

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

---

**Analyse der Metastasierung des  
Pankreaskarzinoms: Identifizierung differenziell  
exprimierter Gene**

Sebastian Rasch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. D. K. M. Saur  
2. Univ.-Prof. Dr. J. H. Kleeff

Die Dissertation wurde am 18.02.2013 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2013 angenommen.

Meinen Eltern,  
Renate und Udo Rasch.

# Inhaltsverzeichnis:

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1	Duktales Pankreaskarzinom .....	7
1.2	Metastasierung .....	8
1.2.1	Metastasierung des duktales Pankreaskarzinoms .....	8
1.2.2	Metastasierungsmodelle .....	8
1.3	Genexpressionsprofile .....	12
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1	Allgemeine Materialien .....	14
2.2	Zellkultur.....	14
2.2.1	Verwendete Zelllinien .....	14
2.2.1.1	MiaPaCa-2 .....	14
2.2.1.2	BxPc3.....	15
2.2.2	Kulturbedingungen .....	15
2.2.3	Herstellung von Dauerkulturen .....	16
2.3	Mausmodell .....	16
2.3.1	Maus .....	16
2.3.2	Orthotope Implantation .....	17
2.3.3	In-vivo imaging .....	17
2.3.4	Mausdissektion.....	18
2.3.5	Metastasenzellisolation.....	19
2.3.5.1	Isolation freier Tumorzellen aus Aszitespunktat.....	19
2.3.5.2	Isolation von im Blut zirkulierenden Tumorzellen .....	19
2.3.5.3	Tumorzellisolation aus Gewebeproben .....	20
2.4	Histologie und Färbung.....	20
2.4.1	Organfixierung für Paraffinschnitte.....	20
2.4.2	H&E Färbung.....	20
2.4.3	Immunhistochemie .....	21
2.5	Molekulare Methoden .....	22
2.5.1	Protein-Isolation und Western Blot.....	22

2.5.1.1	Protein-Isolation.....	22	
2.5.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	22	
2.5.1.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	23	
2.5.1.4	Western Blot.....	23	
2.5.2	Genexpressionsanalyse .....	25	
2.5.2.1	RNA-Isolation .....	25	
2.5.2.2	Microarray Analyse .....	25	
2.5.2.3	Bioinformatische Auswertung .....	26	
2.6	Statistische Auswertung .....	27	
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>	
3.1	Metastasierungsverhalten von BxPc3 und MiaPaCa-2 Zellen.....	28	
3.1.1	MiaPaCa-2 weisen ein hohes primäres Metastasierungspotential auf .....	30	
3.1.2	Das Metastasierungspotential von MiaPaCa-2 Zellen hängt nicht von der Primärtumorgröße ab.....	35	
3.1.3	Aus Metastasen selektionierte MiaPaCa-2 Zellsubpopulationen .....	metastasieren nicht organspezifisch .....	38
3.1.4	Metastasen verschiedener Organe scheinen unterschiedliche Gene zu exprimieren.....	39	
3.1.5	Frühe Dissemination von Tumorzellen in Primärtumoren von .....	MiaPaCa-2 Zellen.....	40
3.2	Differentiell exprimierte Gene (DEGs).....	41	
3.2.1	Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren .....	41	
3.2.1.1	MiaPaCa-2 Zelllinien .....	42	
3.2.1.1.1	ARHGDI1 .....	42	
3.2.1.1.2	CDH23 .....	43	
3.2.1.1.3	DAB2ip .....	43	
3.2.1.1.4	HIPK2 .....	44	
3.2.1.1.5	NTN1 .....	45	
3.2.1.1.6	PVRL1 .....	45	
3.2.1.1.7	SPTBN1 .....	46	
3.2.1.1.8	ZNF444 .....	46	
3.2.1.2	MiaPaCa-2 und BxPc3 Zelllinien .....	47	
3.2.2	Metastasierende Zelllinien im Vergleich zu nicht metastasierenden.....	47	
3.2.2.1	MiaPaCa-2 Zelllinien .....	48	
3.2.2.1.1	CD300LG .....	48	

3.2.2.1.2	SLURP1 .....	49
3.2.2.1.3	SRCAP .....	49
3.2.2.2	MiaPaCa-2 und BxPc3 Zelllinien .....	50
3.2.3	Primärtumoren im Vergleich zu im Blut zirkulierenden Tumorzellen.....	51
3.2.4	Im Blut zirkulierende Tumorzellen im Vergleich zu Metastasen .....	51
3.2.4.1	ARHGAP8 .....	52
3.2.4.2	ATXN3.....	53
3.2.4.3	Axin2 .....	54
3.2.4.4	C11orf21.....	54
3.2.4.5	CLDN20 .....	55
3.2.4.6	GNA12 .....	55
3.2.4.7	PADI1 .....	56
3.2.4.8	PAK6 .....	56
3.3	GSEA .....	57
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>9.</b>	<b>Grafikverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>10.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>78</b>
10.1	Mausliste .....	78
10.2	Zelllinien für Genexpressionsanalyse .....	81
10.2.1	MiaPaCa-2 .....	81
10.2.2	BxPc3.....	82
<b>11.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>83</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
adjP	adjusted P-Value
DEG	differentially expressed Genes
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced Green-Fluorescent-Protein
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum
fLuc	firefly Luciferase
GSEA	Gen Set Enrichment Analysis
H&E	Hematoxylin und Eosin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Salzsäure
HSV	Herpes Simplex Virus
i.p.	intra peritoneal
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
Lk	Lymphknoten
logFC	Log2 fold change
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Phosphate-Buffered Saline + 0,1% Tween
PC	Principal component
PDAC	Adenokarzinom des Pankreas
rRNA	ribosomale Ribonuklein Säure
RT	Raumtemperatur
s.c.	sub cutan
SDS	Natriumdodecylsulphat
Tgf $\beta$	transforming growth factor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 1. Einleitung

### 1.1 **Duktales Pankreaskarzinom**

Über 13.000 Menschen erkranken jährlich in Deutschland an malignen Tumoren des Pankreas und über 40.000 jedes Jahr in den USA. 75 bis 90% dieser Karzinome sind duktale Adenokarzinome (PDAC). (Cubilla and Fitzgerald 1975; Cubilla, Fitzgerald et al. 1984) Damit sind Pankreaskarzinome die zehnthäufigste Krebserkrankung. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% haben Pankreastumoren eine äußerst schlechte Prognose und sind deshalb die vierthäufigste tumorassoziierte Todesursache in Deutschland und in den USA. Als Ursachen für diese schlechte Prognose werden eine frühe Metastasierung und eine späte Diagnosestellung diskutiert. Fast 80% der Patienten leiden bei Diagnosestellung bereits an einem lokal fortgeschrittenen Karzinom, da die Krankheit meist lange symptomlos verläuft, bevor Beschwerden wie endokrine oder exokrine Insuffizienz, Schmerzen und obstruktive Symptome wie zum Beispiel Cholestase auftreten. (Jemal, Siegel et al. 2010; Robert-Koch-Institut 2010) 78% der PDAC befinden sich im Kopf und je 11% in Corpus und Cauda. (Sener, Fremgen et al. 1999) Da PDAC schlecht auf alleinige Radio- und Chemotherapie ansprechen, ist die einzige potentiell kurative Therapie die Resektion. (Stathis and Moore 2010) Diese ist allerdings meist nur möglich, solange das PDAC nicht metastasiert oder benachbarte Strukturen infiltriert hat. So wurden von 100.000 Patienten mit Pankreaskarzinom der National Cancer Data Base der USA von 1985 bis 1995 nur 9% operiert. Nach kurativer R0 Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 25,4%. Nach zehn Jahren sinkt diese allerdings auf nur noch 8,2%. Ursächlich hierfür sind neben anderen Faktoren insbesondere disseminierte Tumorzellen und Mikrometastasen. (Richter, Niedergethmann et al. 2003; Schneider, Siveke et al. 2005) Neben der späten Diagnosestellung im fortgeschrittenen Tumorstadium verdeutlicht dies die Bedeutung früher Metastasierung für die schlechte Prognose des PDAC.

## 1.2 Metastasierung

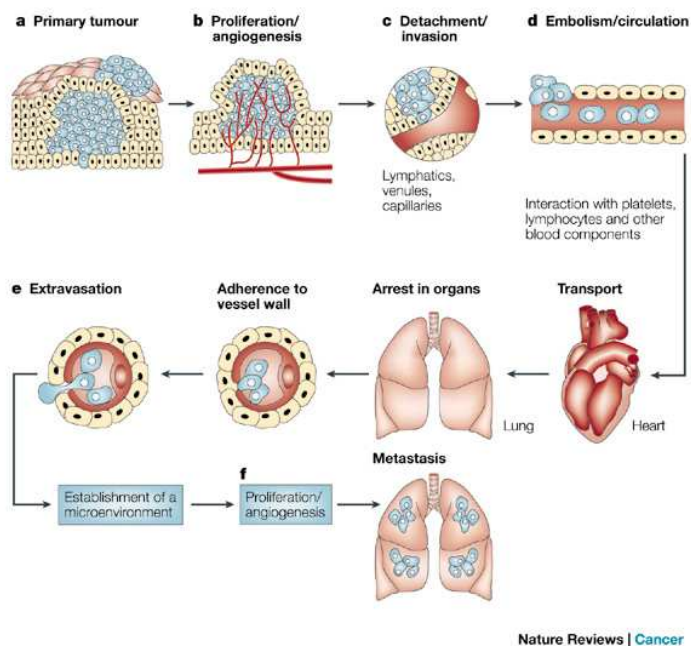
### 1.2.1 Metastasierung des duktales Pankreaskarzinoms

PDAC metastasieren früh per continuitatem in benachbarte Strukturen wie das Peritoneum, perineural entlang der Nervenscheiden oder lymphogen und hämatogen bevorzugt in Lymphknoten, Leber und Lunge.

### 1.2.2 Metastasierungsmodelle

Bereits 1975 beschäftigten sich Bross et al. mit der Frage der Pathogenese von Metastasen. (Bross, Viadana et al. 1975) Prognostisch ist insbesondere von Bedeutung, wann es im Krankheitsverlauf des PDAC zur Dissemination kommt, d.h. wann alle Tumorzellen oder nur eine Subpopulation der Zellen dieses Tumors die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen.





**Abbildung 1: Schritte der Metastasierung**

a | Zelltransformation und Tumorwachstum.

b | Eine umfangreiche Vaskularisierung ist Voraussetzung für weiteres Tumorwachstum ab einer Tumorgöße von 1-2 mm im Durchmesser.

c | Lokale Invasion in umgebendes Bindegewebe durch einzelne Tumorzellen erfolgt mittels mehrerer parallel ablaufender Vorgänge.

d | Die Ablösung und Embolisierung einzelner Tumorzellen oder –zellverbänden erfolgt als nächster Schritt. Die meisten zirkulierenden Tumorzellen werden jedoch rasch zerstört. Die zirkulierenden Zellen, die überleben, verfangen sich im Kapillarbett anderer Organe. Sie heften sich dort entweder an Endothelzellen oder – falls exponiert – an die subendotheliale Basalmembran.

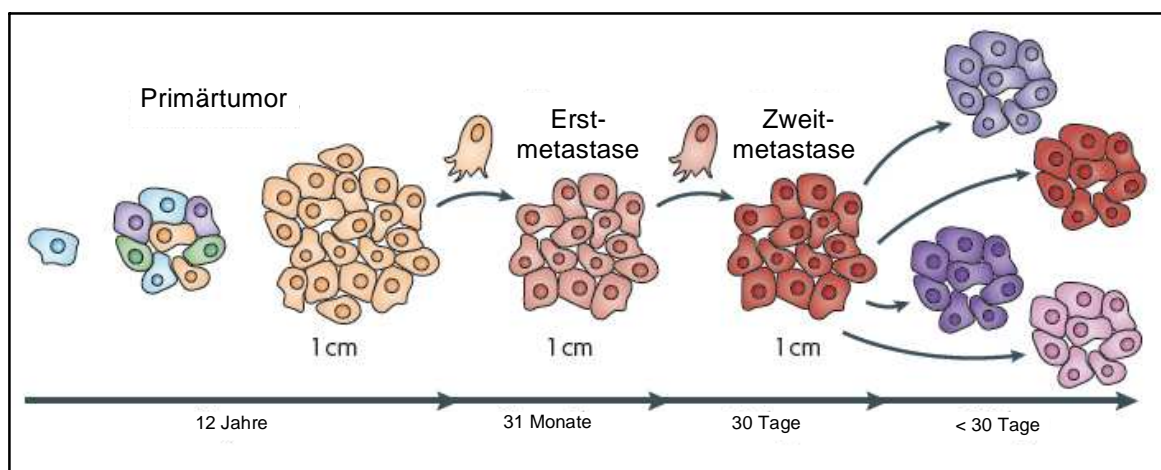
e | Als nächstes findet der Austritt aus dem Gefäßsystem statt. Dieser erfolgt wahrscheinlich mittels Mechanismen, die denen der Invasion gleichen.

f | Als letzter Schritt der Metastasierung findet die Proliferation im Parenchym des betroffenen Organs statt. Um weiter zu wachsen, müssen die Micrometastasen eine Gefäßversorgung ausbilden und den lokalen Abwehrmechanismen entgehen.

Aus (Fidler 2003)

Seitdem wurden verschiedene Modelle zur Metastasierung aufgestellt, um diese und weitere Fragen, wie z.B. welche einzelnen Schritte zur Metastasierung nötig sind und ob Metastasierung organspezifisch ist, zu beantworten. Weinberg und Fidler fassen den Ablauf der Metastasierung wie

folgt zusammen. (Fidler 2003; Weinberg 2007) Die einzelnen Schritte lassen sich grob in Dissemination und Kolonisation unterteilen. Dabei wird davon ausgegangen, dass diese Schritte zum einen von den genetischen Veränderungen der Tumorzelle und zum anderen von den Merkmalen des lokalen Gewebes am Ort der Metastase abhängen. (Coghlin and Murray 2010) Bezüglich des Erwerbs der genetischen Mutationen der Metastasenzelle gibt es nach wie vor unterschiedliche Theorien, deren Belege sich zum Teil sogar widersprechen. Zum einen steht die Vermutung, dass nur einzelne so genannte Tumorstammzellen das Potential zum Metastasieren haben (Al-Hajj, Wicha et al. 2003) oder im Krankheitsverlauf erwerben (Yachida, Jones et al. 2010), der Theorie gegenüber, dass jede Zelle eines Tumors von Beginn an über dieses Potential verfügt (Weigelt, Glas et al. 2003). Zum anderen gibt es einerseits Theorien, die eine lineare Tumorprogression propagieren, andererseits auch Theorien, die für eine parallele Progression sprechen.



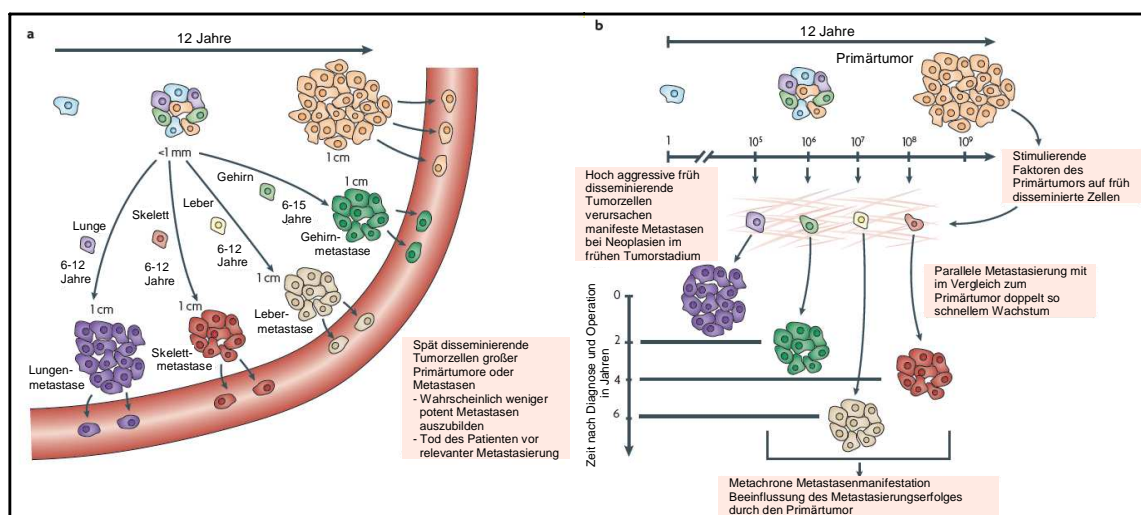
**Abbildung 2: Linear Progression Model**

Während der lokalen Tumorprogression wurden aggressive Zellen selektioniert. Diese initiieren die Zelldissemination. Im Primärtumor und in den Zweitmetastasen wurden die Zellen zunehmend bösartiger. Der Patient stirbt an einem finalen von Metastasen ausgehenden Metastasierungsschub.

Nach (Klein 2009)

Die Theorie der linearen Entwicklung geht davon aus, dass Zellen eines Tumors im Krankheitsverlauf Mutationen anhäufen, die das Metastasieren

ermöglichen. Von diesen Metastasen aus kann es dann zur weiteren Zelldissemination und einer so genannten Metastasenkaskade mit Zweit- und Drittmastasen kommen. (Bross, Viadana et al. 1975; Yachida, Jones et al. 2010)



**Abbildung 3: Parallel Progression Model**

a | Im Modell der frühen Zelldissemination und der parallelen Tumorprogression beginnt die Dissemination bei einem Durchmesser des Primärtumors von 1–4 mm. Es kommt zur parallelen Kolonisation in mehreren Organen und es bilden sich solide Metastasen innerhalb von sechs (Verdopplungszeit des Tumorumens (TVDT) in Metastasen doppelt so schnell wie im Primärtumor) bis zwölf Jahren (TVDT in Metastasen und Primärtumor gleich).

b | Im Modell der parallelen Tumorprogression können mehrere Wellen der Dissemination von Tumorzellen vor Diagnosestellung erfolgen und sich unterschiedlich schnell in verschiedenen Organen parallel weiterentwickeln. Vom Primärtumor ausgeschüttete Faktoren können die Kolonisation stimulieren und für den Zusammenhang zwischen Metastasierung und fortgeschrittenem Krankheitsverlauf verantwortlich sein.

Nach (Klein 2009)

Im Rahmen der Theorie der parallelen Entwicklung dagegen wird vermutet, dass bereits in einem frühen Tumorstadium Zellen disseminieren, ein Teil dieser Zellen in der Zirkulation oder in fremden Gewebe persistiert und sich parallel zum Primärtumor entwickelt bis es zur Ausbildung von Metastasen kommt. (Kuukasjarvi, Karhu et al. 1997; Klein, Blankenstein et al. 2002;

Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003; Weigelt, Peterse et al. 2005; Husemann, Geigl et al. 2008; Coghlin and Murray 2010)

### **1.3 Genexpressionsprofile**

Genexpressionsprofile sind eine quantitative Momentaufnahme der in den Zellen transkribierten Gene, die wiederum Funktion und Phänotyp dieser Zelle maßgeblich bestimmen. So konnte z.B. beim Mammakarzinom gezeigt werden, dass sich Tumoren anhand ihrer Genexpression unterscheiden lassen (Perou, Sorlie et al. 2000; West, Blanchette et al. 2001) und dass definierten Expressionsprofilen Untergruppen mit schlechter Prognose aufgrund früher Metastasierung zugeordnet werden können. So lassen sich im Sinne einer personalisierten Tumortherapie Patienten selektionieren, die von einer adjuvanten Therapie profitieren (van 't Veer, Dai et al. 2002). Dadurch sinkt die Anzahl der nötigen Behandlungen (NNT) für adjuvante Therapien und entsprechend werden Patienten unnötige Behandlungen (Chang, Nuyten et al. 2005) erspart sowie unnötige Kosten vermieden.

Ähnliche Genexpressionssignaturen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, konnten für unterschiedliche Tumorentitäten wie unter anderem für das Adenokarzinom der Lunge (Beer, Kardia et al. 2002) bzw. für alle nicht kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) (Potti, Mukherjee et al. 2006), das Ovarialkarzinom (Berchuck, Iversen et al. 2005), oder das Prostatakarzinom (Singh, Febbo et al. 2002) erstellt werden. Unabhängig vom Ursprungsgewebe konnte zur Unterscheidung zwischen metastasierenden und nicht metastasierenden Tumoren sogar eine spezifische Gensignatur erstellt werden. (Ramaswamy, Ross et al. 2003).

Durch den Vergleich von Genexpressionsprofilen verschiedener Gewebe wie z.B. zwischen gesundem Gewebe und Primärtumor oder zwischen Primärtumor und Metastase lassen sich zudem differentiell exprimierte Gene oder Signalkaskaden herausfiltern, die für den unterschiedlichen Phänotyp der Zellen oder deren unterschiedliche Eigenschaften wie Malignität, Tumorgenese oder Metastasierungspotential verantwortlich sein könnten. (Missiaglia, Blaveri et al. 2004)

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, durch den Vergleich der Genexpression in Metastase und Primärtumor Rückschlüsse bezüglich der Metastasierungsmodelle zu ziehen (Weigelt, Glas et al. 2003).

#### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Diese Arbeit beschreibt die orthotope Implantation humaner Pankreaskarzinomzellen in Nacktmäuse. Mittels Zellisolation aus den Metastasen können Genexpressionsprofile von nicht metastasierenden und metastasierenden Primärtumoren sowie Metastasen miteinander verglichen und differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Deren Funktion und mögliche Relevanz für die Metastasierung oder einzelne Schritte der Metastasierung werden im Folgenden diskutiert.

Abschließend wird untersucht werden, ob sich anhand des Metastasierungsverhaltens der differentiell exprimierten Gene oder anhand ganzer Expressionsprofile Rückschlüsse auf die einzelnen Metastasierungsmodelle und hinsichtlich einer organspezifischen Metastasierung ziehen lassen und inwiefern der Phänotyp der Ausgangszelllinie (epitheliale BxPc3 versus mesenchymale MiaPaCa-2) bei der Metastasierung von Bedeutung ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeine Materialien**

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien haben mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse“. Autoklavierte Lösungen und Materialien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck inkubiert.

