µl
Primer reverse (10 pmol)	0,2 µl
Aqua destillata	8,6 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>19 µl</b>

*Tabelle 18: Mastermix qRT-PCR*

Zur Vorbereitung der qRT-PCR wurde eine 96-Well-Platte (MicroAmp® 96-Well Reaction Plate für qRT-PCR, Applied Biosystems™) auf Eis gestellt und in jedes Well jeweils 19 µl Mastermix und 1 µl 1:10 verdünnte cDNA pipettiert, sodass pro Well ein Endvolumen von 20 µl vorlag. Bei jeder durchgeführten PCR wurde eine Doppelbestimmung jeder cDNA-Probe vorgenommen. Um später bei der Auswertung potenzielle Verunreinigungen detektieren zu können, wurde anstelle der cDNA 1 µl des für die cDNA-Synthese und die Herstellung des Mastermix verwendeten Wassers pipettiert. Wurde in der so konzipierten Negativkontrolle später ein ansteigendes Fluoreszenzsignal gemessen, so galt die Probe als verunreinigt und die Ergebnisse wurden verworfen. Abschließend wurde die Platte mit einer Plastikfolie abgedichtet und die Platte für etwa 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert, damit die Probe definitiv mit dem Mastermix vermischt ist.

Um die Expression der zu untersuchenden Gene relativieren zu können, wurde stets die Expression des ribosomalen Proteins RPLP0 ermittelt, welches als Haushaltsgen nur in geringem Maße reguliert und in allen Pankreaszellen konstitutiv exprimiert wird. Somit konnte für jede Probe das Expressionsverhältnis zwischen Haushaltsgen und Zielgen bestimmt und somit eine relative Quantifizierung erhalten werden. Mithilfe dieser Methodik konnten in der Auswertung die Ergebnisse verschiedener voneinander unabhängiger Versuche verglichen werden.

### **3.3 Proteinanalytische Methoden**

#### **3.3.1 Proteinextraktion**

Um Proteine aus den Zellen extrahieren zu können, wurden diese zunächst 48 h nach siRNA-Transfektion mittels Zellschaber vom Boden der 6-Loch-Platten abgelöst. Anschließend

wurden die Zellen mitsamt dem Medium in ein Falcon überführt und 5 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das erhaltene Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und die Suspension danach in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese wurde nun wieder 5 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde erneut verworfen. Anschließend wurden 200 µl Lysepuffer (Rezept siehe 2.3) und 2 µl Proteasearrest auf das Zellpellet pipettiert und danach 20 min lang auf Eis inkubiert, wobei die Suspension etwa alle 5 min kurz gevortext wurde. Nach Ablauf der zwanzigminütigen Inkubationszeit wurde die Suspension 1 min lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Somit erhielt man somit erneut ein Pellet, welches aus Zellentrümmern besteht. Der erhaltene Überstand war nun das gewünschte Zelllysat.

### **3.3.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford**

Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurden jeweils 2 µl des zu untersuchenden Proteinlysats und 200 µl des Farbstoffs Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent in ein Well einer 96-Loch-Platte pipettiert. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur bildete der Farbstoff mit den im Lysat enthaltenen Proteinen einen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Dieser zeigte bei zunehmender Proteinkonzentration eine intensivere Blaufärbung. Da neben den Proteinen aber auch der als Lösungsmittel dienende Lysepuffer einen Farbumschlag bewirkt, musste bei jeder Proteinbestimmung eine Eichgerade erstellt werden. Um diese Eichgerade zu erhalten, wurden in den ersten beiden Reihen der 96-Loch-Platte jeweils 200 µl des Coomassie-Farbstoffs und 2 µl Lysepuffer pro Well vorgelegt. Anschließend wurden in Doppelbestimmung bestimmte Mengen (1, 2, 3, 4 und 5 µg) an BSA hinzupipettiert. Die ersten beiden Wells beinhalteten jedoch lediglich die Coomassie-Lösung, um dem Photometer später als Leerwert zu dienen. Dann erfolgte mithilfe des Multiskan FC Photometer beim oben erwähnten Absorptionsmaximum von 595 nm die Messung. Abschließend konnte mittels der Funktion für die erhaltene Eichgerade die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate berechnet werden.

### **3.3.3 SDS-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung der extrahierten Proteine nach ihrer Größe wurde die SDS-PAGE-Methode (Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) verwendet. Bei diesem



Verfahren wandern die Proteine größenabhängig mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein Polyacrylamidgel, an welches eine elektrische Spannung angelegt ist.

Zur Vorbereitung dieser Methode mussten allerdings zunächst die räumliche Struktur der Proteine aufgebrochen und deren Eigenladung maskiert werden. Hierzu wurden jeweils 50 µl der Probe mit 7 µl DTT und 16 µl 4x-SDS-Probenpuffer versetzt. Abschließend wurde die Probe 5 min lang bei 95°C erhitzt, um somit die Quartärstruktur der enthaltenen Proteine aufbrechen zu können. Das DTT bewirkt eine Spaltung von etwaigen Disulfidbrücken. Diese beiden Schritte bewirken eine Linearisierung der Proteine, wodurch sich nun das SDS an diese anlagern kann und somit eine negative Ladung aller enthaltenen Proteine gewährleistet.

Abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine wurden für die Elektrophorese Gele mit 10 %, 12 % oder 15 % Acrylamidgehalt gegossen. Jedes der verwendeten Gele setzte sich aus einem Sammelgel, einem Trenngel und einem Stoppgel zusammen (Rezepte siehe 2.8). Letzteres war in wenigen Sekunden ausgehärtet und hatte die Funktion ein Auslaufen der anderen beiden Gele in die Vorrichtung zur Fixierung der Glasplatten zu verhindern. Als nächstes wurden 5 ml des Trenngels zwischen die Glasplatten pipettiert, welche mit etwa 2 ml des Sammelgels aufgefüllt wurden. In dieses wurde für die Zeit der Aushärtung ein Kamm gesteckt, sodass im Sammelgel Taschen entstehen, welche später zur Proteinbeladung genutzt werden konnten. Die Polymerisierung und somit Aushärtung der Gele dauerten etwa 45 min. Wenn sie nicht unmittelbar benötigt wurden, konnten sie mit Frischhaltefolie umhüllt bei 4°C gelagert werden. Bei Durchführung einer Elektrophorese wurden die Gele in die dafür vorgesehene Gelkammer eingebracht, welche mit 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Nun konnten die für die Proben vorgesehenen Taschen mit jeweils 10 bis 15 µg Proteinextrakt befüllt werden. Des Weiteren wurde bei jedem Versuch 5 µl eines PageRulers in eine Tasche pipettiert. Dieser wurde bei der anschließenden Elektrophorese der Größe nach farblich aufgetrennt und diente später als Marker bei der Detektion des zu untersuchenden Proteins.

Zunächst wurde so lange eine Spannung von 120 V angelegt, bis sich die Proben auf einer Linie am Übergang zwischen Sammelgel und Trenngel anordneten. Für die restliche Elektrophorese wurde nun eine Spannung von 200 V angelegt, wodurch die Proteine im Trenngel aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode wanderten. Sobald die Proben das Stoppgel erreicht haben, wurde die Spannungsquelle entfernt und die Gele aus ihrer Vorrichtung herausgenommen.

### **3.3.4 Western-Blot**

Ziel des Western-Blots ist es, dass die aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Hierzu wurde in den durchgeführten Versuchen das Tank-Blot-Verfahren verwendet. Der für den Transfer benötigte Schlitten enthielt in der Mitte sowohl das Gel als auch die Membran, wobei letztere später der Anode und das Gel der Kathode zugewandt sein sollte. Darüber hinaus grenzten zu beiden Seiten hin von innen nach außen jeweils ein Whatman-Filter und ein Schwamm. Nun wurde der Schlitten in die mit Blotting-Puffer (Rezept siehe 2.3) gefüllte Blotting-Kammer gespannt und an die gesamte Apparatur ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 300 mA angeschlossen. Um einen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran zu erhalten, wurden die Feldlinien senkrecht zum SDS-PAGE ausgerichtet. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins, erstreckte sich die Laufzeit auf etwa 30 bis 75 min, wobei größere Proteine eine längere Dauer benötigten.

### **3.3.5 Ponceau-S-Färbung der Membran**

Um einen erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran nachweisen zu können, wurde diese für 5 min mit dem Ponceau-S-Reagenz inkubiert. Dieses stellte die Proteine als rote Banden dar. Nach Einscannen der Ergebnisse wurde die Membran mittels TBST (Rezept siehe 2.3) wieder komplett vom Farbstoff gereinigt.

### **3.3.6 Immundetektion und Chemolumineszenz**

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, musste die Membran zunächst für 2 bis 4 h in einer Lösung von 5 % Milchpulver in TBST bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert werden. Als nächstes konnten 10 µl des entsprechenden Erstantikörpers, welcher spezifisch an das zu detektierende Protein bindet, zunächst in 10 ml 5% iger Milchpulverlösung verdünnt und anschließend auf die Membran pipettiert werden. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran viermal jeweils 10 min lang mit TBST gewaschen, um Antikörper, die nicht an das Protein gebunden hatten, zu entfernen. Nun konnte 1 µl des Zweitantikörpers, an welchen Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war, wiederum zunächst in 10 ml 5% iger Milchpulverlösung verdünnt und anschließend auf die Membran pipettiert werden. In allen durchgeführten Versuchen war der verwendete Zweitantikörper Anti-Kaninchen-IgG. Nachdem dieser Ansatz ebenfalls bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert worden war, wurde die Membran abermals viermal je 10 min lang mit TBST gewaschen. Als Substrat für

die Meerrettich-Peroxidase wurde je nach Bindungsstärke der hinzugefügten Antikörper entweder ECL-Plus oder ECL-Ultra auf die Membran pipettiert. Dieses wurde in einer biochemischen Reaktion unter der Emission von Licht umgesetzt, welches von der Chemocam detektiert wurde. Die Intensität der entstehenden Banden hängt davon ab, wie viele Bindungen zwischen Protein und Erstantikörper vorliegen, wobei hier wiederum die Menge des zu untersuchenden Proteins in der Probe der limitierende Faktor ist.

Abschließend wurde die Membran erneut viermal für 10 min mit TBST gewaschen, um einen HRP-gekoppelten  $\beta$ -Actin-Antikörper auf die Membran zu pipettieren. Nach zweistündiger Inkubation bei 4°C auf einem Kippschüttler, wurden die Membran wieder mit ECL beträufelt und die Banden für  $\beta$ -Actin mit der Chemocam sichtbar gemacht. Somit konnte überprüft werden, ob für jede Probe gleich viel Protein geladen wurde.

### **3.4 Viabilitätsassay MTT**

Mithilfe des MTT-Assays konnten Erkenntnisse über die Zellviabilität erlangt werden. Dieser Assay beruht auf dem Prinzip, dass das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch NADH-abhängige Reduktion in den wasserunlöslichen, blauen Farbstoff Formazan umgewandelt wird. Durchgeführt werden diese biochemischen Reaktionen von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums, welche das dazu benötigte NADH aus der Glykolyse der Zelle beziehen. Somit ist die Intensität des Farbumschlags abhängig vom Anteil Glykolyse durchführender Zellen und dient der indirekten Quantifizierung stoffwechselaktiver Zellen.

Abhängig von der zu untersuchenden Zelllinie wurden zunächst Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät, wobei dies für SUIT2-007 50.000, für PaTu-8988t 60.000 Zellen und für BxPC3 100.000 Zellen pro Well waren. Nachdem die siRNA-Transfektion nach beschriebenem Protokoll (siehe 3.1.4) durchgeführt worden war, wurde nach 72 h bzw. 96 h 80  $\mu$ l des MTT-Reagenz in jedes Well zum vorhandenen Vollmedium pipettiert. Nach 1 h Inkubationszeit bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und mittels 200  $\mu$ l Solubilization Solution (Rezept siehe Kapitel 2.3) das blaue Formazan gelöst. Anschließend wurden je Well 100  $\mu$ l der Farbstofflösung in eine 96-Loch-Platte pipettiert und diese dann mithilfe des Multiskan FC Photometers bei 595 nm gemessen. Lagen die gemessenen Werte über einem Wert von 1, so mussten die Lösungen gleichermaßen mit PBS verdünnt werden, um valide Messergebnisse zu erhalten. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden alle Messwerte auf den Wert der siRNA-Kontrolle normiert.

### 3.5 Proliferationsassay BrdU

Mithilfe des Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assays konnte die Proliferation der Zellen quantifiziert werden. Hierzu wurde das „Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)“-Kit der Firma Roche verwendet. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass Bromdesoxyuridin als Pyrimidinanalogon in neu synthetisierte DNA-Stränge eingebaut und später von Antikörpern detektiert wird, an welche eine Peroxidase gekoppelt ist. Diese katalysiert eine biochemische Reaktion, bei welcher Chemolumineszenz entsteht und detektiert werden kann.

Zu Beginn wurden für die Zelllinien SUIT2-007 und PaTu-8988t je 2.500 Zellen und für BxPC3 4.000 Zellen pro Well 96-Well-Platte ausgesät und 24 h später nach dem in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Protokoll transfiziert. Für jede Probe wurde sowohl eine Dreifachbestimmung durchgeführt als auch eine Hintergrundkontrolle angelegt. Somit wurden je Probe Zellen in vier Wells der 96-Loch-Platte ausgesät. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium zunächst aus allen Wells bis auf die der Hintergrundkontrollen abgesaugt und 100 µl *BrdU Labeling Solution*, 1:1.000 verdünntes *BrdU Labeling Reagent* in Vollmedium, in die Wells pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37 °C wurde das Medium der Hintergrundkontrollen abgesaugt und auch in diese Wells 100 µl *BrdU Labeling Solution* pipettiert. Direkt im Anschluss wurde die Lösung abgesaugt und in jedes Well 200 µl *Fix Denate* pipettiert, welches der Zellfixation und Zellyse diente. Dadurch konnten im nächsten Schritt die in der *Anti-BrdU-POD working solution* enthaltenen Antikörper an das in die DNA eingebaute BrdU binden. Für diese Lösung wurde *Anti-BrdU-POD* 1:100 in einer *Antibody dilution solution* verdünnt und dann je 100 µl in jedes Well pipettiert. Nach einstündiger Inkubationszeit wurde die Lösung abgekippt und die Zellen dreimal für 5 min lang mit je 200 µl *Washing solution*, welche 1:10 verdünntem *Washing buffer concentrate* in destilliertem Wasser entspricht, gewaschen. Nach Abkippen des Waschpuffers wurde die *Substrate solution*, die *Substrate component A* und *Substrate component B* im Verhältnis 100:1 enthielt, hergestellt. Nachdem dieser Ansatz 15 min lang lichtgeschützt auf einem Kippschüttler inkubiert worden war, wurden von diesem je 100 µl in jedes Well pipettiert. Nun wurde die Platte erneut lichtgeschützt auf einem Kippschüttler inkubiert und anschließend innerhalb von 10 min die entstehende Chemilumineszenz mithilfe des Luminometer Centro LB 960 quantitativ gemessen.

### **3.6            Statistische Auswertung**

Alle Experimente wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Durchgängen reproduziert. Für alle numerischen Ergebnisse wurden sowohl die arithmetischen Mittelwerte als auch die dazugehörigen Standardabweichungen berechnet. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde ein zweiseitiger, ungepaarter Student's t-test verwendet. Dabei wurde ein Wert von  $p < 0,05$  als signifikant (\*) und ein Wert von  $p < 0,01$  als hoch signifikant (\*\*) gewertet.

## **4           Abbildungs- und Tabellenverzeichnisse**

### **4.1           Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: VCP-Expression in verschiedenen humanen Gewebeproben des Pankreas. ....	35
Abbildung 2: Expressionslevel der VCP-mRNA normalisiert auf die Kontrollpopulation. ....	36
Abbildung 3: Regulation der Zellviabilität nach Repression von VCP in SUIT2-007-Zellen. ....	37
Abbildung 4: Regulation der Zellviabilität nach Repression von VCP in BxPC3-Zellen. ....	38
Abbildung 5: Regulation der Zellviabilität nach Repression von VCP in PaTu-8988t-Zellen. ....	38
Abbildung 6: Regulation der Zellproliferation nach Repression von VCP in SUIT2-007-Zellen. ....	40
Abbildung 7: Regulation der Zellproliferation nach Repression von VCP in PaTu-8988t-Zellen. ....	40
Abbildung 8: Regulation der Zellproliferation nach Repression von VCP in BxPC3-Zellen. ....	41
Abbildung 9: Expression von Cyclin D1, p21, PARP/Cleaved PARP sowie Caspase 3/ Cleaved Caspase 3 48 h nach Transfektion. ....	42

## 4.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeits- und Verbrauchsmaterial .....	10
Tabelle 2: Laborgeräte .....	11
Tabelle 3: Puffer und Lösungen .....	13
Tabelle 4: Chemikalien .....	15
Tabelle 5: Kit-Systeme.....	17
Tabelle 6: Zelllinien .....	17
Tabelle 7: Nährmedien und Kultivierungszubehör .....	18
Tabelle 8: Primer zur cDNA-Synthese .....	18
Tabelle 9: Primer zur qRT-PCR.....	18
Tabelle 10: "Non silencing"-siRNA.....	19
Tabelle 11: Spezifische siRNAs.....	19
Tabelle 12: Rezept für Trenngele.....	20
Tabelle 13: Rezept für Sammelgele .....	20
Tabelle 14: Rezept für Stoppagele.....	20
Tabelle 15: Antikörper .....	21
Tabelle 16: Transfektionsansatz .....	24
Tabelle 17: Mastermix cDNA-Synthese.....	25
Tabelle 18: Mastermix qRT-PCR .....	26

## 5 Ergebnisse

### 5.1 VCP-Expression in humanem Pankreasgewebe

Mithilfe von qRT-PCRs wurde zunächst die Expression von VCP in humanem Pankreasgewebe untersucht. Hierzu standen cDNA-Proben zur Verfügung, welche aus Biopsiematerial bzw. Operationspräparaten gewonnen wurden. In der folgenden Grafik sind die unterschiedlichen Expressionslevel in Karzinomgewebe, chronischer Pankreatitis und gesundem Spendergewebe dargestellt.

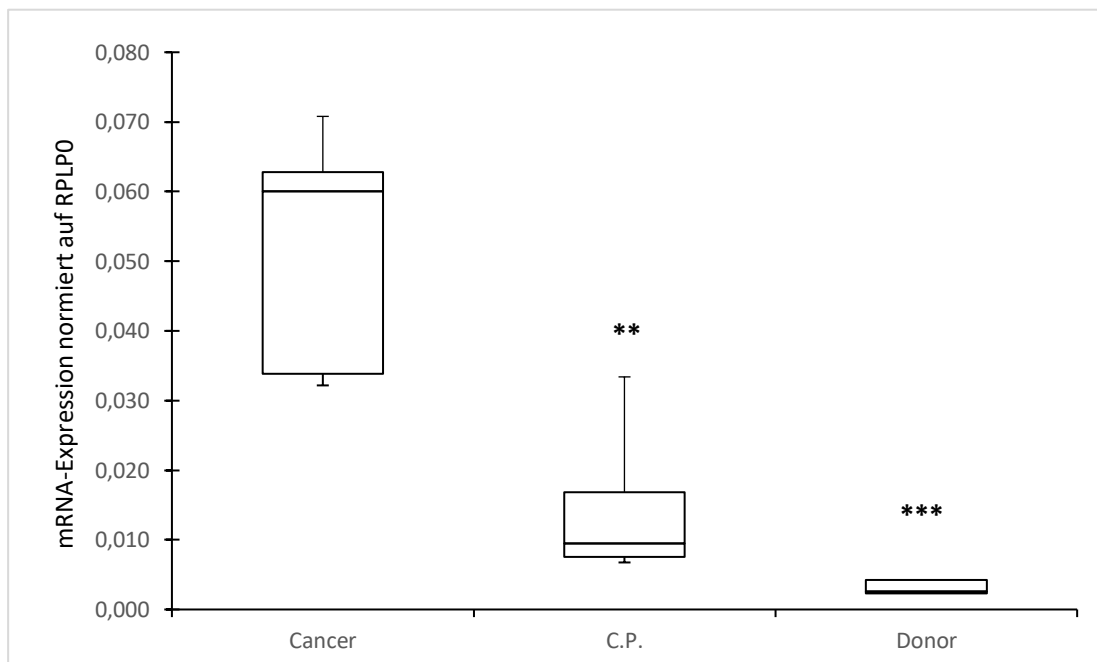


Abbildung 1: VCP-Expression in verschiedenen humanen Gewebeproben des Pankreas.

Dargestellt ist das Expressionslevel von VCP im Vergleich zum Haushaltsgen RPLPO in verschiedenen humanen Gewebeproben des Pankreas. Cancer = Duktales Adenokarzinom (n=5); C.P. = Chronische Pankreatitis (n=4); Donor = Gesundes Pankreasgewebe (n=4). Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Die Expression von VCP zeigte sich innerhalb dieser kleinen Stichprobe im Karzinomgewebe sowohl gegenüber der Expression in chronischer Pankreatitis als auch in gesundem Pankreasgewebe statistisch signifikant erhöht. Graphisch dargestellt sieht man dies im oben abgebildeten Boxplot-Diagramm, in welchem die jeweiligen mRNA-Expressionslevel normiert auf RPLPO dargestellt sind.



## 5.2 Knockdown-Effizienz

Um überprüfen zu können, ob durch die Transfektion mit den spezifischen siRNAs eine effiziente Herunterregulierung der VCP-Expression auf mRNA-Ebene möglich ist, wurden hierzu qRT-PCRs durchgeführt. Daher wurde für die Zelllinien SUIT2-007 sowie PaTu-8988t zunächst 48 h nach Transfektion eine RNA-Isolation mit anschließender reversen Transkription durchgeführt (siehe Kapitel 3.2), ehe die jeweiligen mRNA-Expressionslevel bestimmt werden konnten.

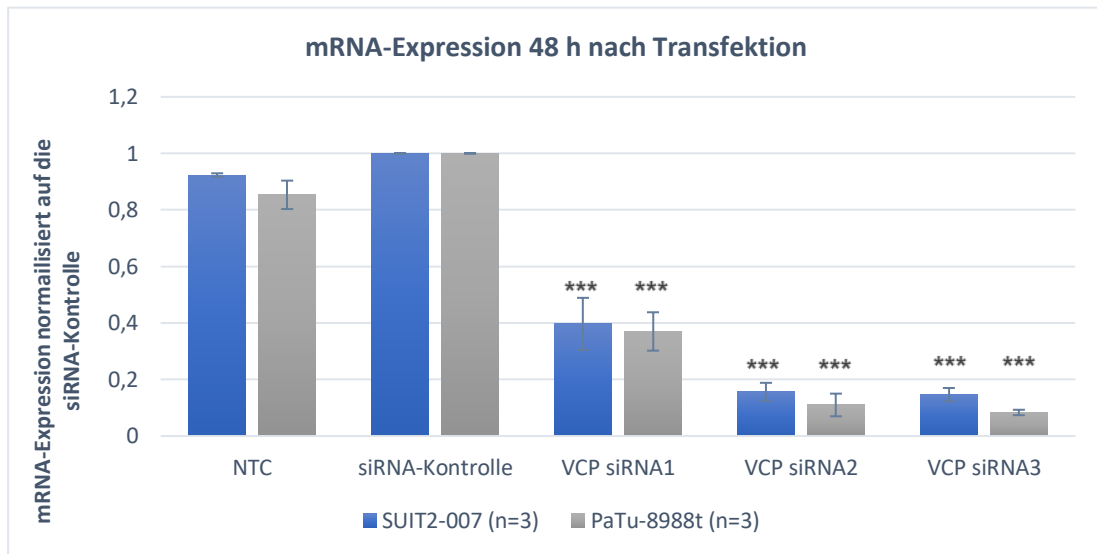


Abbildung 2: Expressionslevel der VCP-mRNA normalisiert auf die Kontrollpopulation.

NTC = unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. Die Expressionslevel wurden zur Veranschaulichung der Repressionseffekte auf siRNA-Kontrolle normiert. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (n=3). Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\*\*) =  $p < 0,001$ .