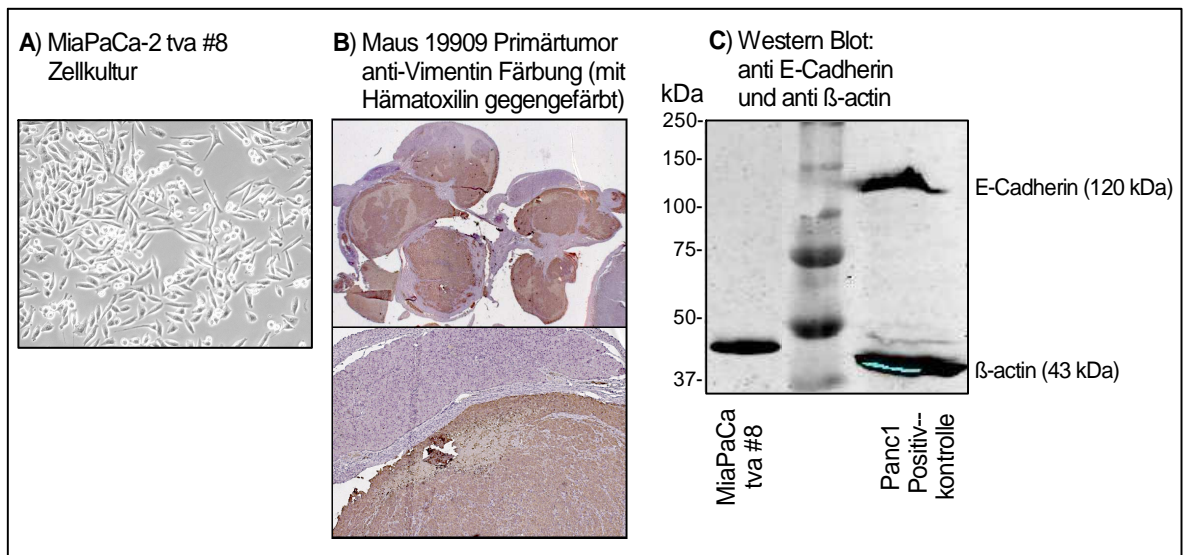
### **2.2 Zellkultur**

#### 2.2.1 Verwendete Zelllinien

##### 2.2.1.1 MiaPaCa-2

Als Ausgangszelllinie dienten MiaPaCa-2 Zellen. MiaPaCa-2 sind Zellen eines humanen duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC) (Yunis, Arimura et al. 1977). Die Zellen stammen aus einem G3-differenzierten Primärtumor und bilden nach Implantation in Nacktmäuse histologisch erneut G3-differenzierte Tumoren (Sipos, Moser et al. 2003). MiaPaCa-2 Zellen zeigen keine Polarität und exprimieren kein E-Cadherin, jedoch ausgeprägt Vimentin (>50% der gefärbten Zellen) (Sipos, Moser et al. 2003). In Kultur wachsen MiaPaCa-2 Zellen im losen Zellverbund mit mesenchymalem Phänotyp.

Zu den weiteren Versuchen wurden die MiaPaCa-2 Zellen mit einer firefly Luciferase (fLuc), dem grün fluoreszierenden Protein eGFP, einer Geneticin Resistenz und dem tva-Rezeptor des aviären RCAS-tva Systems zum retroviralen Gentransfer (Hughes, Greenhouse et al. 1987; Bates, Young et al. 1993; Federspiel, Bates et al. 1994) unter der Kontrolle des  $\beta$ -actin Promoters stabil transfiziert. Es wurde Klon 8 der Transfektion für die weiteren Versuche verwendet.



**Abbildung 4: Mesenchymaler Phänotyp der MiaPaCa-2 Zellen**

MiaPaCa-2 tva #8 Zellen in A) Zellkultur, B) Immunhistochemischer Färbung mit anti humanem Vimentin, C) anti E-Cadherin Westernblot

#### 2.2.1.2 BxPc3

Für eine weitere Validierung der differentiell exprimierten Gene wurden weitere Expressionsprofile in die bioinformatischen Vergleiche mit einbezogen. Deren Ausgangszelllinie bildeten BxPc3 Zellen.

BxPc3 Zellen sind ebenfalls Zellen eines humanen PDAC aus einem G2-differenziertem Primärtumor. Nach Implantation in Nacktmäuse bildeten sie G2/G3-differenzierte Pankreastumoren (Tan, Nowak et al. 1986). BxPc3 Zellen exprimieren nur wenig Vimentin (<10% der gefärbten Zellen) (Sipos, Moser et al. 2003) und wachsen in Kultur im dichtem Zellverbund mit epithelialem Phänotyp.

#### 2.2.2 Kulturbedingungen

MiaPaCa-2- und aus Nacktmäusen isolierte Tumorzellen wurden in D-MEM mit 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin und 5% Genitacin kultiviert. Zum Passagewechsel wurden die Zellen mit 10x PBS gewaschen, fünf bis sechs Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert, Trypsin mit der doppelten Menge serumhaltigen Mediums inaktiviert, die Zellen abzentrifugiert (5min, 1000rpm, 24°C) und das Pellet in neuem Medium resuspendiert. Für 25 cm<sup>2</sup>

Kulturflaschen wurde 3 ml Medium und 0,4 ml Trypsin/EDTA, für 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen 10ml Medium und 1 ml Trypsin/EDTA und für 175 cm<sup>2</sup> Flaschen 25 ml Medium und 2 ml Trypsin/EDTA verwendet. Zellen in Kultur wurden bei einer Temperatur von 37° C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5% gehalten.

### 2.2.3 Herstellung von Dauerkulturen

Zum Herstellen von Dauerkulturen wurden alle Zellen mit 10x PBS gewaschen, fünf bis sechs Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert, Trypsin mit serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellen abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Gefriermedium resuspendiert, in Gefriergefäße (Nunc<sup>TM</sup> Brand Products, Naperville, IL,USA) à 1 ml aliquotiert, diese sofort auf Eis gestellt, langsam auf - 80° C gekühlt und danach in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das erneute Auftauen erfolgte im 37° C warmen Wasserbad. Danach wurden die Zellen in Medium resuspendiert. An den ersten beiden Tagen erfolgte ein täglicher Mediumwechsel.

## 2.3 Mausmodell

Alle Tierversuche sind unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-7/05 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 2.3.1 Maus

Es wurden ausschließlich Swiss Nu/Nu Mäuse verwendet. Diese Mäuse sind homozygot bezüglich des mutierten „nude“ Gens. Dies führt zu einer fehlenden Behaarung der Tiere. (Flanagan 1966) Für diese Arbeit wichtiger ist jedoch der aplastische Thymus als Folge dieser Genmutation und der daraus resultierende T-Zell-Defekt. (Pantelouris 1968) Aufgrund der folgenden schweren Immundefizienz tolerieren die Mäuse die Implantation allogener Zellen. (Wortis 1971) Die ersten Mäuse wurden von der Firma Charles River (Wilmington, USA) bezogen. Danach erfolgte die eigene Zucht. Geeignete Tiere dieses rezessiven Erbgangs wurden anhand des „nackten“ Phänotyps ausgewählt.



### 2.3.2 Orthotope Implantation

Für die Implantation wurden die Zellen gewaschen, abtrypsiniert und in serumhaltigem Medium resuspendiert. Dann wurde die genaue Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Das zum Erreichen der gewünschten Konzentration benötigte Volumen wurde berechnet und das Pellet nach dem Abzentrifugieren in der errechneten Menge reinem D-MEM resuspendiert. Implantiert wurden 20 µl dieser Zellsuspension mit je nach Mauspassagenzahl der jeweiligen Zelllinie  $10^4$  –  $10^6$  Zellen. Um eine konstante Konzentration dieser Suspension zu gewährleisten bzw. das Aggregieren der Zellen zu verhindern, wurde die Zellsuspension während der OP immer langsam in Bewegung gehalten.

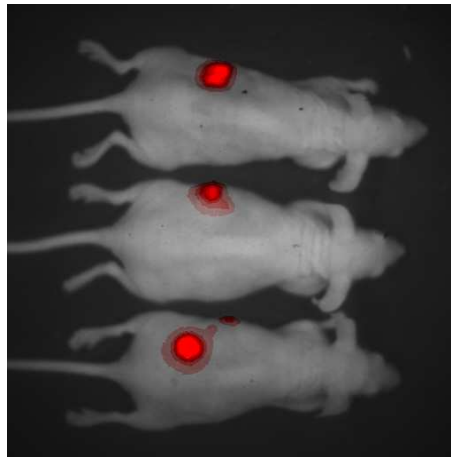
20 Minuten präoperativ wurde die jeweilige Maus mit 1,5 mg/kg KG Novalgin i.p. analgesiert, mit 70% EtOH desinfiziert und mit Bepanthen Augensalbe (Bayer, Leverkusen) versorgt, um einem Austrocknen der Hornhaut während der OP vorzubeugen.

Die Narkoseeinleitung und Aufrechterhaltung erfolgte mit Sauerstoff und Isofluran. Nach dem Haut- und Peritonealschnitt erfolgte die Darstellung des Pankreas und die orthotope Implantation der Zellsuspension mit einer Mikroliterspritze. Anschließend wurde das Peritoneum mit einer fortlaufenden Naht (Ethilon 5-0) und die Haut mit einer Klammernaht verschlossen.

Die postoperative Analgesie erfolgte gemäß Neiger-Aeschbacher (Neiger-Aeschbacher 2002) mit 1,5 mg/kg KG Metacam s.c.

### 2.3.3 In-vivo imaging

Mit Hilfe der stabil transfektionierten fLuc in den MiaPaCa-2 Zellen lässt sich das Tumorwachstum und die Metastasierung *in vivo* darstellen. Dazu wurden die Mäuse mit Bepanthen Augensalbe versorgt. Zudem wurde ihnen 85 µl Midazolam + Medetomidin + Fentanyl (MMF) zur Sedierung und 300 µl Luziferase i.p. appliziert. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten im Wärmekäfig bei 37° C erfolgten die Aufnahmen mit der Fluoreszenzkamera in Bauch-, Rücken- und rechter Seitenlage. Danach wurde das MMF mit 150 µl Atipamezol + Flumazenil + Naloxon (AFN) i.p. antagonisiert.



#### Abbildung 5: In-vivo Bildgebung

In-vivo Luciferase Bildgebung zur Überwachung von Tumorprogression und Metastasierung

#### 2.3.4 Mausdissektion

Sobald im *in vivo* imaging mittels fLuc multiple Metastasen sicher festgestellt wurden, die Maus einen tastbaren Tumor >1,5 cm aufwies oder unter einer Kachexie, einer Bewegungseinschränkung oder einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes litt, wurden die Versuchstiere nach Sedierung mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet.

Zehn Minuten vorher wurde jeder Maus 300  $\mu$ l Luciferase i.p. injiziert.

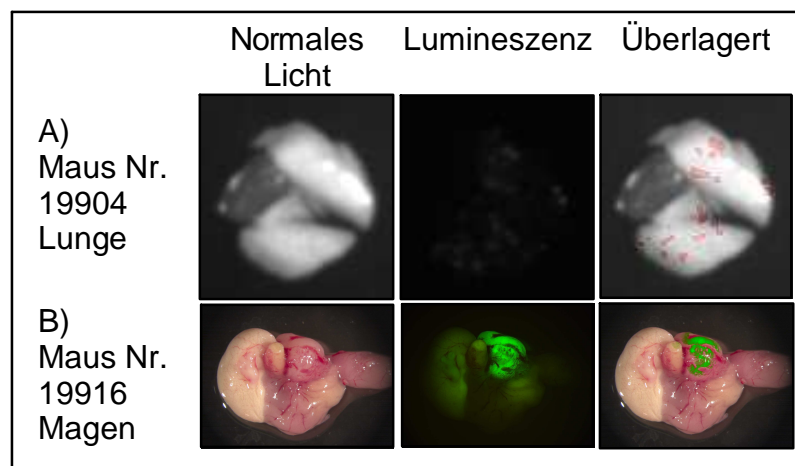
Zur Gewinnung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen wurde nach Abpräparieren der Haut mit einer mit 150  $\mu$ l sterilem EDTA (1%) gefüllten Spritze parasternal die rechte Herzkammer punktiert und ca. 1 ml Blut vorsichtig aspiriert.

Bei betroffenen Versuchstieren wurde zudem teilweise Aszites abpunktiert, um ebenfalls freie Tumorzellen zu isolieren.

Danach wurden mit jeweils neu desinfiziertem Besteck Pankreas und Milz mit Primärtumor, abdominale und thorakale Lymphknoten, Leber, Lunge mit Herz und weitere makroskopisch sichtbare Metastasen freipräpariert. Der Primärtumor und makroskopisch sichtbare Metastasen wurden vermessen. Daraufhin wurden alle entnommenen Organe mit Hilfe der fLuc unter einer

Fluoreszenzkamera nach Mikrometastasen untersucht. Bei unklarem Befund erfolgten vergrößerte Aufnahmen mit Hilfe eines Stereomikroskops. Unter UV-Bestrahlung emittieren die Tumorzellen aufgrund des eGFP grün fluoreszierendes Licht und lassen sich dadurch vom gesunden Gewebe unterscheiden.

Von mit Tumorzellen infiltrierten Geweben wurden anschließend Proben zur Zellisolation entnommen und das verbleibende Gewebe für die Histologie in Formaldehyd gegeben (siehe 2.4.1).



**Abbildung 6: Ex-vivo Bildgebung**

A) Ex-vivo Luciferase Bildgebung 19904 Lunge; B) ex-vivo eGFP Bildgebung 19916 Magen

### 2.3.5 Metastasenzellisolation

#### 2.3.5.1 Isolation freier Tumorzellen aus Aszitespunktat

Das Aszitespunktat wurde bei 1000 g fünf Minuten abzentrifugiert und das Pellet in komplettem Medium resuspendiert und in Kultur gebracht.

#### 2.3.5.2 Isolation von im Blut zirkulierenden Tumorzellen

Das abpunktierte EDTA-Blut wurde bei 0,2 rcf fünf Minuten zentrifugiert, so dass sich drei Schichten aus Erythrozyten, kernhaltigen Zellen und Serum ergaben. Das Serum in der obersten Schicht wurde vorsichtig abpipettiert. Die

verbleibenden beiden Schichten werden mit dem fünffachen Volumen an Erythrocyte Lysis Buffer verdünnt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Kernhaltige Zellen wurden dann abzentrifugiert (zehn Minuten bei 250 g), in komplettem Medium resuspendiert und in Kultur gebracht.

#### 2.3.5.3 Tumorzellisolation aus Gewebeproben

Die entnommenen Gewebeproben wurden in steriles PBS gegeben und mit zwei Skalpellenspitzen in kleine Stücke zerteilt. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann in komplettem Medium mit 200 U/ml Kollagenase 12 bis 36 Stunden inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (1000 rpm fünf Minuten) wurde das verbleibende Pellet in komplettem Medium resuspendiert und in Kultur gebracht.

Durch das Genitocin im Medium konnten nur dagegen resistente Tumorzellen in Kultur überleben. Nach drei bis fünf Zellpassagen wurden Dauerkulturen angefertigt (vgl. 2.2.4).

## 2.4 Histologie und Färbung

### 2.4.1 Organfixierung für Paraffinschnitte

Die entnommenen Organe wurden bei 4°C 16 Stunden mit Roti-Histofix fixiert, mit dem ASP300 Tissue Processor (Leica) dehydriert und in Paraffin gebettet. Es wurden mehrere Schnittserien mit drei bis zehn Schnitten mit einer Schnittdicke von 3 µm und einem Abstand zwischen den Serien von 100 µm von jedem Organ angefertigt (Microtom: Microm HM 355S, Thermo Scientific, Walldorf).

### 2.4.2 H&E Färbung

Das Paraffin der Paraffinschnitte wurde zuerst zehn Minuten mit HistoClear (Roti-Histol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst. Danach wurden Schnitte in EtOH mit abnehmenden Konzentrationen dehydriert (je vier Minuten in 100%, 96%, 80%, 70% EtOH), bevor sie zehn Sekunden in Hämatoxylin und 20 Sekunden in Eosin gefärbt wurden. Vor der abschließenden Einbettung mit Deckmedium (Pertex, mediate, Burgdorf,

Deutschland) folgte eine erneute Dehydratation mit aufsteigenden EtOH Konzentrationen (je eine Minute in 70%, 80%, 96%, 100% EtOH) und erneuten zehn Minuten in HistoClear.

### 2.4.3 Immunhistochemie

Paraffinschnitte für immunhistochemische Färbungen wurden wie bei der H&E Färbung entparaffinisiert und dehydriert. Danach erfolgte das Freilegen der Antigene durch Kochen mit Unmasking Lösung (Vector Labs) für neun Minuten in der Mikrowelle sowie das Blocken der endogenen Peroxidase durch Inkubieren der Schnitte in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) für zehn Minuten. Um Fehlfärbung durch unspezifisch bindende Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte eine Stunde im Serum (5%) des Tieres, in dem der 2. Antikörper hergestellt wurde, inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper bei 4° C (Monoclonal Mouse Anti-Vimentin). Dieser Antikörper reagiert mit humanem – nicht jedoch mit murinem Vimentin.

Um eine unspezifische Färbung durch Reaktion des 2. Antikörpers (Anti-Mouse) mit endogenen Immunglobulinen im Mausgewebe zu vermeiden, wurden die Schnitte mit einem „Mouse on Mouse“ Kit (M.O.M Immunodetection Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) entsprechend dem Protokoll des Herstellers behandelt.

Die Inkubation mit dem biotinylierten 2. Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur (RT). Nach 30 Minuten in ABC-Lösung (Vector Labs) bei RT wurde die Färbung der Schnitte mit DAB-Lösung (Vector Labs) unter mikroskopischer Kontrolle vorgenommen bis die braune Färbung sichtbar wurde. Abgeschlossen wurde der Vorgang mit einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin für zehn Sekunden. Die folgende Dehydrierung und die Einbettung in Mounting Deckmedium erfolgte wie in 2.4.2 beschrieben.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies-Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Monoclonal Mouse Anti-Vimentin	Maus	1:500 in PBS mit 3% Serum	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti-Mouse Immunglobulin	Ziege	1:200 in PBS mit 3% Serum	Vector Laboratories, Burlingame, USA

---

**Tabelle 1: Erst- und biotinylierter Zweitantikörper IHC****2.5 Molekulare Methoden****2.5.1 Protein-Isolation und Western Blot**

Mittels Antigen-Antikörper-Reaktion im Western Blot wurden Proteine nachgewiesen. Dazu wurde die Konzentration der aus Zellen isolierten Proteine nach Bradford bestimmt, gleiche Proteinmengen durch Bindung an anionisches SDS negativ geladen und in einem Polyakrylamidgel durch Anlegen von Spannung entsprechend der Proteingröße aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und durch Antigen-Antikörper-Interaktion nachgewiesen.

**2.5.1.1 Protein-Isolation**

Die Zellen wurden zur Protein-Isolation in 78 cm<sup>2</sup> Schalen ausgesät. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80% des Schalenbodens erreichten, wurde das Medium abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach Verwerfen des PBS wurde 200 µl IP-Puffer (50 mM HEPES 7,9 pH, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% NP-40, 10% Glycerol) mit Proteinase- und Phosphataseinhibitor (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) - beides in einer Konzentration von 1:100 - auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden abgekratzt und sofort für 30 Minuten bei -80° C tiefgekühlt. Anschließend wurden die Proben 20 Minuten bei 4°C und 16000g zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren oder bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gestellt.

**2.5.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Nach der Proteinisolation wurde die Konzentration der Proteinlösung nach Bradford bestimmt. Die Proben wurden für die Messung im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt. In einer 96-Well Platte wurden pro benötigtes Well 200 µl im Verhältnis 1:5 mit aqua dest. verdünntem „Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ (BioRad, Hercules, USA) und 10 µl der verdünnten Probe oder 10 µl einer Standardreihe mit bekannten Konzentrationen an bovinem Albumin pipettiert und 30 Minuten bei RT inkubiert. Bei Proteinbindung ändert „Protein

Assay Dye Reagent Concentrate“ sein Absorptionsmaximum. So konnte die Konzentration der Probe durch Vergleich mit der Standardreihe und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit einem Elisa-Reader (BioRad, Hercules, USA) photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt werden.

### 2.5.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einer MiniGel Apparatur (BioRad, Hercules, USA) durchgeführt. Dazu wurde ein Trenngel gegossen und durch Auffüllen mit destilliertem H<sub>2</sub>O polymerisiert. Nach 20 Minuten Trocknen wurde das H<sub>2</sub>O verworfen und ein Sammelgel aufgegossen, in dem mit einem Kamm zehn Taschen gebildet wurden.

<u>Reagenz</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
aqua dest.	2359 µl	1500 µl
Sammelgelpuffer (0,5 M TRIS/HCl pH 6,8)		650 µl
Trenngelpuffer (1,5 M TRIS/HCl pH 8,8)	1350 µl	
30% Acrylamid	1350 µl	375 µl
10% Natriumdodecylsulphat (SDS)	50 µl	25 µl
10% Ammoniumpersulfat	25 µl	12,5 µl
Tetramethylethylendiamin	7,5 µl	5 µl

**Tabelle 2: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel Western Blot**

Die Taschen wurden mit der jeweils gleichen Proteinmenge und mit dem Protein Standard „Precision Plus Protein All Blue Standard“ (BioRad, Hercules, USA) befüllt und die gesamte Apparatur mit einfach Ladepuffer (0,2 M Glycin, 0,025 M TRIS und 0,1% SDS; pH 8,3) aufgefüllt.

Zur Elektrophorese wurden während der Passage durch das Sammelgel eine Stromstärke von 20 mA und durch das Trenngel von 30 mA angelegt.

### 2.5.1.4 Western Blot

In einer Protean II Blotting Apparatur (BioRad, Hercules, USA) wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid Membran übertragen. Diese wurde dafür zuvor mit 100% Methanol aktiviert, mit aqua

dest. gewaschen und mit dem Gel zwischen jeweils drei – mit einfach Transferpuffer (0,04 M Glycin, 0,05 M TRIS, 20% (v/v) Ethanol und 0,04% SDS) getränkte – Whatmanpapiere auf die Blotting Apparatur gelegt. Durch Anlegen einer Stromstärke von 150 mA für 25 Minuten wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

Anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen der Membran eine Stunde bei RT mit ODYSSEY Blocking-Puffer (LI-COR, Lincoln, USA) gesättigt und die Membran bei 4° C und langsamen Schwenkbewegungen über Nacht mit dem 1. Antikörper inkubiert. Mit PBS-T (PBS + 0,1% Tween [Sigma-Aldrich, St. Louis, USA]) wurde die Membran danach fünf Mal je fünf Minuten auf einer Schwenkplattform gewaschen und eine Stunde bei RT mit dem 2. – an einen Fluoreszenzfarbstoff gebundenen – Antikörper lichtgeschützt inkubiert.

Bevor die Membran mit dem „Odyssey Infrared Imaging System“ eingescannt und mit der „Odyssey Software R 1.2“ (beides LI-COR, Lincoln, USA) bearbeitet wurde, wurde diese erneut unter kontinuierlichem Schwenken fünf Mal je fünf Minuten mit PBS-T gewaschen.

Zur quantitativen Abschätzung der Western Blot Banden, wurde jede Membran 30 Minuten mit Stripping Puffer von den alten Banden gesäubert, wiederum fünf Mal wie bereits geschildert mit PBS-T gewaschen, erneut für 30 Minuten mit ODYSSEY Blocking-Puffer bei RT inkubiert und daraufhin wurden nach beschriebenen Ablauf durch nochmalige Antikörperinkubation  $\beta$ -actin Banden dargestellt.

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies-Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Fluoreszenzkanal</u>	<u>Hersteller</u>
E-Cadherin	Maus	1:500 in PBS mit 3% Serum		DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Anti- $\beta$ -actin	Maus	1:2000 in PBS mit 3% Serum		Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-Mouse Immunglobulin	Ziege	1:200 in PBS mit 3% Serum	680 nm	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

**Tabelle 3: Antikörper Western Blot**



### 2.5.2 Genexpressionsanalyse

Für die Analyse differentiell exprimierter Gene (DEG) und das Erstellen von Metastasen-typischen Genexpressionsprofilen wurden 13 Zelllinien ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand der Kriterien Metastasierungsverhalten und Organherkunft der Zelllinien sowie anhand sinnvoller Vergleichsmöglichkeiten zwischen Primärtumorzellen, zirkulierenden Zellen und Metastasenzellen. Zur Analyse mittels Microarrays wurde die komplette RNA der Zellen verwendet. Es wurde der GeneChip HG U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet, der 47.000 Transkripte beinhaltet, die 21.000 definierte Gene kodieren.

#### 2.5.2.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden die Zellen in 25 cm<sup>2</sup> Schalen ausgesät und bei einer Zellkonfluenz von 70 bis 80% der Fläche wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert und aufbereitet. Die Reinheit der RNA wurde mit einem NanoDrop Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm überprüft. Alle 13 Proben wiesen dabei einen 260/280 Quotient zwischen 1,9 und 2,1 auf. (Hoffman, Awad et al. 2004) Dabei wurde ebenfalls die RNA-Konzentration der einzelnen Proben photometrisch ermittelt. Durch eine Gelelektrophorese mit Positivkontrollen wurde die Qualität der RNA ein weiteres Mal gesichert. Nicht kontaminierte und nicht degradierte RNA lief dabei in zwei Banden entsprechend den 28S und 18S rRNA Untereinheiten, die ein Intensitätsverhältnis von 2:1 aufwiesen. (Sambrook and Russell 2001)

#### 2.5.2.2 Microarray Analyse

Nachdem die Integrität der RNA sichergestellt war, wurden die Proben mit dem Affymetrix GeneChip One Cycle cDNA Synthesis Kit per reverse transkriptase in cDNA umgeschrieben und dann mit dem Affymetrix GeneChip IVT Labeling Kit zu biotiniertes cRNA transkribiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben mit dem Affymetrix GeneChip Sample Clean Up Module gereinigt. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß dem Affymetrix

GeneChip Handbuch durchgeführt. Die weiteren Schritte (Fragmentation, Hybridisierung, Färben und Scannen) wurden von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Reinhard Hoffmann (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München) durchgeführt. Bevor die Proben an die Arbeitsgruppe von PD Dr. Hoffmann weitergegeben wurden, wurde erneut die Reinheit und Konzentration der einzelnen cRNA Proben photometrisch überprüft (vgl. 2.5.3.1). Um Größe und Ausbeute der biotinierten cRNA Transkripte zu überprüfen, wurde zudem eine weitere Gelelektrophorese durchgeführt.

### 2.5.2.3 Bioinformatische Auswertung

Die Auswertung der Microarray-Daten erfolgte durch das Team von Dr. Philipp Pagel am Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der TU München.

Um die Vergleichsdaten zu analysieren wurde ‚limma‘ (Teil eines R-Bioconductor open-source-Softwarepakets) verwendet. Um Signalunterschiede, die durch Variationen der einzelnen Microarray-Chips oder durch die unterschiedliche Position der Proben auf den Chips verursacht wurden, zu korrigieren, wurden die Daten mittels ‚print-tip loess normalization‘ normalisiert. (Smyth and Speed 2003) Anhand eines linearen Modells für jedes Gen ermittelt ‚limma‘ einen logarithmischen Expressionsquotient und damit DEGs. (Smyth 2004)

Um die Expressionsprofile auf die gemeinsame Dysregulation ganzer Signalkaskaden oder verwandter bzw. miteinander interagierender Proteine zu untersuchen, wurden ‚gene set enrichment‘-Analysen (GSEA) durchgeführt. Dafür wurden Gensets der ‚Molecular Signatures Database‘ verwendet. In dieser Datenbank befinden sich Gensets, die nach ihrer chromosomalen Position, nach in der Literatur beschriebenen Signalwegen (PubMed, etc.), nach ihrer Regulation über ähnliche Bindungsstellen, nach ihren Korrelationen mit bekannten Karzinogenese-assoziierten Genen oder nach entsprechenden Gene Ontology (GO) Termini zusammengestellt wurden. (Mootha, Lindgren et al. 2003; Segal, Friedman et al. 2004; Subramanian, Tamayo et al. 2005) Bei der eigentlichen GSEA wurde die von Kim et al. beschriebene

Weiterentwicklung der GSEA, die ‚parametric analysis of gene set enrichment‘ (PAGE) angewandt. (Kim and Volsky 2005)

Da trotz eines Signifikanzniveaus von  $P < 0,05$  aufgrund der großen Anzahl an Genen und der entsprechend hohen Anzahl an Analysen falsche Ergebnisse auftreten können, wurden diese falschen Ergebnisse nach der von Benjamini et al. beschriebenen Methode auf das Signifikanzniveau von weniger als 5% begrenzt. (Benjamini and Hochberg 1995)

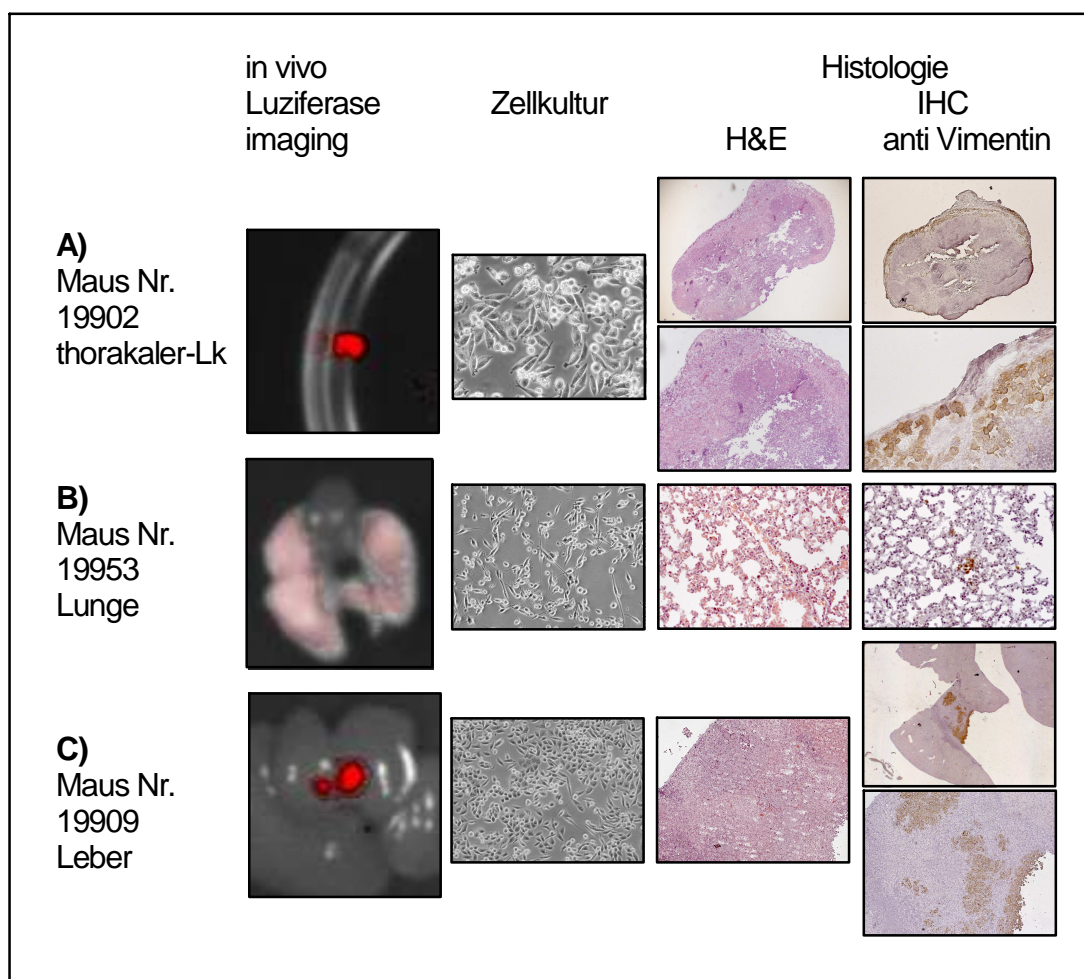
## **2.6 Statistische Auswertung**

Zur Prüfung der weiteren, nicht aus den Genexpressionsprofilen stammenden Ergebnisse dieser Arbeit auf deren statistische Signifikanz wurde zunächst kontrolliert, ob die jeweiligen Daten normalverteilt sind oder nicht. Dies erfolgte mit dem ‚Shapiro-Wilk Normality Test‘. (Shapiro and Wilk 1965) Zur Prüfung der Signifikanz wurden danach die dem Datensatz entsprechenden statistischen Tests (z.B. Mann Whitney U Test, Chi-Quadrat-Test, Fisher’s Exact Test) durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Metastasierungsverhalten von BxPc3 und MiaPaCa-2 Zellen**

Je nach Metastasierung wurden die einzelnen Mäuse den Gruppen ‚Maus mit Lymphknotenmetastasierung‘, ‚Maus mit Lebermetastasierung‘, ‚Maus mit Lungenmetastasierung‘ und ‚Maus mit metastasiertem Primärtumor‘ zugeordnet. Dazu wurden die einzelnen Organe der Mäuse nach Sektion makroskopisch und mit Hilfe von Luciferase und eGFP-Bildgebung auf Metastasen untersucht. Zur weiteren Sicherung der Metastasierung erfolgten danach eine histologische Aufarbeitung des verdächtigen Gewebes und der Versuch der Zellisolation und Kultivierung in genitocin-haltigem Medium. Nur wenn alle drei Untersuchungen den Befund Metastase positiv bestätigten, wurde die Maus den jeweiligen Gruppen zugeordnet. Lediglich bei Lungenmetastasen wurde der Befund teilweise nur aufgrund positiver Bildgebung und Histologie gestellt, da sich eine Zellisolation aus Lungengewebe als sehr schwierig erwies. Um eine Metastasierung per continuitatem auszuschließen, wurden bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich thorakale Lymphknoten für die Klassifizierung herangezogen.



**Abbildung 7: Befundung der isolierten Metastasen**

Exemplarische Analyse der isolierten Metastasen in A) einem Lymphknoten, B) der Lunge, C) der Leber

Im Lungengewebe fanden sich keine soliden Metastasen, sondern eine diffuse Infiltration mit disseminierten Tumorzellen, die oft histologisch mit einer Verdickung der Alveolarsepten einher ging. Dies kann auch die Schwierigkeiten bei der Zellisolation aus Lungengewebe erklären.

## 3.1.1 MiaPaCa-2 weisen ein hohes primäres Metastasierungspotential auf

<u>Zelllinie</u>	<u>Maus- passage</u>	<u>mittleres Überleben</u>	<u>Metastasierung</u>			
			<u>Lymph- knoten</u>	<u>Leber</u>	<u>Lunge</u>	<u>gesamt</u>
MiaPaCa	1	74 d	60%	20%	80%	90%
1640 Lymphknoten	2	41,5 d	30%	0%	30%	60%
1640 Leber	2	53 d	13%	0%	25%	25%
19902 th-Lk2	2	78 d	25%	0%	25%	50%
19908 Leber	2	93,5 d	80%	60%	60%	80%
19909 Leber	2	63.5 d	0%	0%	0%	0%
19917 abd Lk 1	2	66d	0%	0%	0%	0%
19953 Lunge 2	3	65 d	50%	0%	50%	75%
19951 vBlut	3	80 d	0%	25%	75%	75%

**Tabelle 4: Metastasierungspotential der orthotop implantierten MiaPaCa-2 Zelllinien**

Eine Selektion von Zellen mit hohem Metastasierungspotential durch wiederholte Reimplantation von Metastasenzellen lässt mit jeder Mauspassage ein höheres Metastasierungspotential der implantierten Zellen erwarten.

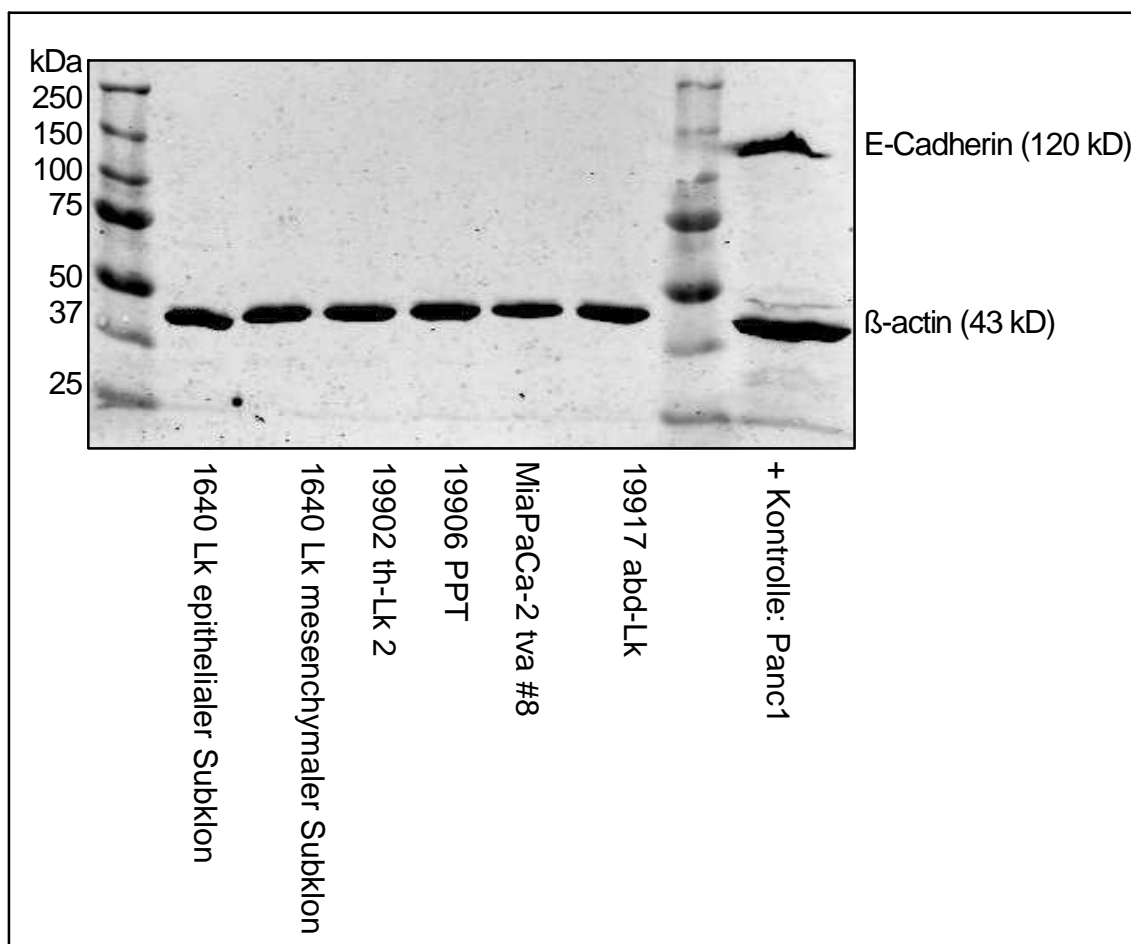
Bereits bei der Erstimplantation bildeten 90% der Versuchstiere Metastasen. In der zweiten Mauspassage wurden sowohl Zellklone mit hohem Metastasierungspotential als auch Zellen, die nicht metastasierten, implantiert. Der Rückgang auf ein durchschnittliches Metastasierungspotential von 47% in der zweiten Mauspassage ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Unterschiede zwischen zweiter und dritter sowie zwischen erster und dritter Mauspassage sind jedoch nicht signifikant. (Fisher's Exact Test)

Anders verhielt es sich bei den phänotypisch epithelialen BxPc3-Zellen. Diese begannen mit einem Metastasierungspotential von nur 25% und metastasierten mit jeder Mauspassage häufiger. Statistisch signifikant ist dabei jedoch nur der Anstieg von 55% bei Mauspassage 2 auf 70% bei Mauspassage 3. (Fisher's Exact Test)

<u>Zelllinie</u>	<u>Maus- passage</u>	<u>Überleben Median</u>	<u>Metastasierung</u>			
			<u>Lymph- knoten</u>	<u>Leber</u>	<u>Lunge</u>	<u>gesamt</u>
BxPc3	1	72 d	17%	8%	8%	25%
52335 Lunge	2	58 d	22%	11%	55%	55%
0008 Lunge	3	80 d	20%	0%	50%	70%

**Tabelle 5: Metastasierungspotential der orthotop implantierten BxPc3 Zelllinien**

Bis auf 19917 abd-Lk1e entsprachen alle aus Metastasen isolierten Zelllinien phänotypisch der implantierten Zelllinie. 19917 abd-Lk1e wurde aus einem abdominalen Lymphknoten isoliert und hat einen eher epithelialen Phänotyp, obwohl es kein E-Cadherin exprimiert. Nach erneuter Implantation von 19917 abd-Lk1e bildeten die Mäuse keine Metastasen.

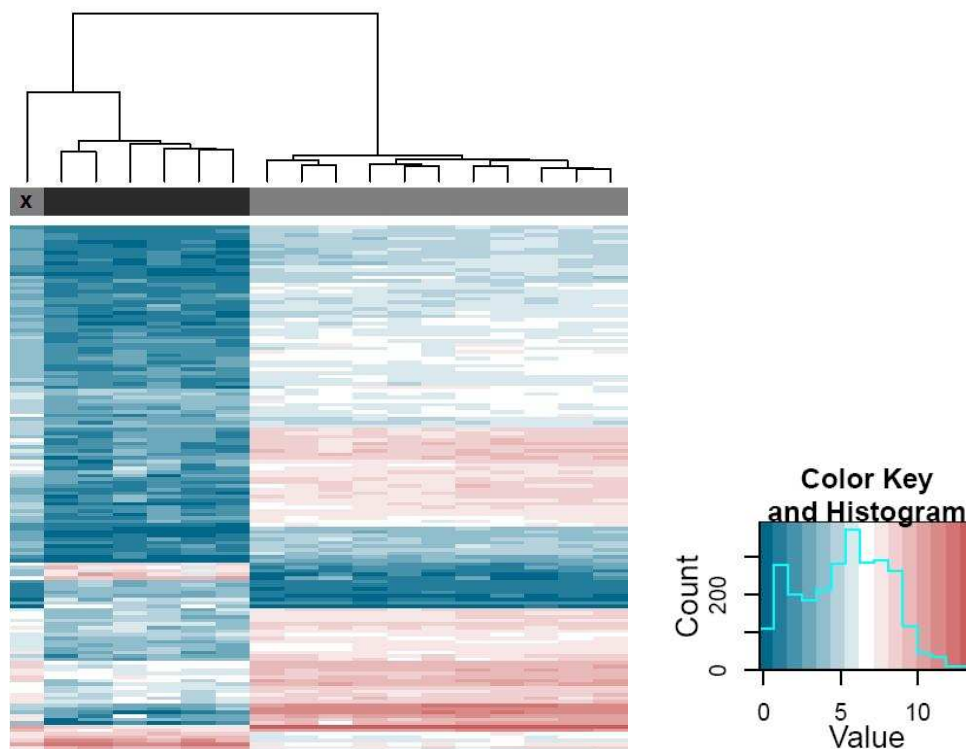


**Abbildung 8: Western Blot anti E-Cadherin**

Unterscheidung von MiaPaCa-2 Zelllinien mit epithelialem und mesenchyalem Phänotyp: Anti-E-Cadherin und anti  $\beta$ -actin

Ein Genexpressionsvergleich phänotypisch epithelialer und mesenchymaler Zelllinien bestätigte, dass sich die nach mesenchymaler MiaPaCa-2-Zellimplantation isolierte phänotypisch epitheliale Metastasenzelllinie 19917 abd-Lk1e bezüglich ihrer Genexpression in einzelnen Genen von den anderen mesenchymalen Zellen mit MiaPaCa-2 als Ursprungszelllinie unterscheidet.