Es zeigten sich leicht erhöhte Expressionslevel der VCP-mRNA in denjenigen Zellen, die zuvor mit der unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Für beide Zelllinien zeigte sich eine Repression auf knapp unter 40 % in den mit siRNA1 behandelten Zellen bezogen auf die Kontrolle. Mittels siRNA2 und siRNA3 konnten sogar Expressionslevel erzielt werden, die unterhalb von 20 % bezogen auf die Kontrollpopulation lagen. Graphisch dargestellt sieht man dies in Abbildung 3, welche die Expressionslevel in Form eines Balkendiagramms darstellt.

## 5.3 Funktionelle Assays

### 5.3.1 MTT-Assay

Um überprüfen zu können, ob die Herunterregulierung der Genexpression von VCP auf mRNA-Ebene einen funktionellen Effekt auf die Zellen hat, wurden unter anderem MTT-Assays durchgeführt. Hierzu wurde für alle verwendeten Zelllinien zunächst 72 h nach der Transfektion die Zellviabilität nach dem in Abschnitt 3.4 beschriebenen Prozedere ermittelt. Für die Zelllinien SUIT2-007 und BxPC3 wurden zusätzlich MTT-Assays 96 h nach der Transfektion durchgeführt. Damit nach mehreren voneinander unabhängigen Versuchen deren Messwerte verglichen werden konnten, wurden diese jeweils auf den Messwert derjenigen Zellen normiert, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Nach Abschluss aller Messungen wurden jeweils noch die Mittelwerte, die Standardabweichungen sowie die statistische Signifikanz berechnet.

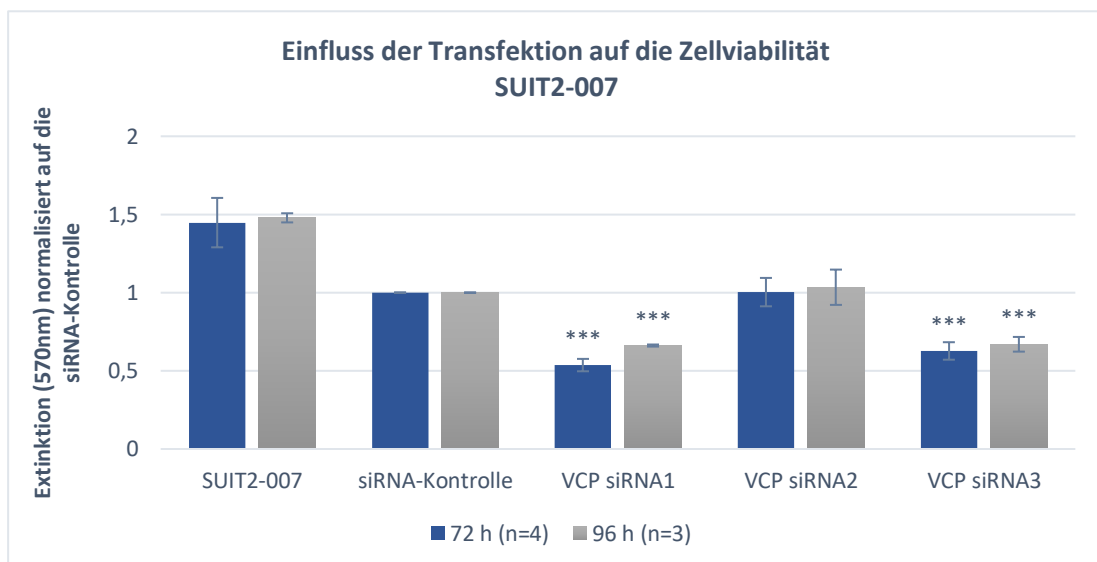


Abbildung 3: Regulation der Zellviabilität nach Repression von VCP in SUIT2-007-Zellen.

Dargestellt ist die Zellviabilität der einzelnen Populationen gemessen im MTT-Assay. SUIT2-007 = unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\*\*) =  $p < 0,001$ .

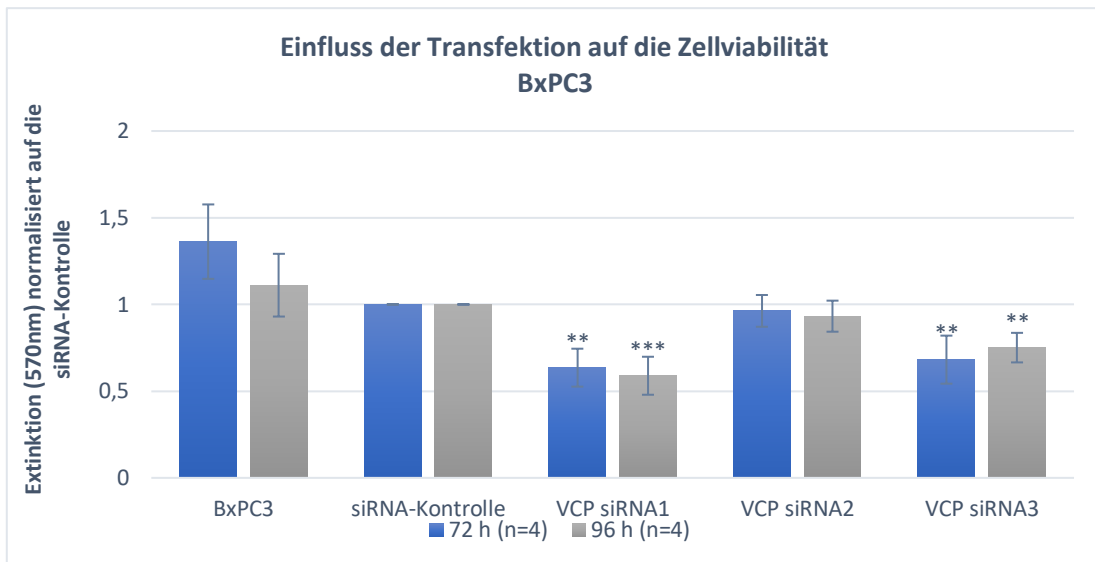


Abbildung 4: Regulation der Zellviabilität nach Repression von VCP in BxPC3-Zellen.

Dargestellt ist die Zellviabilität der einzelnen Populationen gemessen im MTT-Assay. BxPC3 = unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

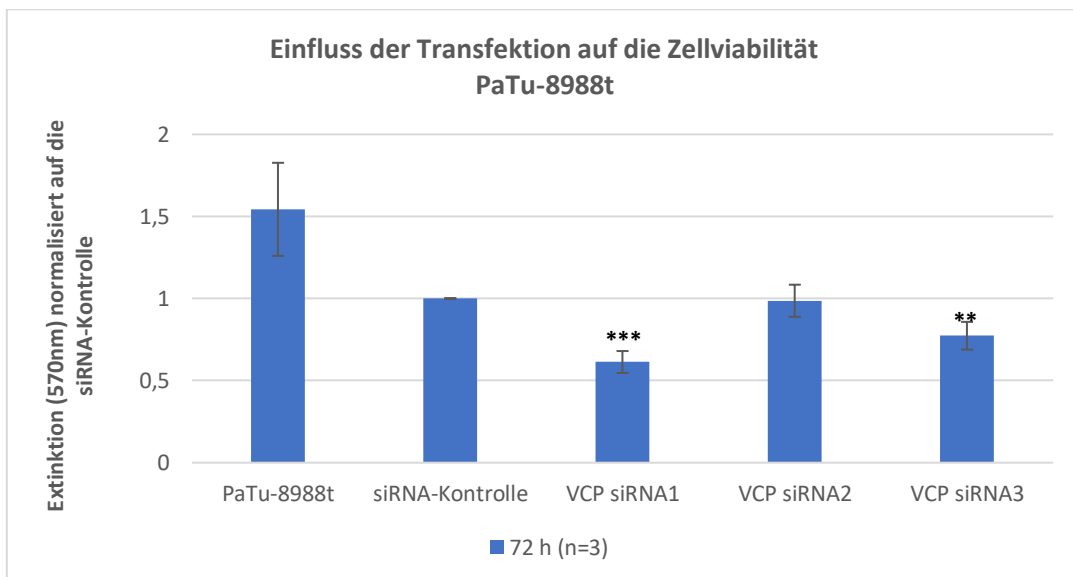


Abbildung 5: Regulation der Zellviabilität nach Repression von VCP in PaTu-8988t-Zellen.

Dargestellt ist die Zellviabilität der einzelnen Populationen gemessen im MTT-Assay. PaTu-8988t = unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Für alle verwendeten Zelllinien zeigt sich in den dargestellten Balkendiagrammen ein ähnliches Bild. Zunächst wurde der MTT-Assay jeweils explorativ nach 72 h durchgeführt,

wobei in allen Fällen die siRNA1 eine Reduktion der Zellviabilität auf etwa 55 – 65 % der Zellviabilität der Kontrollpopulation bewirkte. Die Transfektion der Zellen mit siRNA3 hatte einen um etwa 5 – 10 % schwächeren Effekt als die siRNA1, jedoch war dieser in allen Zelllinien statistisch signifikant. Die mit siRNA2 behandelten Zellen zeigten weder eine statistisch signifikante Reduktion noch eine Zunahme der Zellviabilität.

Zusätzlich wurden für die Zelllinien SUIT2-007 und BxPC3 MTT-Assays nach 96 h durchgeführt. Allerdings konnte hierdurch keine weitere Reduktion der Zellviabilität erzielt werden, weshalb für die Zelllinie PaTu-8988t auf die 96 h – Werte verzichtet wurde. Die mit siRNA 2 transfizierten Zellen zeigten auch nach 96 h weder eine Reduktion noch eine Zunahme der Zellviabilität.

### **5.3.2 BrdU-Assay**

Um überprüfen zu können, ob die Repression von VCP einen direkten Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat, wurden BrdU-Assays durchgeführt. Diese wurden je nach verwendeter Zelllinie nach 48 h oder auch zusätzlich noch nach 72 h nach dem in Abschnitt 3.5 erläuterten Prozedere durchgeführt. Entsprechend der Auswertung für die MTT-Assays wurden auch hier die Messwerte auf die der siRNA-Kontrolle normiert. Außerdem wurden ebenfalls die Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen gebildet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden abschließend noch auf statistische Signifikanz überprüft.

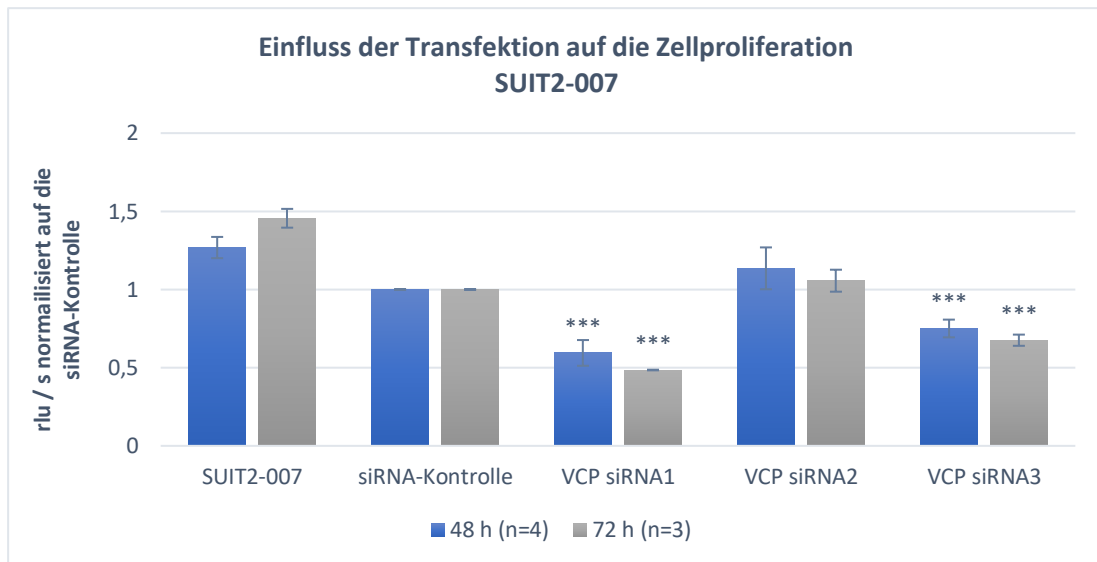


Abbildung 6: Regulation der Zellproliferation nach Repression von VCP in SUIT2-007-Zellen.