**Abbildung 9: Genexpressionsvergleich: Zelllinien mit epithelialem (n=12) versus mesenchymalen (n=6) Phänotyp**

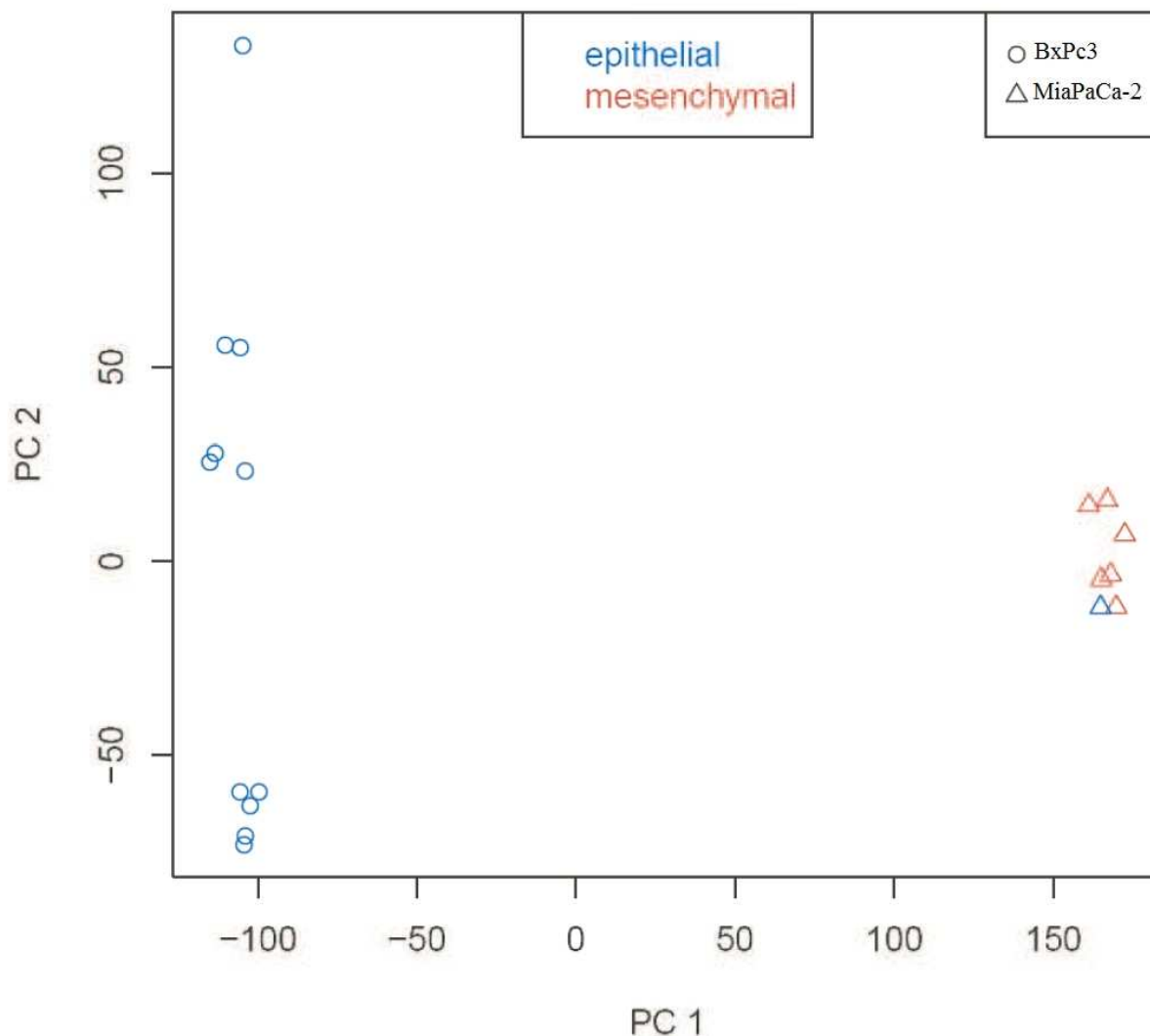
Der graue Balken markiert die epithelialen BxPc3 Zellen, der schwarze Balken die epithelialen MiaPaCa-2 Zellen. ‚X‘ markiert die von MiaPaCa-2 abstammende Zelllinie 19917 abd-Lk 1e mit epithelialem Phänotyp. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Insgesamt weist 19917 abd-Lk1e jedoch ein sehr ähnliches Expressionsprofil wie alle anderen aus MiaPaCa-2-Zellen gewonnenen Zelllinien auf und hat kaum Gemeinsamkeiten mit phänotypisch ähnlichen epithelialen aus BxPc3-Zellen gewonnenen Zelllinien.

Ersichtlich ist ebenfalls der deutliche Unterschied zwischen den beiden humanen PDAC-Zelllinien BxPc3 und MiaPaCa-2 in Bezug auf ihre Genexpression. In Anbetracht der nach adjP-Value relevantesten DEGs lassen sich die beiden Zelllinien klar voneinander abgrenzen. Entsprechend fanden sich 15.058 signifikante DEGs.

Gleiches bestätigte die ‚Principle Component Analysis‘. Dabei werden alle Charakteristika in den Expressionsprofilen der beiden Zelllinien zweidimensional in zwei so genannten Hauptkomponenten genähert. Dazu

wird mathematisch eine Hauptachsentransformation durchgeführt. (Jolliffe 2002)



**Grafik 1: Principal Component Analysis**

Zelllinien mit epitheliale (n=12) versus mesenchymalem (n=6) Phänotyp. Zelllinien von MiaPaCa-2 abstammend (n=7) versus von BxPc3 abstammend (n=11).

Auch in dieser Analyse zeigt sich einerseits, dass von MiaPaCa-2-Zellen und von BxPc3-Zellen ausgehende Zelllinien sich zumindest in einer der beiden Hauptkomponenten stark unterscheiden und andererseits zwischen von MiaPaCa-2 ausgehenden Zelllinien mit epitheliale oder mesenchymalem Phänotyp kaum Unterschiede bestehen.

### 3.1.2 Das Metastasierungspotential von MiaPaCa-2 Zellen hängt nicht von der Primärtumorgröße ab

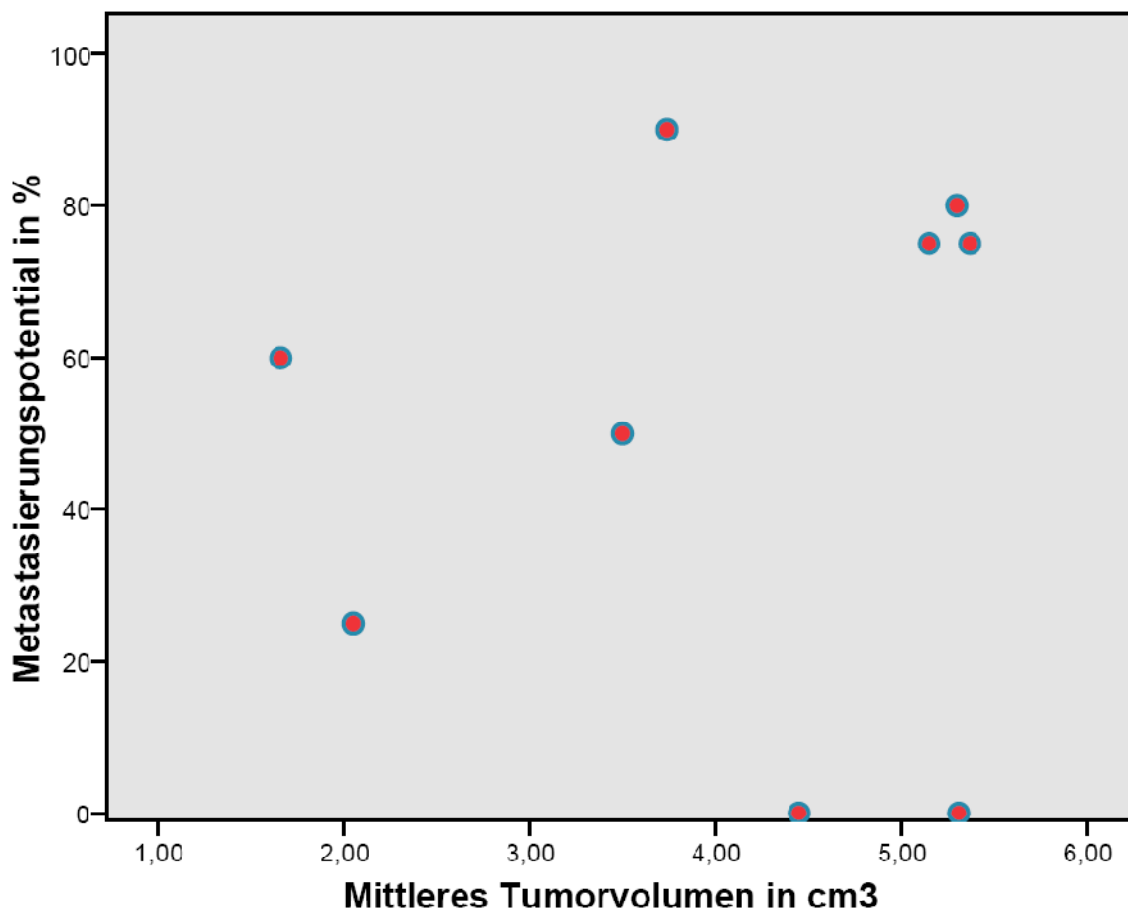
<u>implantierte Zelllinie</u>	<u>mittleres Tumolvolumen</u>	<u>Standardabweichung</u>	<u>Metastasiert</u>	<u>mittleres Überleben</u>
	in cm <sup>3</sup> , auf 2 Dezimalen gerundet			in Tagen
19902 th-Lk2	3,5	3,03	50%	93,5
1640 Leber	2,05	1,43	25%	53
1640 th-Lk	1,66	1,46	60%	41,5
MiaPaCa-2	3,74	2,71	90%	74
19951 vBlut	5,37	2,58	75%	80
19909 Leber	4,45	3,17	0%	66
19917 abd Lk1e	5,31	3,6	0%	78
19953 Lunge 2	5,15	1,72	75%	65
19908 Leber	5,3	3,34	80%	63,5

**Tabelle 6: Mittlere Tumorumfänge der implantierten Zelllinien**

Nach der Resektion des Primärtumors wurde dieser in Länge, Breite und Höhe vermessen. Mit der Formel zur Volumenberechnung rotationssymmetrischer Ellipsoide

$$V = \frac{4}{3} \pi abc \quad (a = \frac{1}{2} \text{Länge}, b = \frac{1}{2} \text{Breite}, c = \frac{1}{2} \text{Höhe})$$

wurde das Tumolvolumen näherungsweise bestimmt. Dabei waren die Tumorgößen bei Mäusen mit der gleichen implantierten Zelllinie zum Teil bereits sehr variabel, so dass sich hohe Standardabweichungen ergaben.



**Grafik 2: Streudiagramm: Verteilung von mittlerem Tumolvolumen und Metastasierungspotential**

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Primärtumolvolumens in den Vergleichsgruppen (Mann-Whitney-U-Test).

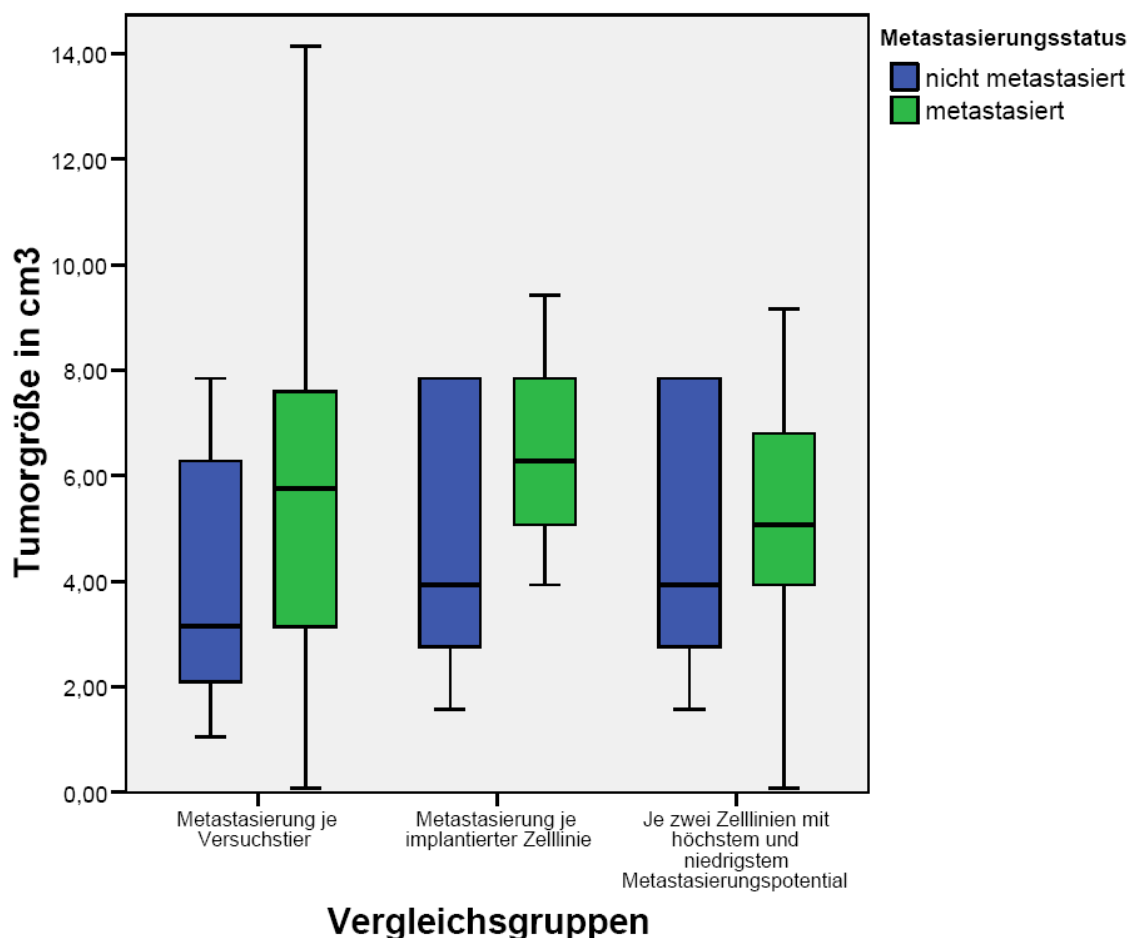
Um zu überprüfen, ob die Eigenschaften Tumorgöße und Metastasierungspotential korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für nicht normalverteilte Merkmale

$$r_s = \frac{\sum_{i=1}^n (rg(x_i) - \overline{rg_x}) \cdot (rg(y_i) - \overline{rg_y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (rg(x_i) - \overline{rg_x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (rg(y_i) - \overline{rg_y})^2}} \cong 0,118 \quad (rg = \text{Rang})$$

sowie in Annahme einer Normalverteilung der Pearson Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \cong 0,073$$

berechnet. Bei  $r_s \leq 0,2$  und  $r < 0,19$  spricht man von einer nicht vorhandenen bis schwachen Korrelation.



**Grafik 3: Boxplot: Vergleich der Tumorzumina in metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren**

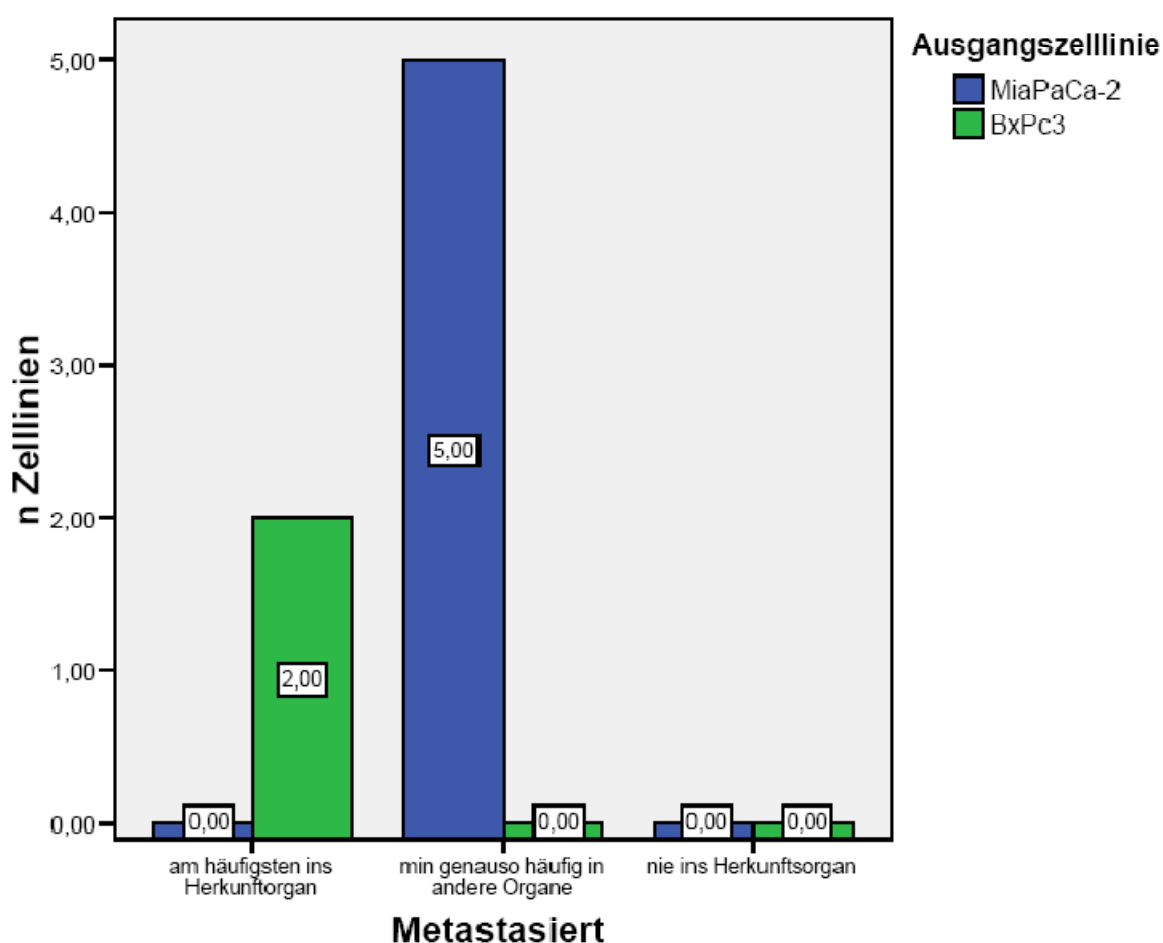
Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Primärtumorzumens in den Vergleichsgruppen (Mann-Whitney-U-Test).

Des Weiteren ließen sich bei der Betrachtung der Primärtumorzumina aller Versuchstiere und deren Metastasierungsverhalten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ‚metastasiert‘ und ‚nicht metastasiert‘ feststellen. Für die Vergleiche wurden nur Primärtumorzumina berücksichtigt, bei denen die gleiche Zellzahl implantiert wurde. Das gleiche Ergebnis lieferten die Betrachtung der mittleren Primärtumorzumina pro implantierte Zelllinie sowie der Vergleich der Tumorzumina der zwei Zelllinien mit dem höchsten mit den zwei Zelllinien mit dem niedrigsten Metastasierungspotential.

In diesem Zusammenhang konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass der kleinste metastasierte Primärtumor ein Volumen von  $0,07 \text{ cm}^2$  und der größte Primärtumor, der nicht metastasierte, ein Volumen von  $7,83 \text{ cm}^2$  hatten.

### 3.1.3 Aus Metastasen selektierte MiaPaCa-2 Zellsubpopulationen metastasieren nicht organspezifisch

Tabelle 4 zeigt zudem, dass die Metastasierung nicht organspezifisch erfolgt.



**Grafik 4: Balkendiagramm: Organspezifität der Metastasierung**

MiaPaCa-2: Die Metastasierung erfolgt nicht organspezifisch. Alle implantierten und metastasierten Zelllinien metastasieren mindestens genauso häufig in andere Organe wie in ihr Herkunftsorgan.

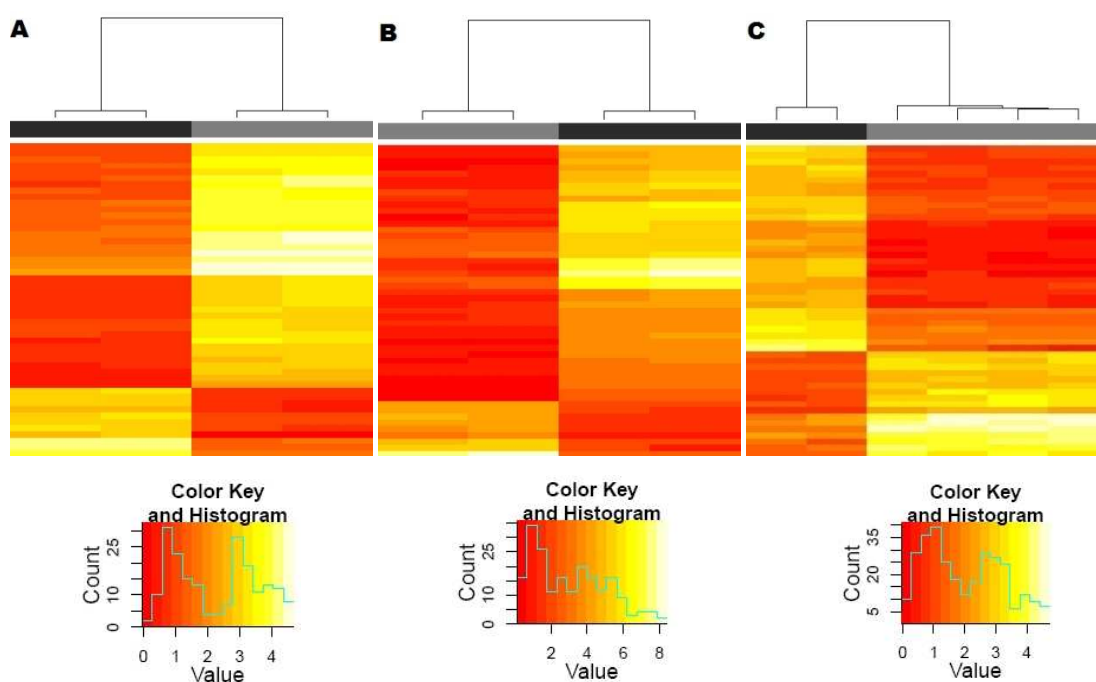
BxPc3: Organspezifische Metastasierung. Alle implantierten und metastasierten Zelllinien metastasieren am häufigsten in ihr Herkunftsorgan.

So bildet keine der implantierten, aus Metastasen stammenden MiaPaCa-2-Zelllinien ausschließlich Metastasen im Organ ihrer Herkunft. Alle MiaPaCa-2-Zelllinien metastasieren mit mindestens der gleichen Häufigkeit in ein weiteres Organ. Bei den BxPc3 metastasierten die beiden aus Lungenmetastasen gewonnenen Zelllinien am häufigsten erneut in die Lunge.

### 3.1.4 Metastasen verschiedener Organe scheinen unterschiedliche Gene zu exprimieren

Zudem wurden die Genexpressionsprofile der Zelllinien aus Metastasen unterschiedlicher Organe untereinander verglichen.

Es erfolgte ein Vergleich der Genexpressionsprofile zwischen Lymphknoten- und Lebermetastasen, zwischen Lymphknoten- und Lungenmetastasen sowie zwischen Lymphknotenmetastasen und Leber- mit Lungenmetastasen.



**Abbildung 10: Genexpressionsvergleich: Organspezifische Metastasierung**

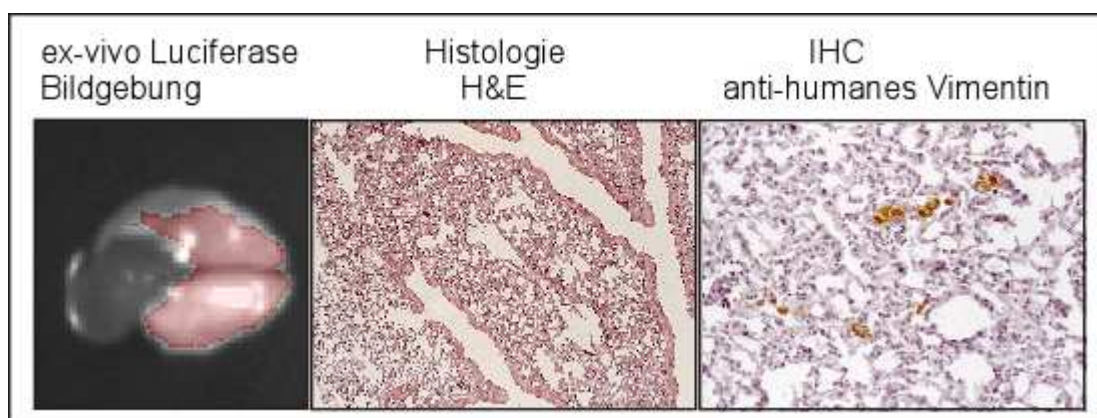
- A) Lymphknoten- (schwarzer Balken) versus Lebermetastasen (grauer Balken)  
 B) Lymphknoten- (schwarzer Balken) versus Lungenmetastasen (grauer Balken)  
 C) Lymphknoten- (schwarzer Balken) versus Leber- und Lungenmetastasen (grauer Balken)

Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Bei allen drei Vergleichen sind dabei deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expression der nach adjP. relevantesten 50 Gene ersichtlich. Besonders deutlich ist dies zwischen Leber- und Lymphknotenmetastasen sowie zwischen Leber- mit Lungenmetastasen und Lymphknotenmetastasen. Aufgrund der geringen Probenzahl in den Vergleichsgruppen finden sich jedoch keine signifikanten DEGs.

### 3.1.5 Frühe Dissemination von Tumorzellen in Primärtumoren von MiaPaCa-2 Zellen

Bei Mäusen, in denen sich in Fluoreszenz-Bildgebung und Histologie keine Metastasen nachweisen ließen, fanden sich trotzdem häufig im Blut zirkulierende Tumorzellen, die auch in genitocinhalten Medium kultiviert werden konnten. Wie bereits unter 3.1 beschrieben, lassen sich histologisch häufig im gesamten Lungengewebe verteilte disseminierte Tumorzellen nachweisen. Daraus folgt, dass es scheinbar auch in nicht metastasierenden oder noch nicht metastasierten Tumoren zur Dissemination vieler Zellen kommt.



**Abbildung 11: Diffuse Infiltration der Lunge durch Tumorzellen**

## 3.2 Differentiell exprimierte Gene (DEGs)

In bisherigen Untersuchungen mit Genexpressionsanalysen lag der Fokus hauptsächlich auf der Identifikation von für die Tumorgenese relevanten DEGs. Durch die Vergleiche der Genexpressionsprofile dieser Arbeit sollen



dagegen Aussagen zu für die Metastasierung relevanten DEGs getroffen werden.

Es wurden 13 Genexpressionsprofile von nachfolgenden Zelllinien erstellt. Aus diesen Profilen wurden, um für die Metastasierung oder für einen Teilschritt der Metastasierung relevante DEGs zu ermitteln, vier Subgruppen dieser Profile verglichen. Es wurden die Subgruppen ‚Primärtumor‘ und ‚Metastase‘, sowie ‚nicht metastasierende Zellen‘ und ‚metastasierende Zellen‘ gebildet, um diese auf Unterschiede zu analysieren. Die Vergleiche wurden jeweils mit Expressionsprofilen der MiaPaCa-2-Zellen (siehe 11.2.1 Anhang) und unter Einbeziehung von Expressionsprofilen der phänotypisch eher epithelialen BxPc3-Zellen (siehe 11.2.2 Anhang) erstellt. Vergleiche, die die BxPc3-Zelllinien enthielten, lieferten jedoch keine signifikanten DEGs, was die Vermutung nahe legt, dass in den beiden Zelllinien die Dysregulation unterschiedlicher Gene für die Metastasierung verantwortlich sein könnten.

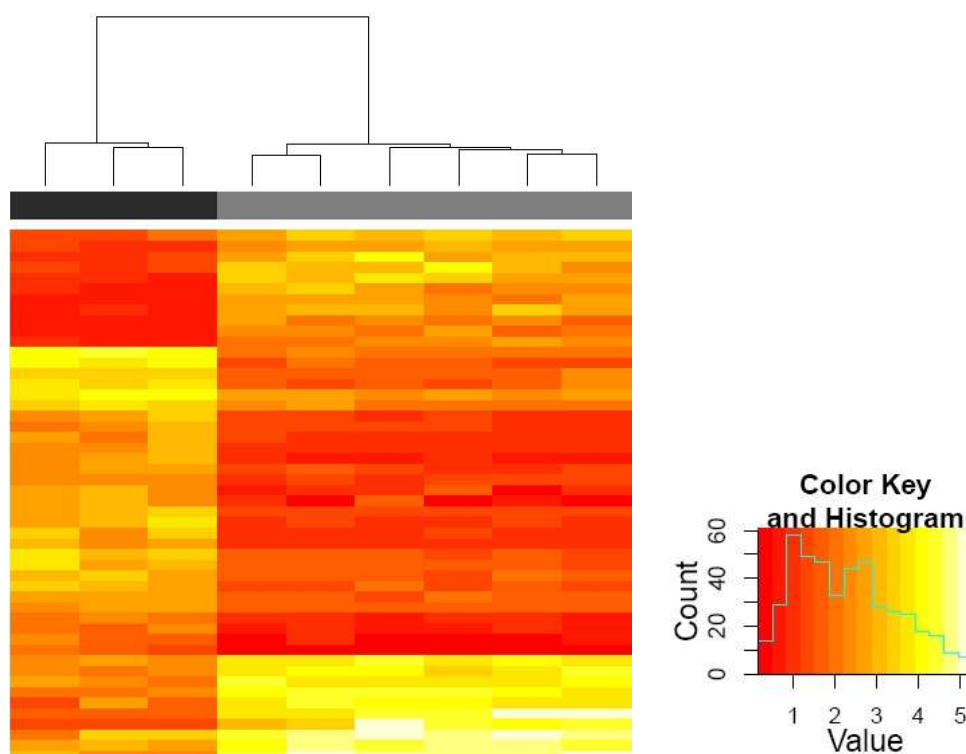
Da der Prozess der Metastasierung aus mehreren Teilschritten besteht, wurden zusätzlich ‚im Blut zirkulierende Tumorzellen‘ als Zwischenstufe mit ‚Primärtumoren‘ und ‚Metastasen‘ verglichen. Da nur bei den Versuchen mit MiaPaCa-2-Zellen im Blut zirkulierende Tumorzellen isoliert wurden, beinhalten diese Vergleiche nur MiaPaCa-2-Zelllinien.

Alle Vergleiche ergaben insgesamt 19 differentiell exprimierte Gene mit einem „multiple testing adjusted“ Signifikanzniveau (adjP) von mindestens  $\text{adjP} < 0,05$ .

### 3.2.1 Metastasen im Vergleich zu Primärtumoren

Die Genexpressionsprofile der einzelnen Zellen wurden anhand des Merkmals „Zelltyp“ verglichen. Dabei wurden die beiden Gruppen Metastase (n=6) und Primärtumor (n=3) einander gegenüber gestellt.

### 3.2.1.1 MiaPaCa-2 Zelllinien



**Abbildung 12: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Primärtumor (n=3) versus Metastase (n=6)**

Der graue Balken markiert die Metastasen, der schwarze Balken die Primärtumoren. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

In den, dem adjP Wert nach, 50 relevantesten DEGs zeigen die beiden Zellgruppen deutliche Unterschiede. Es fanden sich acht statistisch signifikante DEGs. Ein positiver logFC entspricht einer relativ erhöhten Expression in der Gruppe ‚Metastase‘.

#### 3.2.1.1.1 ARHGDI1

Das „Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha“ (ARHGDI1) Protein reguliert den GDP/GTP-Austausch bei der rho-Protein-Signaltransduktion. Dabei interagiert es anti-apoptotisch, reguliert die Zelladhäsion negativ und kontrolliert die Zellmotilität (Leffers, Nielsen et al. 1993; Bruneel, Labas et al. 2005). Im Vergleich zum Primärtumor hatte ARHGDI1 in den Metastasen einen logFC von 2,19 (adjP < 0,05) und wurde entsprechend deutlich stärker

exprimiert. Gordon et al. konnten zeigen, dass hohe Expressionslevel von ARHGDI1 mit einer schlechteren Prognose nach Debulking-Operationen von Mesotheliomen assoziiert sind (Gordon, Dong et al. 2009). Dem entgegen stehen die Ergebnisse von Kimmelman et al., die einen Zusammenhang zwischen der Rio Kinase 3 (RIOK3) über deren Aktivierung der kleinen GTPase rac1 und dem invasiven Wachstum von Pankreastumoren herstellen konnten. (Kimmelman, Hezel et al. 2008) ARHGDI1 wiederum kann neben anderen zellulären Funktionen auch rac1 inhibieren (Newcombe, Stockley et al. 1999). Die aufgrund der Überexpression in den Metastasenzellen dieser Arbeit mögliche Rolle von ARHGDI1 bei der Metastasierung müsste demzufolge noch weiter evaluiert werden.

#### 3.2.1.1.2 CDH23

Die Expression des „encoding Cadherin like 23“ Gens wurde in Zellen aus Metastasen mit einem logFC von  $-1,79$  ( $\text{adjP} < 0,05$ ) vergleichsweise herab reguliert. Es spielt bei Kalzium-abhängigen Zell – Zell-Adhäsionen v.a. bei den Haarzellen der Sinnesorgane eine Rolle und wurde in diesem Zusammenhang mit Taubheit und Störungen der Sinneswahrnehmung in Verbindung gebracht. (Bolz, von Brederlow et al. 2001; Siemens, Kazmierczak et al. 2002; Schultz, Yang et al. 2005) Bisher wurde das Gen noch nicht im Kontext von Metastasierung erwähnt.

#### 3.2.1.1.3 DAB2ip

Gemeinsam mit DAB2 agiert DAB2ip (interacting protein) als Tumorsuppressorgen und reguliert Zellmotilität, Zellwachstum bzw. -zyklus und Apoptose. Es zählt zu den Ras-GTPase aktivierenden Proteinen und wird z.B. in Mammakarzinomen durch Methylierung inaktiviert. Des Weiteren spielt eine verminderte Expression oder Funktion von DAB2 und DAB2ip bei der Karzinogenese vieler Tumoren, wie u.a. Prostata-, Bronchial- und Ovarialkarzinomen eine Rolle (Mok, Chan et al. 1998; Chen, Pong et al. 2002; Dote, Toyooka et al. 2004; Yano, Toyooka et al. 2005; Duggan, Zheng et al. 2007; Xie, Gore et al. 2009). Eine mögliche Bedeutung von DAB2ip bei der Metastasierung und bei der epithelialen-mesenchymalen Transition konnten

Xie et al. beim Prostatakarzinom zeigen (Xie, Gore et al. 2010). Da im Rahmen dieser Arbeit keine Expressionsprofile von gesundem Gewebe erstellt wurden, lassen sich keine Aussagen über die relativen DAB2ip Spiegel im Primärtumor treffen. Im Vergleich zu den Zellen der PDAC-Primärtumoren war DAB2ip in den Metastasen jedoch mit einem logFC von 2,18 (adj P < 0,05) deutlich stärker exprimiert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Huang et al. Sie beschrieben eine erhöhte DAB2ip-Expression in Primärtumoren und eine erniedrigte Expression in Metastasen (Huang, Friess et al. 2001). Die genaue Rolle von DAB2ip bei der Metastasierung des PDAC bedarf demnach noch weiterer Untersuchungen.

#### 3.2.1.1.4 HIPK2

Die „homeodomain interacting protein kinase 2“ induziert über den transforming growth factor beta (tgf $\beta$ ) und die JNK-Kaskade die Apoptose und reguliert den Zellzyklus (Hofmann, Stollberg et al. 2003; Di Stefano, Blandino et al. 2004; Giraud, Diaz-Latoud et al. 2004). Zudem wird HIPK2 bei Hypoxie, wie sie in Tumoren und Metastasen häufig vorkommt, durch Siah1+2, WSB-1 und Mdm2 ubiquitiniert und folglich degradiert (Winter, Sombroek et al. 2008; Calzado, de la Vega et al. 2009). Die daraus resultierende Inhibition p53-induzierter Apoptose führt zu einer verstärkten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. Durch Inhibition von Siah1+2 oder WSB-1 mit siRNA oder durch Zink-Applikation lässt sich die p53-assoziierte Apoptose teilweise wiederherstellen und das Ansprechen auf Chemotherapeutika verbessern (Nardinocchi, Puca et al. 2009; Moehlenbrink, Bitomsky et al. 2010; Nardinocchi, Puca et al. 2010). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von HIPK2 als Tumorsuppressorgen und verdeutlichen seine mögliche Rolle in zukünftigen Therapiekonzepten.

In den Metastasenzellen des Arrays dieser Arbeit war die HIPK2 Expression mit einem logFC -2,44 (adjP < 0,01) deutlich herab reguliert. Beim Colonkarzinom konnten D'Orazi et al. die Bedeutung von HIPK2 für die Tumorprogression belegen (D'Orazi, Sciulli et al. 2006). Die Daten dieses Microarrays legen eine Bedeutung von HIPK2 bei der Metastasierung nahe

und empfehlen HIPK2 als möglichen Ansatzpunkt für zukünftige zielgerichtete Therapiekonzepte beim PDAC.

#### 3.2.1.1.5 NTN1

„Netrin 1“ lenkt während der Embryonalphase das Axonwachstum, reguliert die Zellmigration (Kennedy, Serafini et al. 1994; Schwarting, Raitcheva et al. 2004) und ist für die Zell-Adhäsion von Bedeutung (Strickland, Shin et al. 2006). Da NTN1 die p53-assoziierte Apoptose blockiert, wird dessen Funktion als Onkogen diskutiert (Arakawa 2004). Dementsprechend fanden sich in frühen Stadien des PDAC hohe Level von Netrin 1 (Dumartin, Quemener et al. 2010) und im Gegensatz zu HIPK2 wird Netrin 1 bei Hypoxie über HIF-1 $\alpha$  induziert (Rosenberger, Schwab et al. 2009). Andererseits konnten in vielen Gehirntumoren und Prostatakarzinomen verminderte Level an Netrin 1 und Mutationen des NTN1-Gens festgestellt werden (Meyerhardt, Caca et al. 1999; Latil, Chene et al. 2003). In dieser Arbeit war Netrin 1 in den Metastasen des PDAC im Vergleich zu den Primärtumoren mit einem logFC von -1,89 (adjP < 0,05) deutlich herabreguliert. Ob dies durch eine Überexpression in den Primärtumoren oder durch eine verminderte Expression in den Metastasen bedingt ist, lässt sich aus den Daten dieses Vergleichs nicht schließen.

#### 3.2.1.1.6 PVRL1

„Poliovirus receptor related 1“ ist in den Metastasen relativ herabreguliert (logFC -1,89; adjP < 0,05). Es spielt eine Rolle bei der angeborenen Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, als Rezeptor, den Herpes-Simplex-Virus zum Eindringen in die Zelle nützt, und als Zell-Adhäsions-Molekül (Takahashi, Nakanishi et al. 1999; Suzuki, Hu et al. 2000). In dieser letzten Funktion käme es als für die Metastasierung relevantes Gen in Frage – ein näherer Zusammenhang wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

#### 3.2.1.1.7 SPTBN1

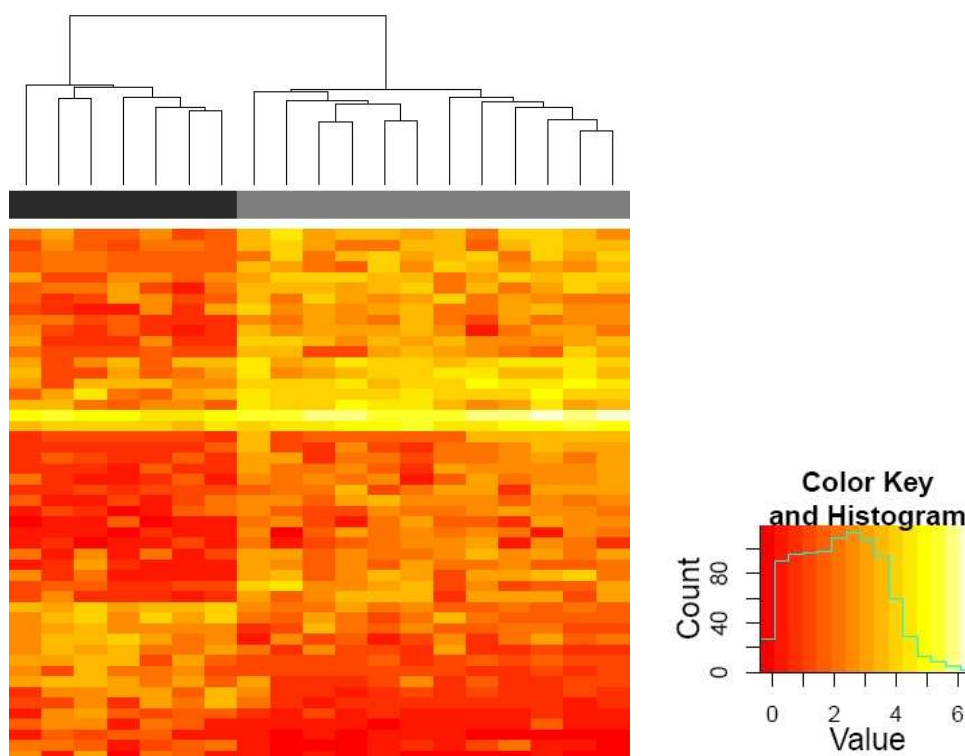
„Spectrin, beta, non-erythrocytic 1“ ist wichtiger Bestandteil des Zellskeletts und bindet dort Aktin (Hu, Watanabe et al. 1992). Mit Neoplasien wurde es als Bestandteil verschiedener Fusionsproteine bei myeloproliferativen Krankheiten in Verbindung gebracht (Grand, Iqbal et al. 2007; Gallagher, Horsman et al. 2008). Darüber hinaus agiert SPTBN1 über den Tgf $\beta$  Signalweg als Tumorsuppressor und inhibiert EMT. Dies ließ sich beim Kolonkarzinom und HCC bestätigen (Tang, Katuri et al. 2003; Tang, Katuri et al. 2005; Lin, Amin et al. 2009). Yao et al. konnten zudem zeigen, dass SPTBN1<sup>+/-</sup>-Mäuse phänotypische Charakteristika des vererblichen, mit Tumoren assoziierte Beckwith-Wiedemann-Syndrom zeigen und später häufig gastrointestinale Neoplasien und PDAC entwickeln (Yao, Jogunoori et al. 2010).

Auch in den Metastasen dieser Arbeit war SPTBN1 mit einem logFC von -1,73 (adjP < 0,05) geringer exprimiert. Dieses Ergebnis und die Arbeit von Jiang et al., in der gezeigt wird, dass eine verminderte Expression von SPTBN1 in PDAC mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Jiang, Gillen et al. 2010), lassen vermuten, dass das beschriebene Gen eine Rolle bei der Metastasierung des PDAC spielt.

#### 3.2.1.1.8 ZNF444

„Zinc finger protein 444“ gehört zur Familie der Zinkfinger-Proteine und reguliert als solches vermutlich die DNA-Transkription. Die genaue Funktion dieses Proteins ist jedoch nach wie vor unbekannt. Es wurde bisher lediglich nach Gen-Rearrangement als Fusionsgen mit EWSR1 mit myoepithelialen Weichteiltumoren in Verbindung gebracht (Brandal, Panagopoulos et al. 2009; Antonescu, Zhang et al. 2010). Bei den Metastasen dieses Vergleichs war ZNF 444 deutlich herab reguliert (logFC -2,11; adjP < 0,01).