Dargestellt ist die Proliferation der Zellen, ausgedrückt durch die detektierte Chemilumineszenz der einzelnen Populationen im BrdU-Assay. SUIT2-007= unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. rlu / s = relative light units / second. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

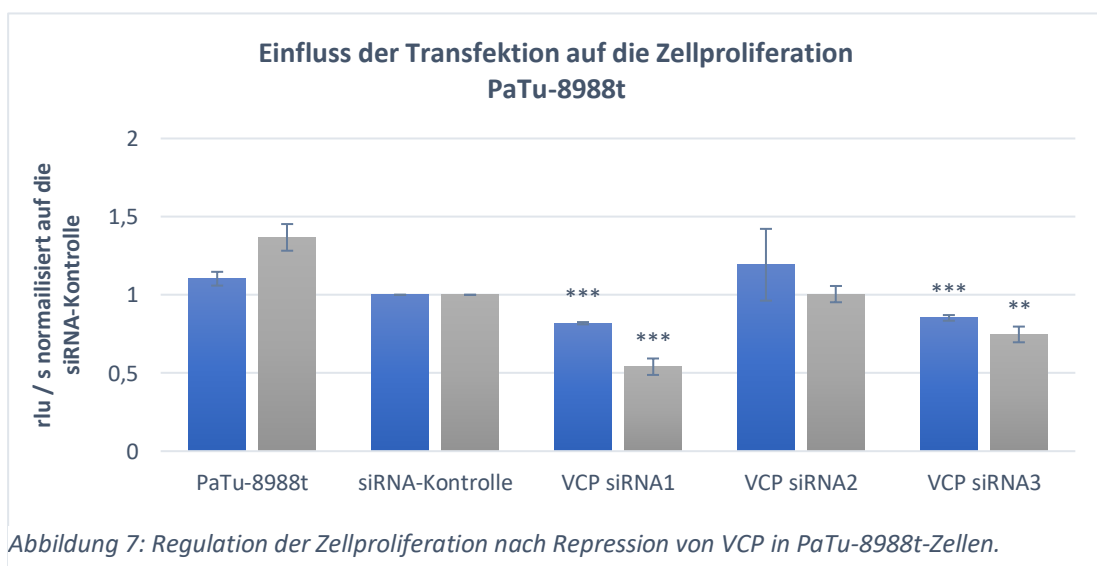


Abbildung 7: Regulation der Zellproliferation nach Repression von VCP in PaTu-8988t-Zellen.

Dargestellt ist die Proliferation der Zellen, ausgedrückt durch die detektierte Chemilumineszenz der einzelnen Populationen im BrdU-Assay. PaTu-8988t = unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. rlu / s = relative light units / second. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

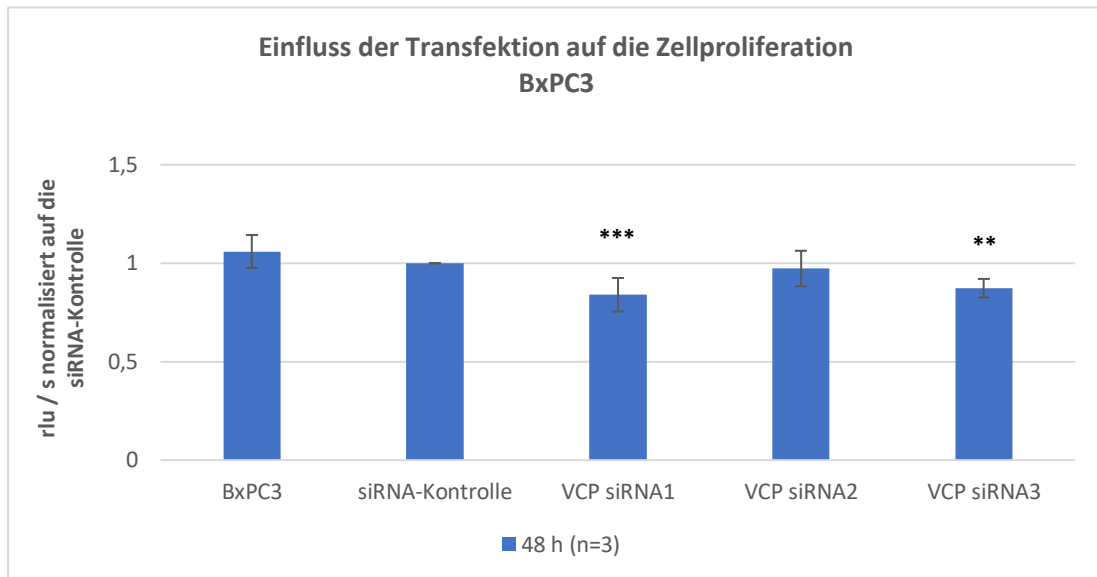


Abbildung 8: Regulation der Zellproliferation nach Repression von VCP in BxPC3-Zellen.

Dargestellt ist die Proliferation der Zellen, ausgedrückt durch die detektierte Chemilumineszenz der einzelnen Populationen im BrdU-Assay. PaTu-8988t = unbehandelte Zellen; siRNA-Kontrolle = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; VCP siRNA1, VCP siRNA2 und VCP siRNA3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. rlu / s = relative light units / second. Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student's t-test berechnet (\*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Zunächst wurden die BrdU-Assays für jede Zelllinie 48 h nach der Transfektion durchgeführt. Man kann in allen drei Zelllinien sehen, dass bereits die Transfektion mit der Kontroll-siRNA eine geringe Reduktion der Proliferation bewirkte. Vergleichbar mit den Ergebnissen der MTT-Assays konnte in allen Zelllinien lediglich für die mit si1 und si3 transfizierten Zellen eine Proliferationsminderung bezogen auf die Kontrollpopulation gemessen werden. Dabei konnten für die Zelllinie SUIT2-007 die stärksten Effekte detektiert werden. So bewirkte die si1 eine Proliferationsminderung auf 59 % und die si3 eine Proliferationsminderung auf 75 %. In den Zelllinien PaTu-8988t und BxPC3 bewirkten sowohl die si1 als auch die si3 Proliferationsminderungen auf etwa 80 - 85 %.

Explorativ wurden für die Zelllinien SUIT2-007 und PaTu-8988t auch noch BrdU-Assays nach 72 h durchgeführt. In beiden Fällen konnte hierbei noch eine leicht verstärkte Reduktion der Proliferation beobachtet werden. Auch hier zeigten sich für SUIT2-007 die stärksten Effekte. Die Proliferationsrate liegt bei den mit si1 transfizierten Zellen nur noch bei 48 %, bei den mit si3 transfizierten Zellen nur noch bei 68 %. Für PaTu-8988t zeigte sich für diese beiden siRNAs ein jeweils um etwa 6 % geringerer Effekt.

Die mit si2 behandelten Zellen zeigten in keiner der verwendeten Zelllinien statistisch signifikante Proliferationsminderungen bzw. Proliferationssteigerungen.

## 5.4 Western Blots

Um die Ergebnisse der funktionellen Assays und deren zugrunde liegenden zellulären Ursachen besser verstehen zu können, wurden Western Blots durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Repression von VCP einen Einfluss auf die Regulation verschiedener Proteine des Zellzyklus und der Apoptose hat. Da bereits nach 48 h eine statistisch signifikante Proliferationsminderung für zwei der verwendeten siRNAs nachgewiesen wurde, wurden auch die Proteine für den Western Blot nach 48 h extrahiert. Alle Western Blots wurden jeweils dreimal mithilfe von Proteinextrakten aus voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt. Im Folgenden wird pro Zelllinie und pro untersuchtem Protein jeweils ein repräsentativer Blot aufgeführt.

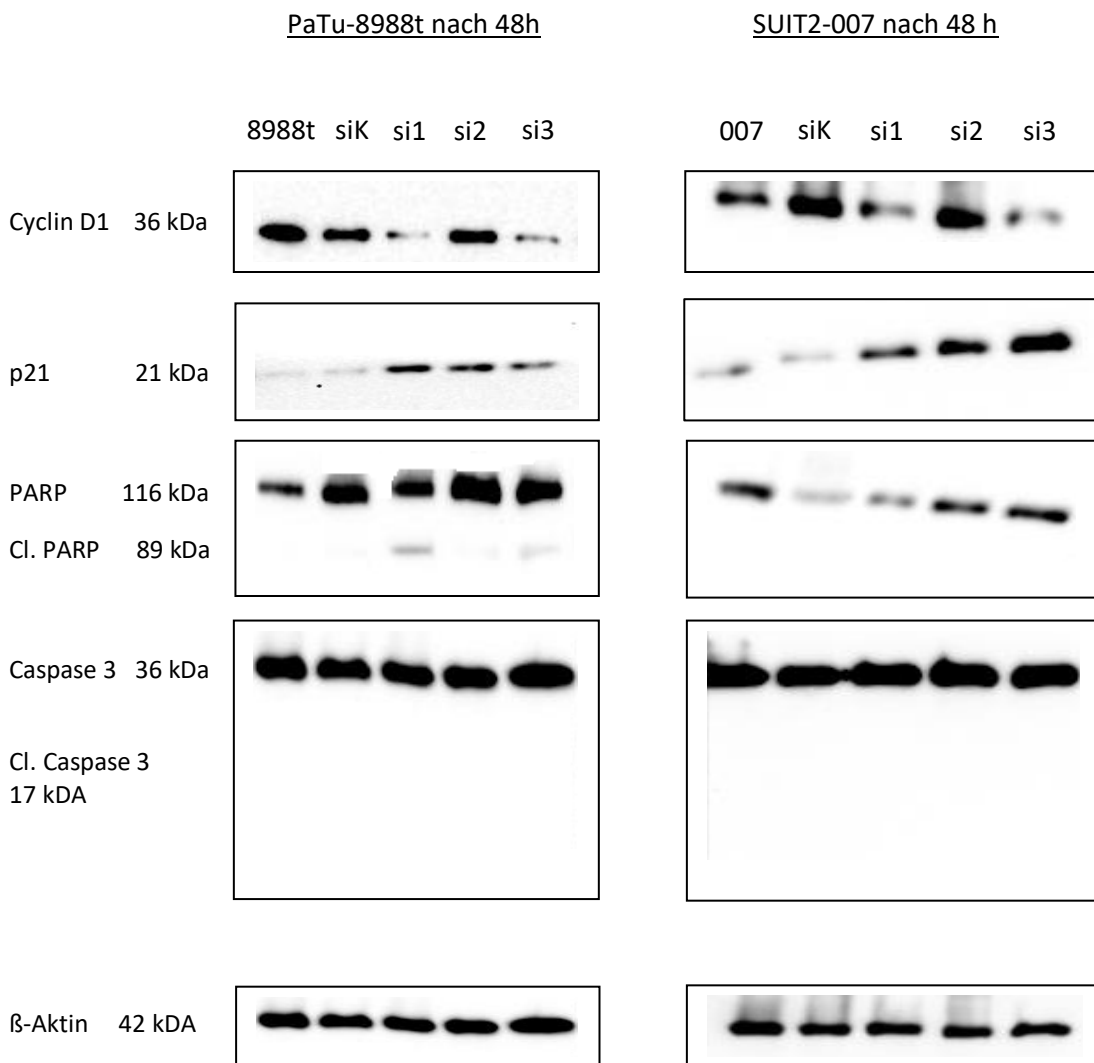


Abbildung 9: Expression von Cyclin D1, p21, PARP/Cleaved PARP sowie Caspase 3/ Cleaved Caspase 3 48 h nach Transfektion.

PaTu-8988t = unbehandelte Zellen; SUIT2-007 = unbehandelte Zellen; siK = mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen; si1, si2 und si3 = mit spezifischen siRNAs gegen VCP (si1, si2, si3) transfizierte Zellen. Cl. PARP = cleaved PARP, Cl. Caspase 3 = cleaved Caspase 3. Der  $\beta$ -Aktin-Blot diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung.

Für Cyclin D1 zeigte sich eine deutlich höhere Expression in den unbehandelten sowie in den mit siK und si2 transfizierten Zellen verglichen mit den mit si1 und si3 transfizierten Zellen. Wie man in den dargestellten Blots sehen kann, waren die Banden für si1 und si3 jeweils deutlich schwächer als die der Kontrollpopulation. Der Unterschied beider Zelllinien bestand lediglich darin, dass das Expressionsniveau für Cyclin D1 in der Zelllinie PaTu-8988t für die unbehandelten Zellen höher ist als in den mit siK und si2 transfizierten Zellen. In der Zelllinie SUIT2-007 fand man den gegensätzlichen Fall.