## 3.2.1.2 MiaPaCa-2 und BxPc3 Zelllinien



**Abbildung 13: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 und BxPc3 Zellen: Primärtumor (n=7) versus Metastase (n=12)**

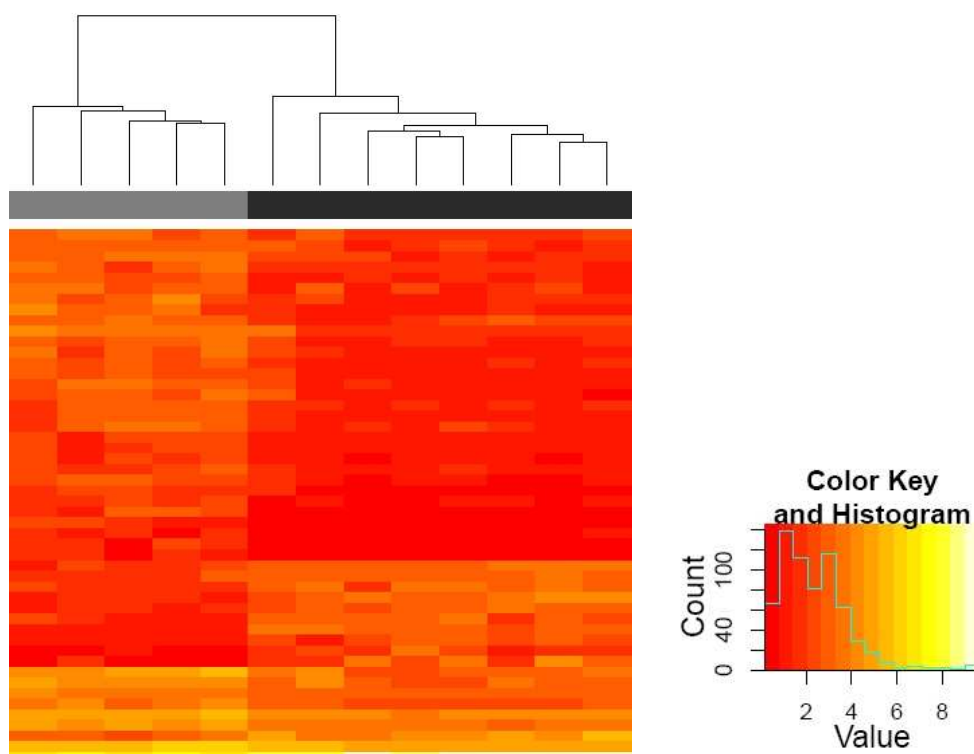
Der graue Balken markiert die Metastasen, der schwarze Balken die Primärtumoren. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Eine Unterscheidung beider Vergleichsgruppen anhand der Genexpression ist möglich. Allerdings zeigt sich ein sehr heterogenes Bild, so dass sich innerhalb der Gruppen einzelne Gene zum Teil in ihrer Expression stark unterscheiden. Es fanden sich entsprechend auch keine signifikanten DEGs.

### 3.2.2 Metastasierende Zelllinien im Vergleich zu nicht metastasierenden

In diesem Vergleich wurden metastasierende Zellen mit nicht metastasierenden verglichen.

### 3.2.2.1 MiaPaCa-2 Zelllinien



**Abbildung 14: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Metastasierende- (n=5) versus nicht metastasierende Zelllinien (n=8)**

Der graue Balken markiert die metastasierenden-, der schwarze Balken die nicht metastasierenden Zelllinien. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Im Gegensatz zu Primärtumoren und Metastasen unterscheiden sich die beiden Gruppen metastasierende Zellen und nicht metastasierende Zellen nur wenig und so konnten lediglich drei statistisch signifikante DEGs identifiziert werden. Ein positiver logFC entspricht einer Überexpression in den metastasierenden Zelllinien.

#### 3.2.2.1.1 CD300LG

„CD300 molecule-like family member g“ ist ein den Immunglobulin-Rezeptoren ähnliches Protein, dass v.a. auf Kapillarendothel exprimiert wird und dort u.U. die Endotheldurchlässigkeit reguliert (Takatsu, Hase et al. 2006). Im Vergleich metastasierter Zelllinien mit nicht metastasierten war CD300LG in den nach



Implantation bzw erneuter Reimplantation metastasierten Zelllinien überexprimiert (logFC 1,46; adjP < 0,05).

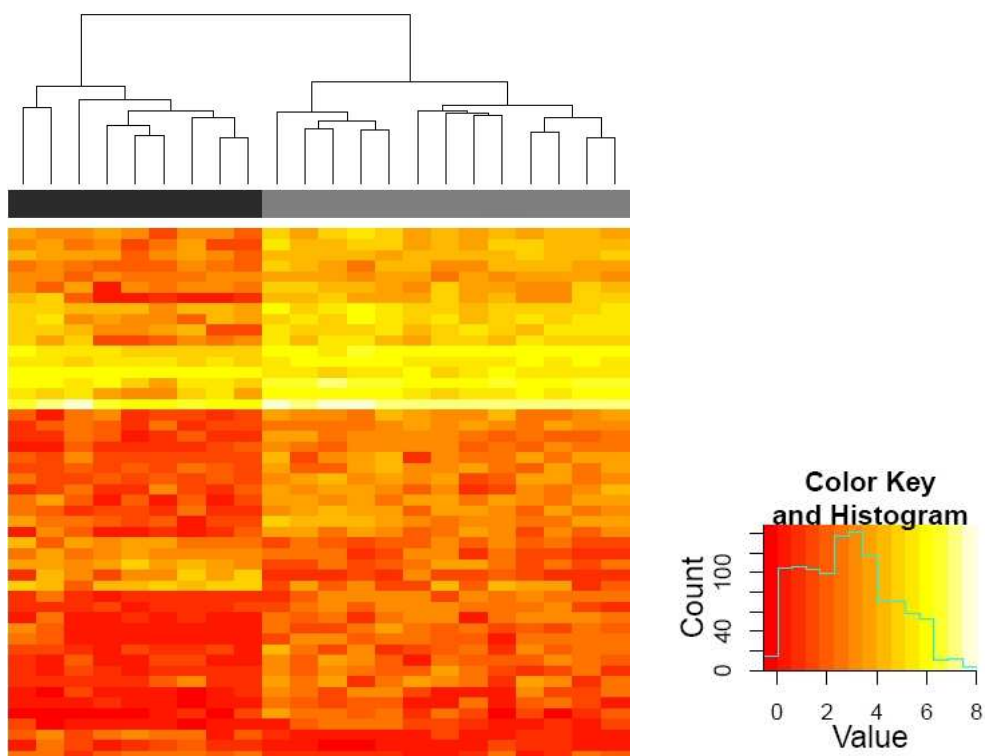
#### 3.2.2.1.2 SLURP1

„Secreted LY6/PLAUR domain containing 1“ ist ein Protein, das als nikotinerger Rezeptorligand fungiert und dabei protektiv gegenüber der Tumorgenese wirkt. Mutationen im SLURP1 Gen werden jedoch v.a. als Ursache des dermatologischen Mal de Meleda Syndroms vermutet (Chimienti, Hogg et al. 2003; Arredondo, Chernyavsky et al. 2007; Favre, Plantard et al. 2007; Tjiu, Lin et al. 2011). Im Einklang mit diesen Erkenntnissen war die Expression von SLURP1 in metastasierenden Zelllinien vergleichsweise herab reguliert (logFC -1,62; adjP < 0,05).

#### 3.2.2.1.3 SRCAP

„Snf2-related CREBBP activator protein“ moduliert Chromatin bzw. steuert den Einbau von Histonen in DNA zu Chromatin. Dadurch ist es bei der Regulation der Transkription und des Zellzyklus maßgeblich beteiligt (Guillemette and Gaudreau 2006; Ruhl, Jin et al. 2006; Wong, Cox et al. 2007). In dieser Funktion ist es beim Prostatakarzinom zum Beispiel für eine erhöhte Transkription des PSA und des Androgenrezeptors verantwortlich und beeinflusst folglich die Zellproliferation im Prostatakarzinom (Slupianek, Yerrum et al. 2010). Bianco-Miotto et al. konnten des Weiteren eine für malignes Prostatagewebe spezifische Gensignatur erstellen, die auch SRCAP enthält (Bianco-Miotto, Chiam et al. 2010). Neben der Rolle von SRCAP bei der Gentranskription und Tumorgenese legen die Daten dieses Genexpressionsvergleiches auch eine Beteiligung bei der Metastasierung nahe. In metastasierenden Zellen war dieses Gen deutlich herabreguliert. (logFC -1,74; adjP < 0,01)

## 3.2.2.2 MiaPaCa-2 und BxPc3 Zelllinien



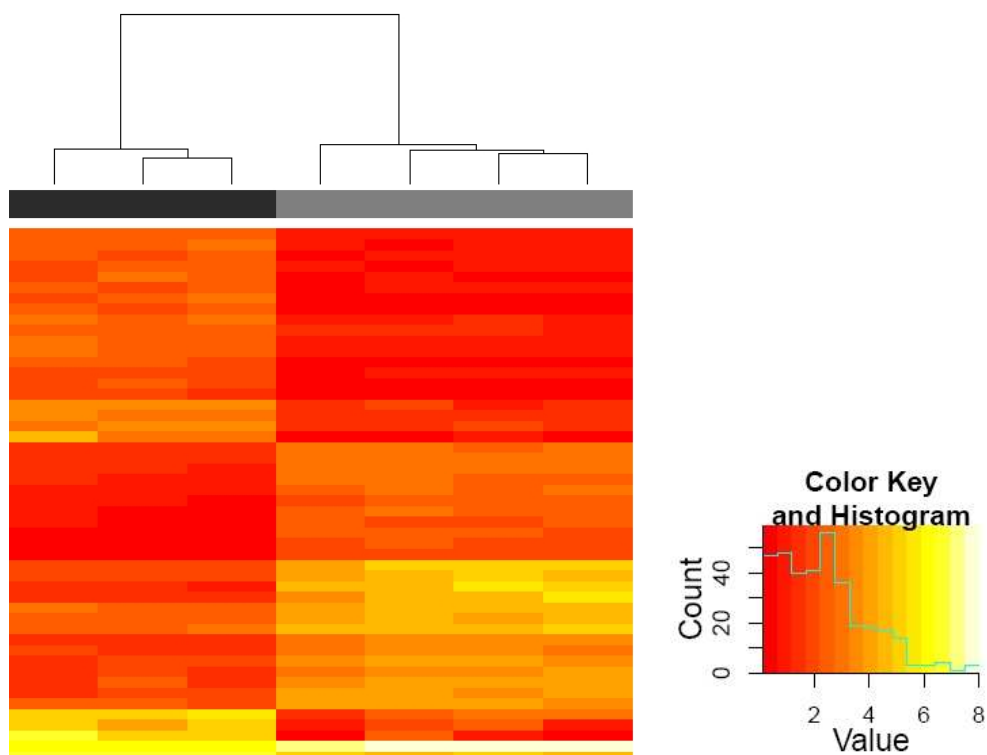
**Abbildung 15: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 und BxPc3 Zellen: Metastasierende- (n=13) versus nicht metastasierende Zelllinien (n=9)**

Der graue Balken markiert die metastasierenden-, der schwarze Balken die nicht metastasierenden Zelllinien. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Wie bereits im ersten Vergleich unter Einbeziehung der BxPc3 Expressionsprofile zeigt sich hier ein sehr heterogenes Bild ohne signifikante DEGs.

### 3.2.3 Primärtumoren im Vergleich zu im Blut zirkulierenden Tumorzellen

In diesem Vergleich wurden die Subgruppen „zirkulierende Zelle“ und „Primärtumor“ aus der Kategorie „Zelltyp“ betrachtet.



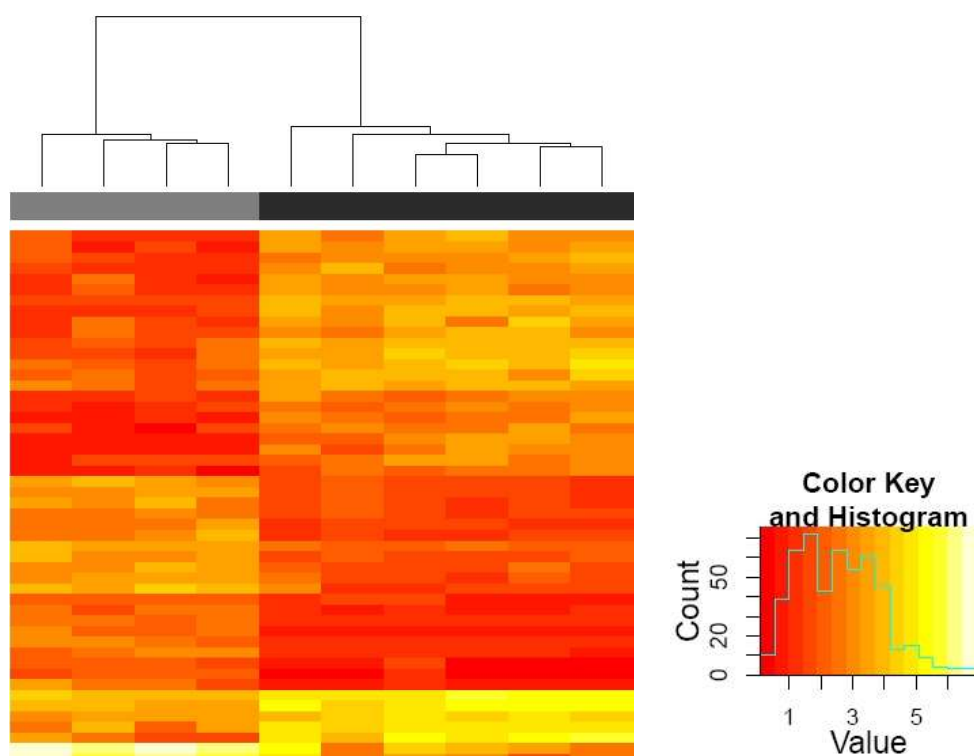
**Abbildung 16: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Primärtumore (n=3) versus im Blut zirkulierende Tumorzellen (n=4)**

Der graue Balken markiert die im Blut zirkulierenden Tumorzellen, der schwarze Balken die Primärtumore. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Hinsichtlich der nach adjP-Value relevantesten Gene gruppieren sich im Blut zirkulierende Tumorzellen und Primärtumorzellen und lassen sich gut unterscheiden. Dennoch wies keines dieser Gene ein adjP < 0,05 auf.

### 3.2.4 Im Blut zirkulierende Tumorzellen im Vergleich zu Metastasen

Dieser Vergleich stellt die Subgruppen „zirkulierende Zelle“ und „Metastase“ der Kategorie „Zelltyp“ einander gegenüber.



**Abbildung 17: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Metastasen (n=6) versus im Blut zirkulierende Tumorzellen (n=4)**

Der graue Balken markiert die im Blut zirkulierenden Tumorzellen, der schwarze Balken die Metastasen. Das Histogramm gibt die relativen Expressionswerte nach Normalisierung wieder.

Bei Betrachtung der nach adjP-Value 50 relevantesten Gene unterscheiden sich auch in diesem Vergleich beide Subgruppen in der Expression eines Teils dieser Gene. Insgesamt sind die Unterschiede jedoch weniger stark ausgeprägt als im Vergleich zwischen Primärtumor und Metastase. Es fanden sich acht DEGs. Ein positiver logFC bedeutet eine hochregulierte Expression in den im Blut zirkulierenden Zellen.

#### 3.2.4.1 ARHGAP8

„Rho GTPase activating protein 8“ wurde in im Blut zirkulierenden Zellen im Vergleich zu Zellen aus Metastasen weniger exprimiert. (logFC -1,91; adjP < 0,05) ARHGAP8 gehört zur Familie der „Rho GTPase activating proteine“. Diese Proteine inaktivieren aktive GTP-gebundene Rho GTPasen. Rho GTPasen regulieren u.a. Zellzyklus und Zellmigration (Johnstone, Castellvi-Bel

et al. 2004). Aus diesem Grund und da die Dysregulation anderer Rho-GTPase aktivierender Proteine wie BPGAP1 ebenfalls zu verstärkter Zellmigration führt, wurde ein Zusammenhang zwischen ARHGAPs und Tumorgenese bereits länger vermutet (Katoh 2004; Katoh and Katoh 2004; Lua and Low 2004; Pan, Liou et al. 2010). ARHGAP8 selbst liegt auf Chromosom 22q13.31, einem Abschnitt des Genoms, in dem bei Mamma- und Kolonkarzinomen häufig ein Verlust der Heterozygotie zu beobachten ist. Zudem ist ARHGAP8 in kolorektalen Karzinomen und invasiven Zervixkarzinomen überexprimiert (Johnstone, Castellvi-Bel et al. 2004; Song, Lee et al. 2008). Da ARHGAP8 ebenso wie ARHGAP1 die Rho-GTPase rac inhibiert, könnte ARHGAP8 auch bei der von Kimmelman et al. beschriebenen Assoziation zwischen rac-Aktivität, Migration und Invasion des PDAC von Bedeutung sein (Kimmelman, Hezel et al. 2008). Die Rolle von ARHGAP8 bei Zellmigration und Invasion sowie der deutliche Expressionsunterschied zwischen Metastasen und im Blut zirkulierenden Tumorzellen lassen auch eine Rolle von ARHGAP8 bei der Metastasierung des PDAC vermuten.

#### 3.2.4.2 ATXN3

Die Anzahl von CAG Sequenzen im „Ataxin3“ Gen korreliert negativ mit dem Erkrankungsalter der Machado-Joseph Krankheit. In Mäusen mit inaktivem ATXN3 wurden keine morphologischen Auffälligkeiten entdeckt. Jedoch waren vergleichsweise viele Proteine ubiquiniert (Schmitt, Linden et al. 2007; Bettencourt, Santos et al. 2010; Emmel, Alonso et al. 2011). Nachfolgende Arbeiten zeigten tatsächlich eine deubiquinierende Aktivität von ATXN3 (Burnett, Li et al. 2003; Chow, Mackay et al. 2004; Ferro, Carvalho et al. 2007). Die ebenfalls beschriebene Apoptose induzierende Funktion von ATXN3 konnte jedoch nur bei mit Polyglutamin verlängertem ATXN3 gezeigt werden (Yoshizawa, Yamagishi et al. 2000; Chou, Yeh et al. 2006). Im Vergleich zu zirkulierenden Tumorzellen wiesen Metastasen eine erhöhte Expression an ATXN3 auf. (logFC -1,88; adjP < 0,05) Ein Zusammenhang zwischen diesem Gen und der Metastasierung wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

### 3.2.4.3 Axin2

Axin2 ist Teil des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs, der die Transkription verschiedener Gene reguliert. Dabei hat Axin2 die Funktion einer negativen Rückkopplung. Es ist zum einen eines der vom Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalweg gesteuerten Gene und wird nur bei Aktivierung dieser Signalkaskade transkribiert. Zum anderen bildet es zusammen mit den Proteinen APC, GSK-3 $\beta$  und  $\beta$ -catenin einen Komplex, der für die Degradierung  $\beta$ -catenins und somit zur Inaktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs führt (Behrens, Jerchow et al. 1998; Mai, Qian et al. 1999; Jho, Zhang et al. 2002). Die Bedeutung der vom Wnt/ $\beta$ -catenin regulierten Gene für die Tumorgenese konnte bei verschiedenen Tumoren gezeigt werden. Bei der Tumorgenese des PDAC ist die Rolle dieses Signalwegs nach wie vor umstritten (Lustig, Jerchow et al. 2002; Lowy, Fenoglio-Preiser et al. 2003). Magliano et al. konnten jedoch zeigen, dass Wnt/ $\beta$ -catenin auch bei dieser Tumorentität dauerhaft aktiviert ist und dass die Inhibition dieses Signalwegs ein neuer therapeutischer Ansatz in der Tumorthherapie sein könnte (Lustig, Jerchow et al. 2002; Lowy, Fenoglio-Preiser et al. 2003; Pasca di Magliano, Biankin et al. 2007). Durch die Inhibition des wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs konnte das Ansprechen von PDAC auf Strahlentherapie verbessert werden und auch bei Kolonkarzinomen konnte das Tumorstadium verlangsamt werden (Watson, Spalding et al. 2010; Waaler, Machon et al. 2011). Auch eine Beteiligung von Axin2 als Teil des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs an der Tumorgenese scheint wahrscheinlich, da dieses Gen in vielen kolorektalen Karzinomen mutiert ist und in Mammakarzinomen und Neuroblastomen oft nicht mehr heterozygot vorliegt (Mai, Qian et al. 1999; Liu, Dong et al. 2000). Da Axin2 in zirkulierenden Tumorzellen im Vergleich zu den Metastasen überexprimiert wird (logFC 1,55; adjP < 0,05), könnte dies auf eine Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -catenin-Signalwegs in den zirkulierenden Zellen hinweisen.

### 3.2.4.4 C11orf21

„Chromosome 11 open reading frame 21“ liegt auf Chromosom 11p15.5. Dieser Genlokus enthält ebenfalls mehrere Gene, die – ähnlich wie

möglicherweise SPTBN1 – in Verbindung mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom erwähnt werden. Allerdings wird C11orf21 fast ausschließlich in Herzgewebe exprimiert (Zhu, Higashimoto et al. 2000). Entsprechend ist die starke Expression dieses Gens in im Blut zirkulierenden Tumorzellen überraschend (logFC 1,67; adjP < 0,05). Eine weitere funktionelle Charakterisierung könnte Aufschluss über einen möglichen Einfluss von C11orf21 auf die Metastasierung geben.

#### 3.2.4.5 CLDN20

„Claudin20“ gehört zur Familie der Claudine. Diese Proteine sind der Hauptbestandteil der v.a. zwischen epithelialen Zellen vorhandenen Tight Junctions. Claudin20 selbst wird dabei von Neuronen exprimiert und scheint wichtig für die Ausbildung der Blut-Retina-Schranke zu sein (Rizzolo, Chen et al. 2007; Gupta and Ryan 2010). Da es in im Blut zirkulierenden Tumorzellen herab-, oder in Metastasen hochreguliert ist (logFC -1,81; adjP < 0,05) und dazu bei Zellen mit mesenchymalem Phänotyp wie den MiaPaCa-2 weniger zu erwarten wäre, scheint es auch bei der Metastasierung oder zumindest bei einzelnen Schritten der Metastasierung eine Rolle zu spielen.