Des Weiteren wurden die Expressionslevel des CdK-Inhibitors p21 untersucht. Auch für p21 präsentierte sich in beiden Zelllinien ein ähnliches Ergebnis. Im Vergleich zur unbehandelten Population sowie zur Kontrollpopulation zeigte sich für die Populationen, die mit spezifischer siRNA gegen VCP behandelt wurden, eine deutlich stärkere Expression für p21. In der Zelllinie PaTu-8988t zeigt sich die stärkste Bande für die mit si1 behandelten Zellen, in der Zelllinie SUIT2-007 ist die stärkste Bande für die mit si3 behandelten Zellen sichtbar.

Um überprüfen zu können, ob apoptotische Vorgänge eine Ursache für die verminderte Zellviabilität spielen, wurden Western Blots durchgeführt, die die Expression von Proteinen der Apoptose-Kaskade bzw. deren Spaltprodukte nachweisen sollten.

Das Protein PARP-1, welches vor allem an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist, wird bei der Apoptose von der Protease Caspase 3 gespalten, sodass unter anderem ein Proteinfragment von 89 kDA entsteht. In der Zelllinie SUIT2-007 ließ sich für keine Zellpopulation gespaltenes PARP (cleaved PARP) nachweisen, womit sich also keine Hinweise auf apoptotische Vorgänge ergaben. In der Zelllinie PaTu-8988t zeigten sich für die mit si1 und si3 transfizierten Zellen sehr schwache Banden.

Zusätzlich wurde die Expression des bereits erwähnten Proteins Caspase 3 und dessen Spaltprodukts Cleaved Caspase 3 untersucht. Es konnten in beiden Zelllinien für alle Zellpopulationen relativ gleichmäßig intensive Banden gezeigt werden. Es zeigten sich weder in den unbehandelten noch in den transfizierten Zellen Banden für das Protein Cleaved Caspase 3.



## **6 Diskussion**

In einer vorangegangenen Arbeit der AG Buchholz konnte mittels des in Kapitel 1.4 beschriebenen shRNA-Screens das Gen VCP als potenzielle Zielstruktur in der Therapie des Pankreaskarzinoms ermittelt werden. In den zu Beginn der Arbeit untersuchten Proben aus humanem Pankreasgewebe zeigte sich VCP im Pankreaskarzinom sowohl im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe als auch im Vergleich zur chronischen Pankreatitis statistisch signifikant überexprimiert. Somit ergab sich der begründete Verdacht, dass dieses Gen bzw. dessen Genprodukt eine nicht unerhebliche Rolle in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms spielt. Ziel dieser Arbeit war es, mittels siRNA-Transfektion die Expression von VCP in drei verschiedenen humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien herunterzuregulieren und anschließend mithilfe funktioneller Assays einen potenziellen Einfluss auf die Zellviabilität und Zellproliferation zu untersuchen. Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, wurden dabei jeweils drei verschiedene siRNAs verwendet. Abschließend wurde mithilfe von Western Blots die Expression von verschiedenen Proteinen des Zellzyklus und Apoptosemarkern untersucht, um erste Einblicke in die Auswirkungen auf verschiedene Signalwege zu gewinnen.

### **6.1 Einordnung der gewonnenen Ergebnisse in die Literatur**

Wie bereits in Kapitel 5.1 dargelegt, konnte in dieser Arbeit eine statistisch signifikant erhöhte Expression von VCP im Pankreaskarzinom im Vergleich zur chronischen Pankreatitis und gesundem Pankreasgewebe für die untersuchten Gewebeproben nachgewiesen werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass sich sehr häufig auch in anderen Tumorentitäten eine deutlich erhöhte Expression von VCP zeigt. Beispiele hierfür sind unter anderem das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (Valle et al. 2011; Yamamoto et al. 2004a).

Ferner wurde für verschiedene Tumorentitäten eine negative Korrelation zwischen Überexpression von VCP in den Karzinomzellen und progressionsfreiem Überleben sowie Gesamtüberleben gezeigt, so z.B. für das duktales Adenokarzinom des Pankreas, das Mammakarzinom, das Magenkarzinom sowie das Prostatakarzinom (Cui et al. 2015; Yamamoto et al. 2003; Tsujimoto et al. 2004).

In Zusammenschau der oben genannten statistischen Zusammenhänge für unterschiedliche onkologische Krankheitsbilder liegt der Verdacht nahe, dass das Protein VCP eine

bedeutende Rolle in der Pathogenese verschiedener Karzinome spielt, darunter auch in der des duktales Adenokarzinoms des Pankreas.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit ein effizienter knockdown auf mRNA-Ebene mittels der drei verwendeten siRNAs sichergestellt werden konnte, wurden Effekte auf die Zellviabilität und Proliferation der Karzinomzellen nach Transfektion untersucht. Hierbei zeigte sich für alle drei verwendeten Zelllinien ein ähnliches Bild. Diejenigen Zellen, die mit siRNA1 bzw. siRNA3 transfiziert wurden, wiesen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen sowie zu den Zellen, die mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden, eine deutlich reduzierte Zellviabilität und Proliferation auf. Im Gegensatz dazu zeigten die mit siRNA2 transfizierten Zellen weder im MTT- noch im BrdU-Assay statistische signifikante Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auf mögliche Ursachen hierfür wird im Verlauf der Diskussion noch eingegangen.

Passend zu den für siRNA1 und siRNA3 ermittelten Ergebnissen sind die Erkenntnisse einer Veröffentlichung von Marin-Muller et al. Diese konnten mithilfe eines lentiviralen Vektors miRNA-198 in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien stabil überexprimieren. Diese hatte neben der Herunterregulierung verschiedener weiterer Proteine auch die von VCP zur Folge. Daraus resultierte, wie in der vorliegenden Arbeit, ein verringertes Zellwachstum. Weiterhin zeigte sich im Mausmodell ein verringertes Tumorwachstum, reduzierte Metastasierung und verlängertes Überleben (Marin-Muller et al. 2013). Die beschriebenen Effekte konnten dort jedoch nicht auf die selektive Herunterregulierung von VCP zurückgeführt werden.

Allerdings konnten beispielsweise Shah et al. für zwei verschiedene Zelllinien des Adenokarzinoms der Lunge nachweisen, dass die Transfektion mit siRNA gegen VCP eine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität bewirkt (Shah and Beverly 2015). Dies würde sich mit den Ergebnissen decken, die in der hier vorliegenden Arbeit für die siRNAs 1 und 3 erzielt wurden. Magnaghi et al. konnten in vergleichbaren Experimenten zeigen, dass die Herunterregulierung der VCP-Expression in HeLa-Zellen (Adenokarzinom der Cervix), U2OS-Zellen (Osteosarkom) und HCT116-Zellen (Adenokarzinom des Colons) mittels verschiedener siRNAs eine reduzierte Proliferation der Zellen zur Folge hatte (Magnaghi et al. 2013). Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen der BrdU-Assays, die für siRNA 1 und 3 erzielt werden konnten. In der eben erwähnten Arbeit wurden im Anschluss ebenfalls mittels Western Blots die Expression der Apoptosemarker PARP-1 und Caspase 3 untersucht. In allen drei Zelllinien - konnte im Gegensatz zu dieser Arbeit - für mindestens zwei der verwendeten

siRNAs eine Spaltung der genannten Marker gezeigt werden und somit auf apoptotische Vorgänge in den Zellen geschlossen werden (Magnaghi et al. 2013).

Anhand dieser Literaturbeispiele kann man ableiten, dass das Protein VCP offenkundig in zahlreichen Tumorentitäten eine nicht unbedeutende Rolle spielt.

Jedoch unterscheiden sich offensichtlich je nach Tumorentität die zellulären Mechanismen, die zu diesen funktionellen Effekten führen. Auf welche molekularen Mechanismen sich die Transfektion in Pankreaskarzinomzellen auswirkt und warum sich diese Effekte lediglich für zwei der drei verwendeten siRNAs zeigen ließen, wird in den folgenden Abschnitten noch beleuchtet.

## **6.2 Proteinsynthese und proteotoxischer Stress in Karzinomzellen**

Um die beschriebenen Ergebnisse besser einordnen zu können, ist es sinnvoll, die Funktion des Enzyms VCP im Stoffwechsel der Karzinomzellen zu betrachten. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, ist VCP zentraler Bestandteil in der Regulation der Proteinhomöostase eukaryotischer Zellen (Meyer et al. 2012). Da zahlreiche Tumorentitäten eine gesteigerte Proteinsyntheserate haben und somit gleichzeitig auch vermehrt von degradativen Stoffwechselwegen abhängig sind, rückt der pharmakologische Eingriff an verschiedenen Stellschrauben der Proteinhomöostase zunehmend in den Fokus (Anderson et al. 2015). Aufgrund der hohen Proteinsyntheserate in den Karzinomzellen weisen diese auch eine Vielzahl an fehlgefalteten Proteinen auf, was in der Zelle sogenannten proteotoxischen Stress erzeugt (Deshaies 2014). Man geht davon aus, dass in gesunden, nicht maligne transformierten Zellen ein Gleichgewicht zwischen fehlgefalteten Proteinen auf der einen Seite, und der Kapazität des Ubiquitin-Proteasom-Systems auf der anderen Seite, herrscht. In Karzinomzellen verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der vor allem durch Punktmutationen fehlgefalteten bzw. aufgrund von Aneuploidie überexprimierten Proteine, sodass die Kapazität des Ubiquitin-Proteasom-Systems überschritten wird (Deshaies 2014). Um ein zu starkes Verschieben des Gleichgewichtes und somit eine proteotoxische Krise zu verhindern, werden in Tumorzellen häufig Enzyme, die am Abbau fehlgefalteter Proteine beteiligt sind, überexprimiert (Stach and Freemont 2017). Somit ist auch die in Kapitel 4.1 beschriebene Überexpression im humanen Pankreaskarzinom wenig verwunderlich. Valle et al. konnten in immunhistochemischen Färbungen sowohl in Gewebeproben als auch in verschiedenen Zelllinien nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome ebenfalls eine Überexpression von VCP nachweisen. Des Weiteren postulieren sie, dass die Akkumulation

von ubiquitinylierten Proteinen in Form sogenannter Aggresome eine permanente Überexpression von VCP induziert (Valle et al. 2011). Die Grundüberlegung des pharmakologischen Eingriffs in die Proteinhomöostase im Bereich der Tumorthherapie ist das Prinzip, dass das Gleichgewicht auf die Seite der fehlgefalteten Proteine verschoben wird. Ein bereits in der Klinik etabliertes Beispiel ist der Proteasominhibitor Bortezomib, welcher vor allem in der Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt wird und durch seine Wirkung den Abbau fehlgefalteter Proteine hemmt (Deshaies 2014). Auch die gezielte Inhibition der enzymatischen Aktivität von VCP soll letztlich eine proteotoxische Krise induzieren und somit die funktionelle Integrität der Zelle stören. Wójcik et al. haben Tumorzellen eines humanen Adenokarzinoms der Zervix (HeLa-Zellen) mit verschiedenen siRNAs gegen VCP transfiziert und konnten in ihren Versuchen eine daraus resultierende Aktivierung der sogenannten *Unfolded Proteine Response* (UPR) nachweisen (Wójcik et al. 2006). Die *UPR* stellt eine Sammlung phylogenetisch konservierter Signalwege dar, welche im Falle einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine aktiviert werden. In der Folge wird die Expression zahlreicher Gene gesteigert, deren Genprodukte unter anderem verschiedene Chaperone sind, die wieder eine korrekte Faltung der Proteine ermöglichen (Walter and Ron 2011). Wenn es trotz dieses Mechanismus weiterhin zu einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine kommt, beinhaltet die *UPR* weiterhin Mechanismen, welche sowohl einen Arrest des Zellzyklus als auch die Apoptose der jeweiligen Zelle ermöglichen können (Diehl et al. 2011). Es existieren drei bekannte molekulare Sensoren, die proteotoxischen Stress detektieren. Diese sind PERK (Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1) und ATF (Activating Transcription Factor 6), welche alle in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert sind (Iurlaro and Muñoz-Pinedo 2016). Wird nun PERK nach der Detektion proteotoxischen Stresses aktiviert, phosphoryliert diese Kinase den eukaryotischen Initiationsfaktor  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) (Diehl et al. 2011). Folglich wird die Bildung des funktionstüchtigen 40 S – Initiationskomplexes verhindert, welcher zum Start des Translationsvorganges unerlässlich ist (Brewer et al. 1999). Besonders sensibel reagiert darauf die Translation des Zellzyklusproteins Cyclin D1, wodurch dessen Konzentration in der Zelle deutlich sinkt. Somit sinkt letztlich die enzymatische Aktivität der Cdk4 und Cdk6, was einen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zur Folge hat (Diehl et al. 2011). Passend zu den Mechanismen dieses Signalweges konnte in dieser Arbeit mittels Western Blot eine deutliche Abnahme der Cyclin D1 – Konzentration nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit der siRNA1 bzw. der siRNA3 transfiziert wurden. Des Weiteren können auch die Ergebnisse des BrdU-Proliferationsassays mit diesen Überlegungen in Einklang gebracht werden. Auch hier zeigt sich für die mit siRNA1 bzw. mit siRNA3 transfizierten Zellen eine

deutliche Reduktion der Proliferation, was durch einen intrazellulären Mangel an Cyclin D1 erklärt werden könnte.

Wie bereits erwähnt wurde, kann die UPR auch in den programmierten Zelltod, die Apoptose, münden. So kann der beschriebene molekulare Sensor IRE1 das Adapterprotein TRAF2 rekrutieren, welches nun die ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) aktivieren kann. Diese kann nun durch Phosphorylierung die JNK (c-Jun N-terminale kinase 1) aktivieren, welche in der Folge wiederum antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 oder Mcl-1 hemmen kann (Iurlaro and Muñoz-Pinedo 2016). Dadurch wird der intrinsische Weg der Apoptose initiiert, wobei Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt und letztlich die Caspase 9 aktiviert wird, welche die darauffolgende Kaskade startet (Leverson and Cojocari 2018). Jedoch konnte in dieser Arbeit keine Spaltung der Caspase 3 nachgewiesen werden. Auch eine PARP-Spaltung war lediglich schwach in der Zelllinie PaTu-8988t für die mit siRNA1 und siRNA3 transfizierten Zellen zu sehen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass die verschiedenen Signalwege der UPR je nach Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt sind und die Initiierung der Apoptose in den Zellen des Pankreaskarzinoms lediglich eine untergeordnete Rolle spielt (Walter and Ron 2011). Jedoch stellt sich dann die Frage, weshalb in den MTT-Assays für die mit siRNA1 und siRNA3 transfizierten Zellen trotzdem eine deutliche Reduktion der Zellviabilität gemessen wurde. Eine mögliche Erklärung ist es, dass nach der Transfektion aufgrund der reduzierten Proliferationsrate die Anzahl der transfizierten Zellen zum Messzeitpunkt geringer ist als die Anzahl in der Kontrollpopulation. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen nicht durch Apoptose, sondern durch eine andere Form des Zelltodes gestorben sind. Denkbar wäre beispielsweise die Nekroptose, eine Unterform der Nekrose, die sich durch fehlende Aktivierung von Caspasen auszeichnet und vor allem durch die Proteine RIPK1, RIPK3 (receptor interacting protein kinase-1 bzw. receptor interacting protein kinase-3) und MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein) vermittelt wird (Krysko et al. 2017). Im Verlauf dieses Prozesses lagert sich MLKL zu einem Homotrimer zusammen und transloziert zur Plasmamembran und zu den Membranen der Zellorganellen (Cai et al. 2014). Auf welche Art und Weise dieses Homotrimer die Nekroptose vermittelt, ist allerdings noch nicht ausreichend aufgeklärt (Linkermann and Green 2014). Saveljeva et al. konnten zeigen, dass die Behandlung mit Agenzien, welche proteotoxischen Stress und somit potentiell die UPR auslösen können, in einer Fibrosarkom-Zelllinie der Maus Nekroptose induzieren konnte (Saveljeva et al. 2015). Genauso wie in der durch die UPR eingeleiteten Apoptose, kommt es auch während der Nekroptose zu einer Aktivierung der JNK, welche in diesem Fall für die Autophosphorylierung von RIPK1 und die Formation der sogenannten Nekrosomen

verantwortlich ist (Cao et al. 2018). Somit stellt diese Kinase quasi eine Schnittstelle zwischen den zwei Signalwegen dar, von welchen in den Karzinomzellen des Pankreas möglicherweise die Weichen in Richtung Nekroptose gestellt werden.

### **6.3 RNA-Interferenz und Off-Target-Effekte**

Da die Transfektion von Zellen mit siRNA wesentlicher Bestandteil der durchgeführten Versuche ist, ist es unabdingbar, sich mit den Besonderheiten dieser Methodik zu beschäftigen, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beurteilen zu können. RNA-Interferenz ist ein Mechanismus eukaryotischer Zellen zur Regulierung der Genexpression (Pellish et al. 2008). Das Prinzip beruht darauf, dass sich kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung spezifisch an einen Sequenzabschnitt derjenigen mRNA anlagern, deren Genprodukt herunterreguliert werden soll. Diese RNA-Moleküle können sowohl in der Zelle selbst synthetisiert werden, wie die miRNAs, als auch von exogen zugeführt werden, wie die siRNAs (Ipsaro and Joshua-Tor 2015; Pellish et al. 2008). siRNA-Moleküle können jedoch auch in der Zelle synthetisiert werden, wobei in diesem Fall doppelsträngige RNA-Moleküle im Zytoplasma von dem RNase-III-ähnlichen Enzym *Dicer* in RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden geschnitten und in der Folge nun als siRNA bezeichnet werden (Ichim et al. 2004). Anschließend wird der führende Strang in einen Multiproteinkomplex eingelagert, welcher aus dem sogenannten *RISC* (RNA induced silencing complex) und der Nuklease *Ago2* besteht (Rivas et al. 2005). Nachdem sich der führende Strang der siRNA nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die Ziel-mRNA angelagert hat, wird die mRNA vom 5'-Ende aus gesehen zwischen den Nukleotiden 10 und 11 gespalten und somit inaktiviert (Elbashir et al. 2001; Liu et al. 2004).

Als man das erste Mal eine Reduktion der Genexpression mittels siRNA nachweisen konnte, hielt man dieses Verfahren für hochspezifisch (Elbashir et al. 2001). Es konnte jedoch mittlerweile in diversen Arbeiten gezeigt werden, dass abhängig von der Sequenz der siRNA neben der Expression des Zielgens auch die Expression weiterer Gene herunterreguliert wird (Jackson et al. 2003; Li et al. 2015). Wenn die verwendeten siRNAs aufgrund teilweiser Komplementarität an eine nicht beabsichtigte mRNA binden, dann spricht man auch von „off-target-Effekten“ (Pellish et al. 2008). Ein wesentlicher Faktor, der zur Entstehung von „off-target-Effekten“ beitragen kann, ist die sogenannte Seed-Region des Führungsstranges der siRNA (Kamola et al. 2015). Als Seed-Region ist die Sequenz der Nukleotide 2 bis 8 vom 5'-

Ende des Führungsstranges aus definiert (Ui-Tei 2016). Diese kurze Nukleotidsequenz erkennt die 3'-UTR von mRNAs der jeweiligen „Off-target-Gene“ (Lewis et al. 2005). Ui-Tei et al. konnten zeigen, dass die durch die Seed-Region bedingten „off-target-Effekte“ sehr stark mit der thermodynamischen Stabilität des entstehenden Hybrids aus Seed-Region und mRNA korrelieren. Diese Stabilität korreliert jeweils positiv mit der Schmelztemperatur und negativ mit der freien Enthalpie (Ui-Tei et al. 2008). Man kann also festhalten, dass die Seed-Region die primär treibende Kraft bezüglich der Entstehung von „off-target-Effekten“ ist (Kamola et al. 2015). Jedoch ist die sogenannte Non-Seed-Region, also die Nukleotide 9 bis 21 vom 5'-Ende des Führungsstrangs aus, maßgeblich an der Effizienz der „off-target-Effekte“ beteiligt. So konnten Kamola et al. zeigen, dass bei gleicher Nukleotidsequenz in der Seed-Region variierende Sequenzen in der Non-Seed-Region zu unterschiedlich starker Genregulierung geführt haben (Kamola et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit sind zwei Varianten denkbar. In der ersten Variante bedingt die siRNA2 keine Off-Target-Effekte und zeigt somit die tatsächlichen Auswirkungen einer selektiven Repression von VCP. Das hieße also, dass VCP im Stoffwechsel der Karzinomzellen keine bedeutende Rolle spielt, weil weder ein Einfluss auf die Zellviabilität noch auf die Proliferation der Zellen zu verzeichnen wäre. Die Effekte der siRNA1 und der siRNA3 wären somit schließlich auf die Repression von Off-Target-Genen zurückzuführen.

In der zweiten Variante spiegeln die Ergebnisse, die mittels Transfektion von siRNA1 und siRNA3 erzielt wurden, den eigentlichen Effekt einer selektiven Herunterregulierung von VCP wider. Das hieße, dass die reduzierte Expression von VCP eine deutlich reduzierte Zellviabilität sowie eine Proliferationshemmung der Karzinomzellen zur Folge hat. Da in der Literatur bereits für verschiedene andere Tumorentitäten eine wichtige Rolle von VCP im Metabolismus der Tumorzellen beschrieben wurde (siehe Kapitel 5.1), erscheint diese Variante wahrscheinlicher. Außerdem kann diese Vermutung durch die Analyse der Ergebnisse der Western Blots erhärtet werden. Sowohl in den PaTu-8988t-Zellen als auch in den SUIT2-007-Zellen zeigt sich im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen für alle drei eingesetzten siRNAs eine erhöhte Expression von p21. Dieses Protein inhibiert diverse Komplexe aus Cyclinen und deren dazugehörigen Kinasen, unter anderem auch Cyclin D1, welches im Komplex mit der Cdk4 maßgeblich am Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus beteiligt ist (Coqueret 2002; Gartel and Radhakrishnan 2005). Passend dazu zeigt sich in den mit siRNA1 und siRNA3 transfizierten Zellen eine deutliche Proliferationshemmung. Möglicherweise bindet also die siRNA2 an eine Off-target-

mRNA und bewirkt somit einen Off-target-Effekt, der trotz erhöhter Expression von p21 eine Herunterregulierung von Cyclin D1 verhindert.

Um die Spezifität der mit siRNA1 und siRNA3 erzielten Effekte weiter bestätigen zu können, bestünde die Möglichkeit, sogenannte Rescue-Experimente durchzuführen (Cullen 2006). Deren Prinzip besteht darin, dass das Zielprotein reexprimiert wird, indem transient ein Vektor transfiziert wird, der für eine leicht modifizierte mRNA kodiert, welche nicht durch die verwendeten siRNAs gehemmt werden kann (Morita et al. 2012). Sollte nun eine Wiederherstellung des ursprünglichen Wildtyp-Phänotyps beobachtet werden, wäre dies ein starkes Indiz dafür, dass die Effekte der siRNA1 und siRNA3 spezifisch für eine Herunterregulierung von VCP sind. Man würde also in diesem Fall eine nun wieder erhöhte Zellviabilität sowie eine gesteigerte Proliferationsrate erwarten.



## 7 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas geht noch immer mit einer sehr schlechten Prognose einher. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt lediglich bei etwa 9 %. Aufgrund häufig fehlender Frühsymptome sowie einer frühen Metastasierung befindet sich die Mehrzahl der Patienten bei Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Doch auch die Krankheitsfälle, die in einem Frühstadium diagnostiziert werden und somit operabel sind, weisen eine hohe Mortalitätsrate auf. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass sich das Pankreaskarzinom durch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber zytostatischer Therapie auszeichnet. Daher wurde in den letzten Jahren vermehrt an Zielstrukturen innerhalb der Tumorzellen geforscht, welche im Rahmen einer „targeted therapy“ pharmakologische Angriffspunkte zur gezielten Tumorthherapie darstellen könnten.