#### 3.2.4.6 GNA12

„Guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12“ bildet zusammen mit G $\alpha$ 13 die Unterfamilie G12 der G-Proteine. Diese finden sich ubiquitär zur transmembranösen Signaltransduktion (Strathmann and Simon 1990; Offermanns, Laugwitz et al. 1994; Offermanns 2001). So induziert die GNA12 Signalkaskade über rho GTPasen (RhoA) invasives Wachstum beim Prostatakarzinom, ist an der Konformation des Zytoskeletts beteiligt und kann über verschiedene Kinasen STAT3 stimulieren und so neoplastische Veränderungen in Zellen fördern (Buhl, Johnson et al. 1995; Simon, Vikis et al. 2000; Kelly, Stemmler et al. 2006; Kumar, Shore et al. 2006). Unter GNA12-Einfluss kommt es auch zur Dissoziation von  $\beta$ -catenin und Cadherin. In Abwesenheit von wnt/ $\beta$ -catenin-Inhibitoren wie APC führt dies zu einer erhöhten Transkription der entsprechenden Zielgene (Meigs, Fields et al. 2001). Zudem kann es über Cadherin und Tight Junctions die Zelladhäsion

herab regulieren und damit Metastasierung ermöglichen (Meigs, Fedor-Chaiken et al. 2002; Sabath, Negoro et al. 2008). Kelly et al. konnten beim Mammakarzinom zeigen, dass GNA12 Invasion und Metastasierung reguliert (Kelly, Moeller et al. 2006). Im Zuge dieser Signalkaskade ist über die GTPase ein Zusammenhang zwischen GNA12 und ARHGAP8, über  $\beta$ -catenin zwischen GNA12 und Axin2 und über die Regulation der Tight Junctions zwischen GNA12 und Claudin20 bei der Metastasierung des PDAC möglich. So könnten eine Dysregulation dieser Gene oder Mutationen derselben synergistisch zur Metastasierung beitragen. Mit einem logFC von -2,15 (adjP < 0,05) ist GNA12 im Vergleich zu im Blut zirkulierenden Tumorzellen in den Metastasen auch sehr deutlich überexprimiert.

#### 3.2.4.7 PADI1

„Peptidyl arginine deiminase, type I“ katalysiert den Umbau von Arginin zu Citrullin bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Geringe Expressionsniveaus konnten in unterschiedlichen Geweben wie Prostata, Hoden und Milz nachgewiesen werden. Vor allem wird PADI1 jedoch in der Epidermis und dort besonders in Keratinozyten exprimiert und ist dort an der Transkriptionsregulation beteiligt (Guerrin, Ishigami et al. 2003; Adoue, Chavanas et al. 2008). Entsprechend wird es v.a. mit Krankheiten wie der Psoriasis in Verbindung gebracht und eine zu niedrige Expression könnte als Marker zur Unterscheidung zwischen dysplastischem und gesundem Gewebe bei oralen Plattenepithelkarzinomen in Frage kommen (Chen, Mendez et al. 2008; Ying, Dong et al. 2009). Eine Expression in Pankreasgewebe oder ein Zusammenhang mit Metastasierung wurden bisher jedoch noch nicht beschrieben. Die deutlich erhöhte Expression (logFC 1,61; adjP <0,05) in den Metastasen gegenüber im Blut zirkulierenden Tumorzellen müsste demnach noch weiter eruiert werden.

#### 3.2.4.8 PAK6

„p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6“ gehört mit PAK 4 und 5 zur Gruppe II der PAKs. Gruppe II PAKs interagieren mit der Rho GTPase CDC42 und nehmen so Einfluss auf die Gentranskription (Wells and Jones 2010).



PAK6 wird vor allem in Prostata, Plazenta und etwas vermindert in Gehirngewebe exprimiert. Im Unterschied zu den anderen Mitgliedern der Gruppe II PAKs bindet PAK6 zusätzlich den Androgenrezeptor. So wird PAK6 besonders nach antiandrogener Therapie in vielen Prostatatumoren hochreguliert und stimuliert über den Androgenrezeptor dann das Tumorstadium und über die Protein Phosphatase 13 auch die Zellmotilität (Yang, Li et al. 2001; Lee, Ramos et al. 2002; Kaur, Yuan et al. 2008). In diesem Vergleich ist PAK6 in den zirkulierenden Zellen stark herab reguliert bzw. in den Metastasen stark überexprimiert. ( $\log_{2}FC -2,12$ ;  $adjP < 0,05$ ) Über die Rho GTPase Cdc42 wäre aber durchaus eine synergistische Dysregulation der Genexpression mit anderen DEGs wie ARHGAP8 denkbar und eine Beteiligung von PAK6 an der Metastasierung durchaus möglich.

### **3.3 GSEA**

In der „gene set enrichment analysis“ wurden keine signifikant unterschiedlich regulierten Gensets in den einzelnen Vergleichen gefunden.

## 4. Diskussion

Bisherige Behandlungskonzepte des PDAC und anderer Neoplasien richten sich weitestgehend nach dem in der Einleitung beschriebenen ‚linear progression‘ Modell der Metastasierung. Dem gegenüber steht die Theorie einer parallelen Entwicklung. Sollte sich dieses Konzept bestätigen, hätte dies weitreichende Konsequenzen für die aktuellen Therapiekonzepte. (Klein 2009) Eine lineare Tumorentwicklung würde implizieren, dass ein Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Metastasierung besteht, da Zellen innerhalb eines Tumors erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf die nötigen Eigenschaften zur Dissemination erlangen würden. Wie auch schon Weiss et al. 1983 widerlegt diese Arbeit ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Metastasierung. (Weiss, Holmes et al. 1983) Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Tumorgröße bei metastasierenden und nicht metastasierenden Primärtumoren festgestellt werden. Ebenso fand sich keine Korrelation zwischen Tumorgröße und Metastasierungspotential.

Dem Modell der linearen Entwicklung von Neoplasien widersprechen des Weiteren die von Husemann et al. bei Mammakarzinomen sogar schon im Stadium eines in situ Karzinoms gefundenen disseminierten Tumorzellen (Husemann, Geigl et al. 2008), was gleichermaßen für eine von der Primärtumorgröße unabhängige Dissemination spricht. Disseminierte Tumorzellen scheinen zudem genetisch sehr instabil zu sein und so zeigen disseminierte Zellen von Patienten ohne Metastasen deutlich weniger chromosomale Veränderungen als die von Patienten mit metastasierten Mammakarzinomen. (Klein, Blankenstein et al. 2002; Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003) Dies legt die Vermutung nahe, dass es im Sinne einer parallelen Entwicklung zur frühen Dissemination von Tumorzellen kommt und ein Teil dieser Zellen später, die für die Metastasierung notwendigen genetischen Anomalien erhält. Auch in dieser Arbeit ließ sich dieses Phänomen beobachten. Sowohl bei metastasierten als auch bei nicht metastasierten Tumoren konnten im Blut zirkulierende Tumorzellen isoliert werden.

Das Prinzip der in vivo Selektion von Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential wurde bereits mehrfach validiert. (Bruns, Harbison et

al. 1999; Bai, Guo et al. 2007) Auch die mit BxPc3-Zellen gewonnenen Daten sprechen dafür, dass über wiederholte orthotope Implantation entsprechende Zellen selektioniert werden können, da es bei diesen Zellen zum Anstieg des Metastasierungspotentials kam. In diesen und ähnlichen anderen Versuchen hatten die Ausgangszellen jedoch ein vergleichsweise niedriges Metastasierungspotential. (Bai, Guo et al. 2007) Die implantierten MiaPaCa-2-Zellen hatten im Gegensatz dazu schon bei der ersten Mauspassage ein sehr hohes Metastasierungspotential von 90%. In der zweiten und dritten Mauspassage wurden dann sowohl Zelllinien mit hohem Metastasierungspotential als auch Zelllinien, die nicht metastasierten, implantiert. Für den Vergleich der Genexpressionsprofile ergaben sich so interessante Vergleiche zwischen nicht metastasierenden und metastasierenden Zelllinien. Es ließ sich jedoch keine Zunahme des Metastasierungspotentials zeigen, sondern im Gegenteil erwartungsgemäß eher eine Abnahme. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch mit dem Konzept der in vivo Selektion. Durch mehrfache Reimplantation von Zelllinien der zweiten Mauspassage mit hohem Metastasierungspotential (z.B. 19908 Leber) käme es möglicherweise zu einer weiteren Selektion und Erhöhung des Metastasierungspotentials.

Insgesamt zeigen die phänotypisch epithelialen BxPc3 Zellen ein anderes Metastasierungsverhalten als die mesenchymalen MiaPaCa-2 Zellen.

Zusammenfassend sind diese Ergebnisse zum Metastasierungsverhalten der MiaPaCa-2 und BxPc3 Zellen als Anhaltspunkte zu betrachten, da der Versuchsaufbau hinsichtlich der implantierten Zellzahl und hinsichtlich der Anzahl pro Zelllinie implantierter Versuchstiere in erster Linie auf die in vivo Selektion und Isolation geeigneter Zelllinien für den Vergleich von Genexpressionsprofilen ausgerichtet war.

Da Genexpressionsprofile Rückschlüsse auf die Mechanismen der Metastasierung und eventuell dabei relevante Gene ermöglichen (Ramaswamy, Ross et al. 2003; Weigelt, Glas et al. 2003), habe ich mich in dieser Arbeit auf den Vergleich dieser Profile bezüglich des Vorgangs der Metastasierung konzentriert. Die für die Genexpressionsprofile gewonnenen Zelllinien können zudem aus mehreren Zellen einer Metastase bestehen.

Demzufolge lassen sich aus diesen Ergebnissen auch keine Aussagen zur Rolle von Tumorstammzellen bei den Metastasierungsmodellen tätigen.

Primärtumoren bestehen aus heterogenen Zellpopulationen, die z.T. verschiedene Mutationen anhäufen, folglich unterschiedliche Fähigkeiten besitzen und unterschiedlich maligne sein können. So sind nicht alle Zellen eines Tumors in der Lage, für sich alleine erneut einen Tumor zu bilden. (Al-Hajj, Wicha et al. 2003) Diese inhomogenen Zellsubpopulationen finden sich auch in Primärtumoren des PDAC. (Hezel, Kimmelman et al. 2006) Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass es innerhalb von Metastasen ebenfalls Populationen aus sehr heterogenen Zellklonen gibt. Wie schon ausführlich diskutiert, konnten aus Metastasen Zellen mit sehr variablen Metastasierungspotentialen sowie Zellen, die bei Reimplantation selbst nicht metastasierten isoliert werden.

Mit über 15.000 DEGs zwischen BxPc3 und MiaPaCa-2 Zellen scheinen sich auch Primärtumoren untereinander nicht nur im Phänotyp, sondern auch in der Genexpression stark zu unterscheiden. Dass zudem bei gemeinsamen Vergleichen von MiaPaCa-2 und BxPc3 Zellen keine DEGs gefunden wurden, legt die Vermutung nahe, dass mehrere verschiedene Gene für die Metastasierung im PDAC verantwortlich sind und in den beiden Zelllinien unterschiedlich exprimiert werden.

Die Vielzahl möglicherweise am Prozess der Metastasierung beteiligter Gene spiegelt sich auch darin wider, dass die in den Vergleichen identifizierten DEGs an vielen zum Teil sehr unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind. Dies sind im Wesentlichen die Regulation der Zellmotilität und -migration, der Zelladhäsion, der Apoptose und die Regulation der Transkription. Da all diese Prozesse für die Metastasierung durchaus von Bedeutung sein könnten, kommen fast alle DEG dieser Arbeit auch als potentiell für die Metastasierung relevante Gene in Frage. Und obwohl die meisten dieser DEGs über separate Signalkaskaden agieren, bestehen doch gemeinsame Interaktionen. ARHGDI1, ARHGAP8, PAK6 und GNA12 haben alle Wechselwirkungen mit Rho-GTPasen, die wiederum über STAT3 bei der Transkriptionsregulation eine Rolle spielen. GNA12 greift darüber hinaus auch genauso wie AXIN2 über den Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg in die Transkription ein. Daran beteiligt sind

des Weiteren ZNF444, PADI1 und SRCAP. Über Cadherine vermindert GNA12 außerdem die Zelladhäsion. Diese wird auch von weiteren DEGs wie CLDN20, NTN1, CDH23 und PVRL1 reguliert. Die Steuerung der Apoptose beeinflussen SPTBN1 und HIPK2 über den Tgf- $\beta$ -Signalweg, sowie NTN1 und wahrscheinlich auch DAB2ip.

Die durch die Expression der identifizierten DEGs beeinflussten Signalwege decken sich zum Teil mit Signalwegen deren Bedeutung für die Metastasierung in der Literatur bereits belegt wurde. (Hezel, Kimmelman et al. 2006; Jones, Zhang et al. 2008; Stathis and Moore 2010) Die in dieser Arbeit identifizierten DEGs wurden demnach zum Teil auch bereits mit Tumorgenese und Metastasierung in Zusammenhang gebracht. Jedoch stimmen sie nicht mit den in anderen Arbeiten mit Microarray-Technologie ermittelten Genen, die für Tumorgenese und Metastasierung des PDAC von Bedeutung sein könnten, überein. (Missiaglia, Blaveri et al. 2004; Nakamura, Furukawa et al. 2004; Hirono, Yamaue et al. 2010; Kim, Lee et al. 2010). Diese Vielzahl an möglicherweise relevanten Genen zeigt auch, dass vermutlich nicht eine einzige Mutation sondern erst die Akkumulation vieler Mutationen in Genen, deren Transkriptionsprodukte unter Umständen miteinander interagieren, Zellen zum Metastasieren befähigt.

Des Weiteren müssen aus dieser Vielzahl an Kandidatengenen tatsächlich relevante Gene weiter validiert und funktionell charakterisiert werden.

In den Genexpressionsvergleichen haben sich besonders die beiden Vergleichsgruppen ‚Metastase‘ und ‚zirkulierende Tumorzelle‘ klar voneinander unterschieden und dieser Vergleich lieferte auch die meisten DEGs. Dies legt die Vermutung nahe, dass es erst zur Dissemination dieser Zellen und dann im späteren Krankheitsverlauf durch mehrere genetische Alterationen zu einem ‚gain of function‘ und somit zur Metastasierung kommt. Damit besitzen disseminierte oder zirkulierende Tumorzellen eine große Bedeutung als prognostischer Marker und als mögliches Therapieziel. (Riethdorf, Wikman et al. 2008)

Da verschiedene Tumorentitäten bevorzugt in bestimmte Organe metastasieren, wird neben der ‚metastatic niche‘, lokale die Metastasierung begünstigende Gewebeveränderungen, eine organspezifische

Metastasierung aufgrund der Expression typischer Gene diskutiert. (Nguyen, Bos et al. 2009; Coghlin and Murray 2010) So konnten Vicent et al. beim Bronchialkarzinom eine für Knochenmetastasen spezifische Genexpressionssignatur zeigen und Campbell et al. fanden mittels PCR Genotypisierung phylogenetische Ähnlichkeiten bezüglich der Mutationen in den Metastasen bestimmter Organe. (Vicent, Luis-Ravelo et al. 2008; Campbell, Yachida et al. 2010) Beim Vergleich von Genexpressionsprofilen von Metastasen gleicher Organherkunft mit denen aus anderen Organen, wurden keine signifikanten DEGs gefunden. Hier ist jedoch zu beachten, dass dies auch eine Folge der kleinen Probenzahl in den einzelnen Vergleichsgruppen sein könnte. Der Vergleich zwischen Lymphknoten- und Leber- inklusive Lungenmetastasen ( $n = 6$ ) erreichte so schon ein deutlich höheres Signifikanzniveau ( $\text{adjP.} = 0,181$ ) als die anderen beiden Vergleiche (jeweils  $n = 4$ ) zwischen Lymphknoten- und Lebermetastasen ( $\text{adjP.} = 0,451$ ) bzw. Lymphknoten und Lungenmetastasen ( $\text{adjP.} = 0,404$ ). Innerhalb dieser Signifikanzniveaus lassen sich jedoch deutliche Unterschiede in der Genexpression der Metastasen der einzelnen Organe mit einem  $\log_{2}\text{FC}$  von zum Teil über 5 beobachten. Ein Vergleich der Expressionsprofile einer größeren Zahl an Metastasen pro Organ könnte hierbei Aufschluss geben und genauere Aussagen ermöglichen. Da die Metastasierung bei Reimplantation in diesen Versuchen (MiaPaCa-2 Zelllinien) jedoch keinem organspezifischem Muster folgt, ist davon auszugehen, dass eine organspezifische Genexpression nicht als Voraussetzung für eine Metastasierung in dieses Organ sondern als reaktive Anpassung der Genexpression durch lokale, organspezifische Gewebebedingungen und Signalkaskaden zu interpretieren wäre.

Frühe Dissemination, von der Größe des Primärtumors unabhängiges Metastasierungsverhalten, heterogene Zellpopulationen mit variablem Metastasierungspotential innerhalb einzelner Metastasen und die Vielzahl distinkter Gene unterschiedlicher Signalwege lassen sich am ehesten mit dem Modell einer parallelen Entwicklung erklären. Nach einer unter Umständen bereits frühen Dissemination von Tumorzellen entwickeln sich laut dieser Theorie disseminierte Zellen und der Primärtumor weitgehend unabhängig von

einander weiter und häufen zusätzliche Mutationen an, die die entsprechende Zelle z.B. zur Extravasation oder Kolonisation in fremdem Gewebe bzw. letztendlich zur Metastasierung befähigen. In dieser Hinsicht decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit auch mit denen von Campbell et al.. Sie konnten zeigen, dass es infolge von anhaltender genetischer Instabilität innerhalb von Primärtumor, disseminierten Tumorzellen und Metastasen parallel zu weiteren genetischen Alterationen kommt. In Folge dessen sind wie in dieser Arbeit unterschiedliche Gene und Signalwege an der Metastasierung beteiligt und Metastasen initiiierende Zellen können sehr heterogen sein. (Campbell, Yachida et al. 2010) Diese Heterogenität der Metastasen bestätigen auch Yachida et al. durch den Vergleich sequenzierter Genome von Primärtumoren und Metastasen. Allerdings fanden sich bei Yachida et al. den Metastasen genetisch ähnliche Zellpopulationen im Primärtumor, wie dies bei einer linearen Entwicklung zu erwarten wäre. (Yachida, Jones et al. 2010) Da es bei der parallelen Tumorprogression jedoch sowohl in Subpopulationen des Primärtumors als auch in disseminierten Zellen oder Metastasen zur Akkumulation weiterer Mutationen kommen kann, könnten bei diesem Modell alle neoplastischen Zellen das Potential zur Metastasierung erwerben. Aufgrund der geringen Fallzahl von nur 7 Patienten bei Yachida et al. bilden deren Ergebnisse also nicht unbedingt einen Widerspruch zum Modell der parallelen Entwicklung. Im Gegensatz zum Brustkrebs (Husemann, Geigl et al. 2008) scheint es beim PDAC jedoch nicht bereits im Stadium des PanIN zur Dissemination von Tumorzellen zu kommen, (Yachida, Jones et al. 2010) was die Bedeutung einer früheren Diagnosestellung weiter verdeutlicht.

## 5. Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass es auch bei nicht metastasierten Tumoren zur Dissemination von Tumorzellen kommt, dass es innerhalb von Metastasen heterogene Zellpopulationen mit unterschiedlichem Metastasierungspotential gibt und dass die Metastasierung unabhängig von der Größe des Primärtumors ist. Dies sind alles Ergebnisse, die das Modell einer parallelen Entwicklung stützen. Eine Organspezifität der Metastasierung konnte nicht belegt werden, jedoch lassen die Vergleiche der Genexpressionsprofile eine organtypische Genexpression vermuten.

Zudem konnte in dieser Arbeit eine Reihe von Kandidatengen identifiziert werden, deren Bedeutung für die Metastasierung in anschließenden Experimenten, wie z.B. Knock-down Mäusen, validiert werden müsste. Diese Gene spielen bei verschiedenen zellulären Signalwegen und Prozessen wie der Apoptose, der Zelladhäsion und -migration sowie der Transkriptionsregulation eine Rolle. Dabei handelt es sich zum Teil um neue Gene, zum Teil aber auch um Gene deren Relevanz oder die Relevanz von diesen beeinflusster Signalkaskaden bereits in anderen Arbeiten beschrieben wurde, sowie um Gene, die bei möglichen neuen Therapiekonzepten wie z.B. mit Zink eine Rolle spielen. Die Heterogenität der Metastasen sowie die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligten DEGs verdeutlichen die Bedeutung einer individualisierten Tumorthherapie. Ebenso legt das Modell einer parallelen Tumorprogression nahe, bisherige Therapiekonzepte zu überdenken bzw. weiterzuentwickeln und neue individuelle Prognosemarker und zielgerichtete Therapien wie z.B. gegen disseminierten Tumorzellen zu etablieren.