Eine potenzielle Zielstruktur ist das Protein „Valosin-containing protein“ (VCP), welches in einer vorangegangenen Arbeit der AG Buchholz in einem shRNA-basierten Screening identifiziert wurde. Es wurde bereits in mehreren Publikationen gezeigt, dass VCP, welches eine zentrale Rolle in der proteasomalen Degradation von Proteinen und Polypeptiden spielt, in zahlreichen Tumorentitäten erhöht und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. In dieser Arbeit konnte eine statistisch signifikant erhöhte Expression von VCP in Pankreaskarzinomgewebe sowohl gegenüber Gewebeproben bei chronischer Pankreatitis als auch gegenüber gesundem Pankreasgewebe nachgewiesen werden.

Mittels qRT-PCR wurde gezeigt, dass durch die drei verwendeten siRNAs in verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien ein suffizienter Knockdown der VCP-mRNA möglich war. Via MTT- sowie BrdU-Assays wurde der Einfluss des Knockdowns auf die Zellviabilität sowie die Proliferation der Tumorzellen untersucht.

In allen drei verwendeten Zelllinien konnten bei Transfektion mit siRNA1 und siRNA3 eine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität und der Zellproliferation nachgewiesen werden. Mithilfe von Western Blots konnte Apoptose als Ursache für die Reduktion der Zellviabilität ausgeschlossen werden.

Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass in den Zellpopulationen mit reduzierter Zellproliferation eine deutliche Hochregulierung des Zellzyklusproteins p21 und eine Herunterregulierung von Cyclin D1 erfolgte.

Auffällig war, dass die Transfektion mit siRNA2 in keiner der durchgeführten funktionellen Assays einen Effekt auf Zellviabilität oder Zellproliferation hatte. Hierfür wurden Off-Target-Effekte als mögliche Ursache diskutiert.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit mit der Reduktion der Zellviabilität und Zellproliferation zwei potenzielle Wege gezeigt werden, wie die Herunterregulierung der Expression von VCP antitumorale Wirkung entfalten kann. Die Entschlüsselung der genauen molekularen Grundlagen bleibt zukünftigen Versuchen und Analysen vorbehalten.

## 8 Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma still has an extremely poor prognosis. The 5-year survival rate is around 9 %. The disease is often diagnosed in advanced stages, because in many cases there are no early symptoms and PDAC metastasizes early. Yet also cases which are diagnosed in early stages and thus are primarily resectable, show high mortality rates. One of the reasons for this aggressive behavior is its high resistance against chemotherapy. Therefore, within the last years researchers tried to identify cellular structures, which could be targeted by new antineoplastic agents.

A potential structure is the protein “Valosin-containing protein” (VCP), which could be identified in an shRNA-based screening in a former dissertation of the AG Buchholz. A central role of VCP in proteasomal degradation, its overexpression in various tumor entities and its association with dismal prognosis were shown in several prior publications. In this dissertation a statistically significant increased expression of VCP in tissue samples of PDAC compared to samples of healthy pancreatic tissue and chronic pancreatitis could be shown.

It could be shown that all three used siRNAs led to a sufficient knockdown of VCP-mRNA in various PDAC-cell lines. MTT- and BrdU-assays were used to determine whether this knockdown had influence on the viability and proliferation of the tumor cells.

In all three used cell lines a statistically significant decrease of cell viability and cell proliferation could be detected, when cells were transfected with siRNA1 and siRNA3. Apoptosis as a reason of reduced cell viability could be excluded by performing western blots.

With the help of Western Blots, a remarkable upregulation of the cell cycle protein p21 and a downregulation of Cyclin D1 could be demonstrated in these cell populations, which showed reduced cell proliferation.

It was noticeable, that the functional assays could not detect any effect on cell viability or cell proliferation when the cells had been transfected with siRNA2. Off-target-effects were discussed as one possible reason.

Finally, with the reduction of cell viability and cell proliferation this thesis showed two potential ways, how the downregulation of VCP could mediate antitumoral effects. The identification of the exact molecular mechanisms is part of future experiments and analyses.

## 9 Literaturverzeichnis

Acs K, Luijsterburg MS, Ackermann L, Salomons FA, Hoppe T, Dantuma NP (2011): The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol* 18, 1345–1350

Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB (2008): Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25, 2097–2116

Anderson DJ, Le Moigne R, Djakovic S, Kumar B, Rice J, Wong S, Wang J, Yao B, Valle E, Kiss von Soly S et al. (2015): Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell* 28, 653–665

Aune D, Greenwood DC, Chan DSM, Vieira R, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Cade JE, Burley VJ, Norat T (2012): Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* 23, 843–852

Baldrige RD, Rapoport TA (2016): Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD. *Cell* 166, 394–407

Banerjee S, Bartesaghi A, Merk A, Rao P, Bulfer SL, Yan Y, Green N, Mroczkowski B, Neitz RJ, Wipf P et al. (2016): 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition. *Science* 351, 871–875

Barthelme D, Sauer RT (2012): Identification of the Cdc48•20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science* 337, 843–846

Basilico V, Griffa B, Clerici D, Giacci F, Capriata G (1998): Tecnica di Traverso-Longmire e qualità di vita nei pazienti operati per neoplasie periampollari. *Contributo clinico. Minerva Chir* 53, 973–978

Basturk O, Hong S-M, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin AV, Brosens LAA, Fukushima N, Goggins M, Hruban RH et al. (2015): A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *Am J Surg Pathol* 39, 1730–1741

Batabyal P, Vander Hoorn S, Christophi C, Nikfarjam M (2014): Association of diabetes mellitus and pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of 88 studies. *Ann Surg Oncol* 21, 2453–2462

Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras M-C, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Patch A-M, Wu J et al. (2012): Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491, 399–405

Biegging KT, Mello SS, Attardi LD (2014): Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 14, 359–370

Bonnans C, Chou J, Werb Z (2014): Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 786–801

Bramhall SR, Rosemurgy A, Brown PD, Bowry C, Buckels JA (2001): Marimastat as first-line therapy for patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 19, 3447–3455

Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, Brown PD, Baillet M, Buckels JAC (2002): A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 87, 161–167

Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong D, Larson A, Williams CC, Li G-W, Zhou S, King D, Shen PS, Weibezahn J et al. (2012): A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151, 1042–1054

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424

Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA (1999): Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8505–8510

Cai Z, Jitkaew S, Zhao J, Chiang H-C, Choksi S, Liu J, Ward Y, Wu L-G, Liu Z-G (2014): Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 16, 55–65

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1994): Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8, 27–32

Cao M, Chen F, Xie N, Cao M-Y, Chen P, Lou Q, Zhao Y, He C, Zhang S, Song X et al. (2018): c-Jun N-terminal kinases differentially regulate TNF- and TLRs-mediated necroptosis through their kinase-dependent and -independent activities. *Cell Death Dis* 9, 1140

Chu GC, Kimmelman AC, Hezel AF, DePinho RA (2007): Stromal biology of pancreatic cancer. *J Cell Biochem* 101, 887–907

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, La Fouchardière C de et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364, 1817–1825

Coqueret O (2002): Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35–55

Cox AD, Der CJ, Philips MR (2015): Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin Cancer Res* 21, 1819–1827

Cui Y, Niu M, Zhang X, Zhong Z, Wang J, Pang D (2015): High expression of valosin-containing protein predicts poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Tumour Biol* 36, 9919–9927

Cullen BR (2006): Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat Methods* 3, 677–681

Dai R-M, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li C-CH (1998): Involvement of Valosin-containing Protein, an ATPase Co-purified with I $\kappa$ B $\alpha$  and 26 S Proteasome, in Ubiquitin-Proteasome-mediated Degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem* 273, 3562–3573

Dantuma NP, Acs K, Luijsterburg MS (2014): Should I stay or should I go: VCP/p97-mediated chromatin extraction in the DNA damage response. *Exp Cell Res* 329, 9–17

Defenouillère Q, Yao Y, Mouaikel J, Namane A, Galopier A, Decourty L, Doyen A, Malabat C, Saveanu C, Jacquier A et al. (2013): Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5046–5051

Deshaies RJ (2014): Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. *BMC Biol* 12, 94

Di Magliano MP, Logsdon CD (2013): Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression. *Gastroenterology* 144, 1220–1229

Diehl JA, Fuchs SY, Koumenis C (2011): The cell biology of the unfolded protein response. *Gastroenterology* 141, 38-41, 41.e1-2

Ekbom A, McLaughlin JK, Karlsson BM, Nyrén O, Gridley G, Adami HO, Fraumeni JF (1994): Pancreatitis and pancreatic cancer: a population-based study. *J Natl Cancer Inst* 86, 625–627

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494–498

Elsässer HP, Lehr U, Agricola B, Kern HF (1992): Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Arch B, Cell Pathol* 61, 295–306

Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Deucker S, Sauliunaite D, Streit S, Esposito I, Friess H, Kleeff J (2009): Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia* 11, 497–508

Fischer CG, Wood LD (2018): From somatic mutation to early detection: Insights from molecular characterization of pancreatic cancer precursor lesions. *J Pathol*

Fröhlich KU, Fries HW, Rüdiger M, Erdmann R, Botstein D, Mecke D (1991): Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol* 114, 443–453

Furukawa T, Fujisaki R, Yoshida Y, Kanai N, Sunamura M, Abe T, Takeda K, Matsuno S, Horii A (2005): Distinct progression pathways involving the dysfunction of DUSP6/MKP-3 in pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol* 18, 1034–1042

Fusco AJ, Savinova OV, Talwar R, Kearns JD, Hoffmann A, Ghosh G (2008): Stabilization of RelB requires multidomain interactions with p100/p52. *J Biol Chem* 283, 12324–12332

Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005): Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65, 3980–3985

Greer JB, Whitcomb DC, Brand RE (2007): Genetic predisposition to pancreatic cancer: a brief review. *Am J Gastroenterol* 102, 2564–2569

Hackert T, Ulrich A, Büchler MW (2017): Can Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer Increase the Pool of Patients Eligible for Pancreaticoduodenectomy? *Adv Surg* 51, 1–10

Hartwig W, Werner J, Jäger D, Debus J, Büchler MW (2013): Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *Lancet Oncol* 14, e476-e485

Heinrich S, Pestalozzi B, Lesurtel M, Berrevoet F, Laurent S, Delpero J-R, Raoul J-L, Bachellier P, Dufour P, Moehler M et al. (2011): Adjuvant gemcitabine versus NEOadjuvant

gemcitabine/oxaliplatin plus adjuvant gemcitabine in resectable pancreatic cancer: a randomized multicenter phase III study (NEOPAC study). *BMC Cancer* 11, 346

Hemion C, Flammer J, Neutzner A (2014): Quality control of oxidatively damaged mitochondrial proteins is mediated by p97 and the proteasome. *Free Radic Biol Med* 75, 121–128

Hidalgo M, Hoff DD von (2012): Translational therapeutic opportunities in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 18, 4249–4256

Hoff DD von, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN et al. (2013): Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 369, 1691–1703

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, Furth EE, Furukawa T, Klein A, Klimstra DS et al. (2006): Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 66, 95–106

Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Klöppel G, Longnecker DS et al. (2001): Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25, 579–586

Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL (1993): K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143, 545–554

Huen MSY, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J (2007): RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 131, 901–914

Huyton T, Pye VE, Briggs LC, Flynn TC, Beuron F, Kondo H, Ma J, Zhang X, Freemont PS (2003): The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol* 144, 337–348

Ichim TE, Li M, Qian H, Popov IA, Rycerz K, Zheng X, White D, Zhong R, Min W-P (2004): RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *Am J Transplant* 4, 1227–1236

Ilic M, Ilic I (2016): Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 22, 9694–9705



Ipsaro JJ, Joshua-Tor L (2015): From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat Struct Mol Biol* 22, 20–28

Iurlaro R, Muñoz-Pinedo C (2016): Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J* 283, 2640–2652

Iwamura T, Katsuki T, Ide K (1987): Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Jpn J Cancer Res* 78, 54–62

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21, 635–637

Kamisawa T, Isawa T, Koike M, Tsuruta K, Okamoto A (1995): Hematogenous metastases of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas* 11, 345–349

Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K (2016): Pancreatic cancer. *Lancet* 388, 73–85

Kamola PJ, Nakano Y, Takahashi T, Wilson PA, Ui-Tei K (2015): The siRNA Non-seed Region and Its Target Sequences Are Auxiliary Determinants of Off-Target Effects. *PLoS Comput Biol* 11, e1004656

Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong S-M, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B et al. (2012): Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730-733.e9

Keane MG, Horsfall L, Rait G, Pereira SP (2014): A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open* 4, e005720

Kedra B, Popiela T, Sierzega M, Precht A (2001): Prognostic factors of long-term survival after resective procedures for pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 48, 1762–1766

Klaiber U, Leonhardt C-S, Strobel O, Tjaden C, Hackert T, Neoptolemos JP (2018): Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy in pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg*

Koller KJ, Brownstein MJ (1987): Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. *Nature* 325, 542–545

Korc M (2007): Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am J Surg* 194, S84-6

Kota J, Hancock J, Kwon J, Korc M (2017): Pancreatic cancer: Stroma and its current and emerging targeted therapies. *Cancer Letters* 391, 38–49

Krysko O, Aaes TL, Kagan VE, D'Herde K, Bachert C, Leybaert L, Vandenabeele P, Krysko DV (2017): Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunol Rev* 280, 207–219

Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16

Latterich M, Fröhlich KU, Schekman R (1995): Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82, 885–893

Leverson JD, Cojocari D (2018): Hematologic Tumor Cell Resistance to the BCL-2 Inhibitor Venetoclax: A Product of Its Microenvironment? *Front Oncol* 8, 458

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20

Li C, Liu Z, Yang F, Liu W, Di Wang, Dong E, Wang Y, Wu C-I, Lu X (2015): siRNAs with decreased off-target effect facilitate the identification of essential genes in cancer cells. *Oncotarget* 6, 21603–21613

Li J-M, Wu H, Zhang W, Blackburn MR, Jin J (2014): The p97-UFD1L-NPL4 protein complex mediates cytokine-induced I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis. *Mol Cell Biol* 34, 335–347

Lim PJ, Danner R, Liang J, Doong H, Harman C, Srinivasan D, Rothenberg C, Wang H, Ye Y, Fang S et al. (2009): Ubiquilin and p97/VCP bind erasin, forming a complex involved in ERAD. *J Cell Biol* 187, 201–217

Lin X, Feng X-H (2005): Abrogation of transforming growth factor-beta signaling in pancreatic cancer. *World J Surg* 29, 312–316

Linkermann A, Green DR (2014): Necroptosis. *N Engl J Med* 370, 455–465

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441

Lüttges J, Galehdari H, Bröcker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Klöppel G, Schmiegel W, Hahn SA (2001): Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 158, 1677–1683

Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, Avanzi N, Rizzi S, Asa D, Gasparri F, Cozzi L, Cucchi U, Orrenius C et al. (2013): Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat Chem Biol* 9, 548–556

Mailand N, Bekker-Jensen S, Faustrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J (2007): RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887–900

Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E (2018): European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol* 29, 1016–1022

Marin-Muller C, Li D, Bharadwaj U, Li M, Chen C, Hodges SE, Fisher WE, Mo Q, Hung M-C, Yao Q (2013): A tumorigenic factor interactome connected through tumor suppressor microRNA-198 in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 19, 5901–5913

Meerang M, Ritz D, Paliwal S, Garajova Z, Bosshard M, Mailand N, Janscak P, Hübscher U, Meyer H, Ramadan K (2011): The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 13, 1376–1382

Meyer H, Bug M, Bremer S (2012): Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* 14, 117–123

Meyer H, Wehl CC (2014): The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J Cell Sci* 127, 3877–3883

Min J, Allali-Hassani A, Nady N, Qi C, Ouyang H, Liu Y, MacKenzie F, Vedadi M, Arrowsmith CH (2007): L3MBTL1 recognition of mono- and dimethylated histones. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1229–1230

Moir D, Stewart SE, Osmond BC, Botstein D (1982): Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* 100, 547–563

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA et al. (2007): Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25, 1960–1966

Moore MJ, Hamm J, Dancey J, Eisenberg PD, Dagenais M, Fields A, Hagan K, Greenberg B, Colwell B, Zee B et al. (2003): Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 21, 3296–3302

Morita E, Arai J, Christensen D, Votteler J, Sundquist WI (2012): Attenuated protein expression vectors for use in siRNA rescue experiments. *BioTechniques* 0, 1–5

Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, Hartmann JT, Gellert K, Ridwelski K, Niedergethmann M, Zülke C, Fahlke J, Arning MB et al. (2013): Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 310, 1473–1481

Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D et al. (2009): Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457–1461

Parkin DM, Boyd L, Walker LC (2011): 16. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer* 105 Suppl 2, S77-81

Pellish RS, Nasir A, Ramratnam B, Moss SF (2008): Review article: RNA interference--potential therapeutic applications for the gastroenterologist. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 715–723

Peters JM, Walsh MJ, Franke WW (1990): An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J* 9, 1757–1767

Rabouille C, Levine TP, Peters JM, Warren G (1995): An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell* 82, 905–914

Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM (2014): Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 74, 2913–2921

Ramadan K, Bruderer R, Spiga FM, Popp O, Baur T, Gotta M, Meyer HH (2007): Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* 450, 1258–1262

Ramanathan HN, Ye Y (2012): The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Res* 22, 346–359

Rivas FV, Tolia NH, Song J-J, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2005): Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* 12, 340–349

Robert Koch-Institut: Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016; RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut)

Rucki AA, Zheng L (2014): Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies. *World J Gastroenterol* 20, 2237–2246

Saveljeva S, Mc Laughlin SL, Vandenabeele P, Samali A, Bertrand MJM (2015): Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell Death Dis* 6, e1587

Schwarz L, Vernerey D, Bachet J-B, Tuech J-J, Portales F, Michel P, Cunha AS (2018): Resectable pancreatic adenocarcinoma neo-adjuvant FOLF(IRIN)OX-based chemotherapy - a multicenter, non-comparative, randomized, phase II trial (PANACHE01-PRODIGE48 study). *BMC Cancer* 18, 762

Shah PP, Beverly LJ (2015): Regulation of VCP/p97 demonstrates the critical balance between cell death and epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. *Oncotarget* 6, 17725–17737

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018): Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68, 7–30

Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Klöppel G (2009): Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology* 9, 45–54

Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL (1988): KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 16, 7773–7782

Song C, Wang Q, Li C-CH (2003): ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *J Biol Chem* 278, 3648–3655

Stach L, Freemont PS (2017): The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochem J* 474, 2953–2976

Stein A, Ruggiano A, Carvalho P, Rapoport TA (2014): Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell* 158, 1375–1388

Stromnes IM, DelGiorno KE, Greenberg PD, Hingorani SR (2014): Stromal reengineering to treat pancreas cancer. *Carcinogenesis* 35, 1451–1460

Takashima A, Faller DV (2013): Targeting the RAS oncogene. *Expert Opin Ther Targets* 17, 507–531

Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, Pickren JW, Berjian R, Douglass HO, Chu TM (1986): Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* 4, 15–23

Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, Kono T, Oka T, Yamamoto S, Nonomura N, Okuyama A, Aozasa K (2004): Elevated expression of valosin-containing protein (p97) is associated with poor prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10, 3007–3012

Ui-Tei K (2016): Is the Efficiency of RNA Silencing Evolutionarily Regulated? *Int J Mol Sci* 17

Ui-Tei K, Naito Y, Nishi K, Juni A, Saigo K (2008): Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res* 36, 7100–7109

Valle CW, Min T, Bodas M, Mazur S, Begum S, Tang D, Vij N (2011): Critical role of VCP/p97 in the pathogenesis and progression of non-small cell lung carcinoma. *PLoS ONE* 6, e29073

Vaz B, Halder S, Ramadan K (2013): Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability. *Front Genet* 4, 60

Verma R, Oania R, Fang R, Smith GT, Deshaies RJ (2011): Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II. *Mol Cell* 41, 82–92

Verma R, Oania RS, Kolawa NJ, Deshaies RJ (2013): Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife* 2, e00308

Walter P, Ron D (2011): The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086

Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH (2000): Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60, 2002–2006

Wilson JS, Pirola RC, Apte MV (2014): Stars and stripes in pancreatic cancer: role of stellate cells and stroma in cancer progression. *Front Physiol* 5, 52

Wójcik C, Rowicka M, Kudlicki A, Nowis D, McConnell E, Kujawa M, DeMartino GN (2006): Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 17, 4606–4618

- Xia X, Wu W, Huang C, Cen G, Jiang T, Cao J, Huang K, Qiu Z (2015): SMAD4 and its role in pancreatic cancer. *Tumour Biol* 36, 111–119
- Xu S, Peng G, Wang Y, Fang S, Karbowski M (2011): The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Mol Biol Cell* 22, 291–300
- Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV (2014): Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory. *World J Gastroenterol* 20, 11216–11229
- Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Kidogami S, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M et al. (2004a): Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 10, 5558–5565
- Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Ishikawa O, Ohigashi H, Nakamori S et al. (2004b): Increased expression of valosin-containing protein (p97) is associated with lymph node metastasis and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 11, 165–172
- Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Nakamori S, Sakon M, Monden M et al. (2003): Expression level of valosin-containing protein is strongly associated with progression and prognosis of gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 21, 2537–2544
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA (2001): The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652–656
- Ye Y, Tang WK, Zhang T, Di Xia (2017): A Mighty "Protein Extractor" of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase. *Front Mol Biosci* 4, 39
- Zhang T, Ye Y (2014): The final moments of misfolded proteins en route to the proteasome. *DNA Cell Biol* 33, 477–483
- Zhang Y, Musci T, Derynck R (1997): The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Current Biology* 7, 270–276
- Zhang Z, Wang Y, Li C, Shi Z, Hao Q, Wang W, Song X, Zhao Y, Jiao S, Zhou Z (2015): The Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase p97 Regulates the Alternative Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Signaling via Partial Degradation of the NF- $\kappa$ B Subunit p100. *J Biol Chem* 290, 19558–19568

## **10 Anhang**

### **10.1 Curriculum vitae**

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen aus der elektronischen Version entfernt.



Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen aus der elektronischen Version entfernt.

## 10.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Best, Bette, Brehm, Buchholz, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Dellweg, del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Eickmann, Feuser, Figiel, Fritz, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Hoffmann, Hoyer, Jaques, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Knake, König, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maier-Giebing, Maisner, Menzler, Michl, Moll, Mutters, Müller, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Nockher, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera-Knorrenschild, Ries, Ruchholtz, Sekundo, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schratt, Schu, Schulze, Schütz, Seifart, Seitz, Sevinc, Stahl, Steiniger, Suske, Tackenberg, Teymoor-tash, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wittig, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zemlin.

### **10.3 Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. T. Gress für die Möglichkeit bedanken in seinem Institut für meine Doktorarbeit forschen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Malte Buchholz für die Überlassung des interessanten Themas. Er hatte sich stets die Zeit genommen, mir mit wertvollen und durchdachten Ratschlägen zu helfen, wenn sich Fragen oder Unklarheiten ergaben.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Harald Schmidt bedanken, der mir mit viel Geduld die Grundsätze der Laborarbeit sowie diverse Methodiken im Bereich Zellbiologie und Molekularbiologie beibrachte.

Auch Christine Dippel möchte ich bei der Danksagung namentlich erwähnen. Auch sie brachte viel Zeit dafür auf, mich mit wertvoller Hilfestellung bei der Durchführung meiner Versuche zu unterstützen.

Ferner möchte ich mich bei allen weiteren aktuellen sowie ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Buchholz bedanken, die mich während meiner Zeit als Doktorand unterstützten. Ich fühlte mich vom ersten Tag an sowohl als Mitarbeiter als auch als Mensch sehr gut aufgehoben.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Schwester, Silke Schimanski, und ihrem Ehemann, Gerald Zettner, dafür bedanken, dass sie mir während der Promotion und auch während des gesamten Studiums immer zur Seite standen.

Zuletzt gilt der größte Dank meinen Eltern, Anita Schimanski und Holger Schimanski, die mich während des Studiums und auch während der Promotion bedingungslos mit all ihren Mitteln und Möglichkeiten unterstützten.

#### **10.4 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung der zellulären Rolle des Kandidatengens VCP im Pankreaskarzinom“ in der Klinik für Innere Medizin Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel unter Leitung von Prof. Dr. med. Thomas M. Gress mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Malte Buchholz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

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

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

---

Ort, Datum, Unterschrift Doktorand

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

---

Ort, Datum, Unterschrift Betreuer