## 6. Literaturverzeichnis

- Adoue, V., S. Chavanas, F. Coudane, M. C. Mechin, C. Caubet, S. Ying, S. Dong, H. Duplan, M. Charveron, H. Takahara, G. Serre and M. Simon (2008). "Long-range enhancer differentially regulated by c-Jun and JunD controls peptidylarginine deiminase-3 gene in keratinocytes." *J Mol Biol* **384**(5): 1048-1057.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3983-3988.
- Antonescu, C. R., L. Zhang, N. E. Chang, B. R. Pawel, W. Travis, N. Katabi, M. Edelman, A. E. Rosenberg, G. P. Nielsen, P. Dal Cin and C. D. Fletcher (2010). "EWSR1-POU5F1 fusion in soft tissue myoepithelial tumors. A molecular analysis of sixty-six cases, including soft tissue, bone, and visceral lesions, showing common involvement of the EWSR1 gene." *Genes Chromosomes Cancer* **49**(12): 1114-1124.
- Arakawa, H. (2004). "Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis." *Nat Rev Cancer* **4**(12): 978-987.
- Arredondo, J., A. I. Chernyavsky and S. A. Grando (2007). "Overexpression of SLURP-1 and -2 alleviates the tumorigenic action of tobacco-derived nitrosamine on immortalized oral epithelial cells." *Biochem Pharmacol* **74**(8): 1315-1319.
- Bai, F., X. Guo, L. Yang, J. Wang, Y. Shi, F. Zhang, H. Zhai, Y. Lu, H. Xie, K. Wu and D. Fan (2007). "Establishment and characterization of a high metastatic potential in the peritoneum for human gastric cancer by orthotopic tumor cell implantation." *Dig Dis Sci* **52**(6): 1571-1578.
- Bates, P., J. A. Young and H. E. Varmus (1993). "A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor." *Cell* **74**(6): 1043-1051.
- Beer, D. G., S. L. Kardia, C. C. Huang, T. J. Giordano, A. M. Levin, D. E. Misek, L. Lin, G. Chen, T. G. Gharib, D. G. Thomas, M. L. Lizyness, R. Kuick, S. Hayasaka, J. M. Taylor, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer and S. Hanash (2002). "Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma." *Nat Med* **8**(8): 816-824.
- Behrens, J., B. A. Jerchow, M. Wurtele, J. Grimm, C. Asbrand, R. Wirtz, M. Kuhl, D. Wedlich and W. Birchmeier (1998). "Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta." *Science* **280**(5363): 596-599.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* **57**(1): 289-300.
- Berchuck, A., E. S. Iversen, J. M. Lancaster, J. Pittman, J. Luo, P. Lee, S. Murphy, H. K. Dressman, P. G. Febbo, M. West, J. R. Nevins and J. R. Marks (2005). "Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers." *Clin Cancer Res* **11**(10): 3686-3696.
- Bettencourt, C., C. Santos, R. Montiel, C. Costa Mdo, P. Cruz-Morales, L. R. Santos, N. Simoes, T. Kay, J. Vasconcelos, P. Maciel and M. Lima (2010). "Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3)." *Neurogenetics* **11**(2): 193-202.
- Bianco-Miotto, T., K. Chiam, G. Buchanan, S. Jindal, T. K. Day, M. Thomas, M. A. Pickering, M. A. O'Loughlin, N. K. Ryan, W. A. Raymond, L. G. Horvath, J. G. Kench, P. D. Stricker, V. R. Marshall, R. L. Sutherland, S. M. Henshall, W. L. Gerald, H. I. Scher, G. P. Risbridger, J. A. Clements, L. M. Butler, W. D. Tilley, D. J. Horsfall and C. Ricciardelli (2010). "Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(10): 2611-2622.

- Bolz, H., B. von Brederlow, A. Ramirez, E. C. Bryda, K. Kutsche, H. G. Nothwang, M. Seeliger, C. S. C. M. del, M. C. Vila, O. P. Molina, A. Gal and C. Kubisch (2001). "Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D." *Nat Genet* **27**(1): 108-112.
- Brandal, P., I. Panagopoulos, B. Bjerkehagen and S. Heim (2009). "t(19;22)(q13;q12) Translocation leading to the novel fusion gene EWSR1-ZNF444 in soft tissue myoepithelial carcinoma." *Genes Chromosomes Cancer* **48**(12): 1051-1056.
- Bross, I. D., E. Viadana and J. Pickren (1975). "Do generalized metastases occur directly from the primary?" *J Chronic Dis* **28**(3): 149-159.
- Bruneel, A., V. Labas, A. Mailloux, S. Sharma, N. Royer, J. Vinh, P. Pernet, M. Vaubourdolle and B. Baudin (2005). "Proteomics of human umbilical vein endothelial cells applied to etoposide-induced apoptosis." *Proteomics* **5**(15): 3876-3884.
- Bruns, C. J., M. T. Harbison, H. Kuniyasu, I. Eue and I. J. Fidler (1999). "In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice." *Neoplasia* **1**(1): 50-62.
- Buhl, A. M., N. L. Johnson, N. Dhanasekaran and G. L. Johnson (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." *J Biol Chem* **270**(42): 24631-24634.
- Burnett, B., F. Li and R. N. Pittman (2003). "The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity." *Hum Mol Genet* **12**(23): 3195-3205.
- Calzado, M. A., L. de la Vega, A. Moller, D. D. Bowtell and M. L. Schmitz (2009). "An inducible autoregulatory loop between HIPK2 and Siah2 at the apex of the hypoxic response." *Nat Cell Biol* **11**(1): 85-91.
- Campbell, P. J., S. Yachida, L. J. Mudie, P. J. Stephens, E. D. Pleasance, L. A. Stebbings, L. A. Morsberger, C. Latimer, S. McLaren, M. L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. A. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, C. A. Griffin, J. Burton, H. Swerdlow, M. A. Quail, M. R. Stratton, C. Iacobuzio-Donahue and P. A. Futreal (2010). "The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer." *Nature* **467**(7319): 1109-1113.
- Chang, H. Y., D. S. Nuyten, J. B. Sneddon, T. Hastie, R. Tibshirani, T. Sorlie, H. Dai, Y. D. He, L. J. van't Veer, H. Bartelink, M. van de Rijn, P. O. Brown and M. J. van de Vijver (2005). "Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3738-3743.
- Chen, C., E. Mendez, J. Houck, W. Fan, P. Lohavanichbutr, D. Doody, B. Yueh, N. D. Futran, M. Upton, D. G. Farwell, S. M. Schwartz and L. P. Zhao (2008). "Gene expression profiling identifies genes predictive of oral squamous cell carcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**(8): 2152-2162.
- Chen, H., R. C. Pong, Z. Wang and J. T. Hsieh (2002). "Differential regulation of the human gene DAB2IP in normal and malignant prostatic epithelia: cloning and characterization." *Genomics* **79**(4): 573-581.
- Chimienti, F., R. C. Hogg, L. Plantard, C. Lehmann, N. Brakch, J. Fischer, M. Huber, D. Bertrand and D. Hohl (2003). "Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda." *Hum Mol Genet* **12**(22): 3017-3024.
- Chou, A. H., T. H. Yeh, Y. L. Kuo, Y. C. Kao, M. J. Jou, C. Y. Hsu, S. R. Tsai, A. Kakizuka and H. L. Wang (2006). "Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL." *Neurobiol Dis* **21**(2): 333-345.
- Chow, M. K., J. P. Mackay, J. C. Whisstock, M. J. Scanlon and S. P. Bottomley (2004). "Structural and functional analysis of the Josephin domain of the polyglutamine protein ataxin-3." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 387-394.

- Coghlin, C. and G. I. Murray (2010). "Current and emerging concepts in tumour metastasis." *J Pathol* **222**(1): 1-15.
- Cubilla, A. L. and P. J. Fitzgerald (1975). "Morphological patterns of primary nonendocrine human pancreas carcinoma." *Cancer Res* **35**(8): 2234-2248.
- Cubilla, A. L., P. J. Fitzgerald and Armed Forces Institute of Pathology (U.S.) (1984). *Tumors of the exocrine pancreas*. Washington, D.C., Armed Forces Institute of Pathology : For sale by Armed Forces Institute of Pathology.
- D'Orazi, G., M. G. Sciulli, V. Di Stefano, S. Riccioni, M. Frattini, R. Falcioni, L. Bertario, A. Sacchi and P. Patrignani (2006). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 restrains cytosolic phospholipase A2-dependent prostaglandin E2 generation in human colorectal cancer cells." *Clin Cancer Res* **12**(3 Pt 1): 735-741.
- Di Stefano, V., G. Blandino, A. Sacchi, S. Soddu and G. D'Orazi (2004). "HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function." *Oncogene* **23**(30): 5185-5192.
- Dote, H., S. Toyooka, K. Tsukuda, M. Yano, M. Ouchida, H. Doihara, M. Suzuki, H. Chen, J. T. Hsieh, A. F. Gazdar and N. Shimizu (2004). "Aberrant promoter methylation in human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in breast cancer." *Clin Cancer Res* **10**(6): 2082-2089.
- Duggan, D., S. L. Zheng, M. Knowlton, D. Benitez, L. Dimitrov, F. Wiklund, C. Robbins, S. D. Isaacs, Y. Cheng, G. Li, J. Sun, B. L. Chang, L. Marovich, K. E. Wiley, K. Balter, P. Stattin, H. O. Adami, M. Gielzak, G. Yan, J. Sauvageot, W. Liu, J. W. Kim, E. R. Bleecker, D. A. Meyers, B. J. Trock, A. W. Partin, P. C. Walsh, W. B. Isaacs, H. Gronberg, J. Xu and J. D. Carpten (2007). "Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP." *J Natl Cancer Inst* **99**(24): 1836-1844.
- Dumartin, L., C. Quemener, H. Laklai, J. Herbert, R. Bicknell, C. Bousquet, S. Pyronnet, V. Castronovo, M. K. Schilling, A. Bikfalvi and M. Hagedorn (2010). "Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells." *Gastroenterology* **138**(4): 1595-1606, 1606 e1591-1598.
- Emmel, V. E., I. Alonso, L. B. Jardim, M. L. Saraiva-Pereira and J. Sequeiros (2011). "Does DNA methylation in the promoter region of the ATXN3 gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients?" *Clin Genet* **79**(1): 100-102.
- Favre, B., L. Plantard, L. Aeschbach, N. Brakch, S. Christen-Zaech, P. A. de Viragh, A. Sergeant, M. Huber and D. Hohl (2007). "SLURP1 is a late marker of epidermal differentiation and is absent in Mal de Meleda." *J Invest Dermatol* **127**(2): 301-308.
- Federspiel, M. J., P. Bates, J. A. Young, H. E. Varmus and S. H. Hughes (1994). "A system for tissue-specific gene targeting: transgenic mice susceptible to subgroup A avian leukosis virus-based retroviral vectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 11241-11245.
- Ferro, A., A. L. Carvalho, A. Teixeira-Castro, C. Almeida, R. J. Tome, L. Cortes, A. J. Rodrigues, E. Logarinho, J. Sequeiros, S. Macedo-Ribeiro and P. Maciel (2007). "NEDD8: a new ataxin-3 interactor." *Biochim Biophys Acta* **1773**(11): 1619-1627.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 453-458.
- Flanagan, S. P. (1966). "'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse." *Genet Res* **8**(3): 295-309.
- Gallagher, G., D. E. Horsman, P. Tsang and D. L. Forrest (2008). "Fusion of PRKG2 and SPTBN1 to the platelet-derived growth factor receptor beta gene (PDGFRB) in imatinib-responsive atypical myeloproliferative disorders." *Cancer Genet Cytogenet* **181**(1): 46-51.
- Giraud, S., C. Diaz-Latoud, S. Hacot, J. Textoris, R. P. Bourette and J. J. Diaz (2004). "US11 of herpes simplex virus type 1 interacts with HIPK2 and antagonizes HIPK2-induced cell growth arrest." *J Virol* **78**(6): 2984-2993.
- Gordon, G. J., L. Dong, B. Y. Yeap, W. G. Richards, J. N. Glickman, H. Edenfield, M. Mani, R. Colquitt, G. Maulik, B. Van Oss, D. J. Sugarbaker and R. Bueno (2009). "Four-

- gene expression ratio test for survival in patients undergoing surgery for mesothelioma." J Natl Cancer Inst **101**(9): 678-686.
- Grand, F. H., S. Iqbal, L. Zhang, N. H. Russell, A. Chase and N. C. Cross (2007). "A constitutively active SPTBN1-FLT3 fusion in atypical chronic myeloid leukemia is sensitive to tyrosine kinase inhibitors and immunotherapy." Exp Hematol **35**(11): 1723-1727.
- Guerrin, M., A. Ishigami, M. C. Mechin, R. Nachat, S. Valmary, M. Sebbag, M. Simon, T. Senshu and G. Serre (2003). "cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I." Biochem J **370**(Pt 1): 167-174.
- Guillemette, B. and L. Gaudreau (2006). "Reuniting the contrasting functions of H2A.Z." Biochem Cell Biol **84**(4): 528-535.
- Gupta, I. R. and A. K. Ryan (2010). "Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease." Clin Genet **77**(4): 314-325.
- Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy and R. A. Depinho (2006). "Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Genes Dev **20**(10): 1218-1249.
- Hirono, S., H. Yamaue, Y. Hoshikawa, S. Ina, M. Tani, M. Kawai, M. Ushijima, M. Matsuura, Y. Saiki, A. Saiura, J. Yamamoto, Y. Miki and T. Noda (2010). "Molecular markers associated with lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma by genome-wide expression profiling." Cancer Sci **101**(1): 259-266.
- Hoffman, E. P., T. Awad, J. Palma, T. Webster, E. Hubbell, J. A. Warrington, A. Spira, G. Wright, J. Buckley, T. Triche, R. Davis, R. Tibshirani, W. Xiao, W. Jones, R. Tompkins and M. West (2004). "Expression profiling--best practices for data generation and interpretation in clinical trials." Nat Rev Genet **5**(3): 229-237.
- Hofmann, T. G., N. Stollberg, M. L. Schmitz and H. Will (2003). "HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells." Cancer Res **63**(23): 8271-8277.
- Hu, R. J., M. Watanabe and V. Bennett (1992). "Characterization of human brain cDNA encoding the general isoform of beta-spectrin." J Biol Chem **267**(26): 18715-18722.
- Huang, Y., H. Friess, J. Kleeff, I. Esposito, Z. Zhu, S. Liu, S. C. Mok, A. Zimmermann and M. W. Buchler (2001). "Doc-2/hDab2 expression is up-regulated in primary pancreatic cancer but reduced in metastasis." Lab Invest **81**(6): 863-873.
- Hughes, S. H., J. J. Greenhouse, C. J. Petropoulos and P. Suttrave (1987). "Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors." J Virol **61**(10): 3004-3012.
- Husemann, Y., J. B. Geigl, F. Schubert, P. Musiani, M. Meyer, E. Burghart, G. Forni, R. Eils, T. Fehm, G. Riethmuller and C. A. Klein (2008). "Systemic spread is an early step in breast cancer." Cancer Cell **13**(1): 58-68.
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu and E. Ward (2010). "Cancer statistics, 2010." CA Cancer J Clin **60**(5): 277-300.
- Jho, E. H., T. Zhang, C. Domon, C. K. Joo, J. N. Freund and F. Costantini (2002). "Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway." Mol Cell Biol **22**(4): 1172-1183.
- Jiang, X., S. Gillen, I. Esposito, N. A. Giese, C. W. Michalski, H. Friess and J. Kleeff (2010). "Reduced expression of the membrane skeleton protein beta1-spectrin (SPTBN1) is associated with worsened prognosis in pancreatic cancer." Histol Histopathol **25**(12): 1497-1506.
- Johnstone, C. N., S. Castellvi-Bel, L. M. Chang, X. Bessa, H. Nakagawa, H. Harada, R. K. Sung, J. M. Pique, A. Castells and A. K. Rustgi (2004). "ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers." Gene **336**(1): 59-71.
- Jolliffe, I. T. (2002). Principal component analysis. New York, Springer.

- Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S. M. Hong, B. Fu, M. T. Lin, E. S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D. R. Smith, M. Hidalgo, S. D. Leach, A. P. Klein, E. M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J. R. Eshleman, S. E. Kern, R. H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu and K. W. Kinzler (2008). "Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses." *Science* **321**(5897): 1801-1806.
- Katoh, M. (2004). "Characterization of human ARHGAP10 gene in silico." *Int J Oncol* **25**(4): 1201-1206.
- Katoh, Y. and M. Katoh (2004). "Identification and characterization of ARHGAP27 gene in silico." *Int J Mol Med* **14**(5): 943-947.
- Kaur, R., X. Yuan, M. L. Lu and S. P. Balk (2008). "Increased PAK6 expression in prostate cancer and identification of PAK6 associated proteins." *Prostate* **68**(14): 1510-1516.
- Kelly, P., B. J. Moeller, J. Juneja, M. A. Booden, C. J. Der, Y. Daaka, M. W. Dewhirst, T. A. Fields and P. J. Casey (2006). "The G12 family of heterotrimeric G proteins promotes breast cancer invasion and metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8173-8178.
- Kelly, P., L. N. Stemmler, J. F. Madden, T. A. Fields, Y. Daaka and P. J. Casey (2006). "A role for the G12 family of heterotrimeric G proteins in prostate cancer invasion." *J Biol Chem* **281**(36): 26483-26490.
- Kennedy, T. E., T. Serafini, J. R. de la Torre and M. Tessier-Lavigne (1994). "Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord." *Cell* **78**(3): 425-435.
- Kim, J. H., J. Y. Lee, K. T. Lee, J. K. Lee, K. H. Lee, K. T. Jang, J. S. Heo, S. H. Choi and J. C. Rhee (2010). "RGS16 and FosB underexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promote tumor progression." *Tumour Biol* **31**(5): 541-548.
- Kim, S. Y. and D. J. Volsky (2005). "PAGE: parametric analysis of gene set enrichment." *BMC Bioinformatics* **6**: 144.
- Kimmelman, A. C., A. F. Hezel, A. J. Aguirre, H. Zheng, J. H. Paik, H. Ying, G. C. Chu, J. X. Zhang, E. Sahin, G. Yeo, A. Ponugoti, R. Nabioullin, S. Deroo, S. Yang, X. Wang, J. P. McGrath, M. Protopopova, E. Ivanova, J. Zhang, B. Feng, M. S. Tsao, M. Redston, A. Protopopov, Y. Xiao, P. A. Futreal, W. C. Hahn, D. S. Klimstra, L. Chin and R. A. DePinho (2008). "Genomic alterations link Rho family of GTPases to the highly invasive phenotype of pancreas cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(49): 19372-19377.
- Klein, C. A. (2009). "Parallel progression of primary tumours and metastases." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 302-312.
- Klein, C. A., T. J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler, M. Petronio, B. Polzer, N. H. Stoecklein and G. Riethmuller (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." *Lancet* **360**(9334): 683-689.
- Kumar, R. N., S. K. Shore and N. Dhanasekaran (2006). "Neoplastic transformation by the gep oncogene, Galpha12, involves signaling by STAT3." *Oncogene* **25**(6): 899-906.
- Kuukasjarvi, T., R. Karhu, M. Tanner, M. Kahkonen, A. Schaffer, N. Nupponen, S. Pennanen, A. Kallioniemi, O. P. Kallioniemi and J. Isola (1997). "Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer." *Cancer Res* **57**(8): 1597-1604.
- Latil, A., L. Chene, B. Cochant-Priollet, P. Mangin, G. Fournier, P. Berthon and O. Cussenot (2003). "Quantification of expression of netrins, slits and their receptors in human prostate tumors." *Int J Cancer* **103**(3): 306-315.

- Lee, S. R., S. M. Ramos, A. Ko, D. Masiello, K. D. Swanson, M. L. Lu and S. P. Balk (2002). "AR and ER interaction with a p21-activated kinase (PAK6)." Mol Endocrinol **16**(1): 85-99.
- Leffers, H., M. S. Nielsen, A. H. Andersen, B. Honore, P. Madsen, J. Vandekerckhove and J. E. Celis (1993). "Identification of two human Rho GDP dissociation inhibitor proteins whose overexpression leads to disruption of the actin cytoskeleton." Exp Cell Res **209**(2): 165-174.
- Lin, L., R. Amin, G. I. Gallicano, E. Glasgow, W. Jogunoori, J. M. Jessup, M. Zasloff, J. L. Marshall, K. Shetty, L. Johnson, L. Mishra and A. R. He (2009). "The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling." Oncogene **28**(7): 961-972.
- Liu, W., X. Dong, M. Mai, R. S. Seelan, K. Taniguchi, K. K. Krishnadath, K. C. Halling, J. M. Cunningham, L. A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S. S. Schmidt, P. C. Roche, D. I. Smith and S. N. Thibodeau (2000). "Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling." Nat Genet **26**(2): 146-147.
- Lowy, A. M., C. Fenoglio-Preiser, O. J. Kim, J. Kordich, A. Gomez, J. Knight, L. James and J. Groden (2003). "Dysregulation of beta-catenin expression correlates with tumor differentiation in pancreatic duct adenocarcinoma." Ann Surg Oncol **10**(3): 284-290.
- Lua, B. L. and B. C. Low (2004). "BPGAP1 interacts with cortactin and facilitates its translocation to cell periphery for enhanced cell migration." Mol Biol Cell **15**(6): 2873-2883.
- Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P. M. Schlag, W. Birchmeier and J. Behrens (2002). "Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors." Mol Cell Biol **22**(4): 1184-1193.
- Mai, M., C. Qian, A. Yokomizo, D. I. Smith and W. Liu (1999). "Cloning of the human homolog of conductin (AXIN2), a gene mapping to chromosome 17q23-q24." Genomics **55**(3): 341-344.
- Meigs, T. E., M. Fedor-Chaiken, D. D. Kaplan, R. Brackenbury and P. J. Casey (2002). "Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin." J Biol Chem **277**(27): 24594-24600.
- Meigs, T. E., T. A. Fields, D. D. McKee and P. J. Casey (2001). "Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 519-524.
- Meyerhardt, J. A., K. Caca, B. C. Eckstrand, G. Hu, C. Lengauer, S. Banavali, A. T. Look and E. R. Fearon (1999). "Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas." Cell Growth Differ **10**(1): 35-42.
- Missiaglia, E., E. Blaveri, B. Terris, Y. H. Wang, E. Costello, J. P. Neoptolemos, T. Crnogorac-Jurcevic and N. R. Lemoine (2004). "Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis." Int J Cancer **112**(1): 100-112.
- Moehlenbrink, J., N. Bitomsky and T. G. Hofmann (2010). "Hypoxia suppresses chemotherapeutic drug-induced p53 Serine 46 phosphorylation by triggering HIPK2 degradation." Cancer Lett **292**(1): 119-124.
- Mok, S. C., W. Y. Chan, K. K. Wong, K. K. Cheung, C. C. Lau, S. W. Ng, A. Baldini, C. V. Colitti, C. O. Rock and R. S. Berkowitz (1998). "DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer." Oncogene **16**(18): 2381-2387.
- Mootha, V. K., C. M. Lindgren, K. F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M. J. Daly, N. Patterson, J. P. Mesirov, T. R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E. S. Lander, J. N. Hirschhorn, D. Altshuler and L. C. Groop (2003). "PGC-1alpha-responsive

- genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes." *Nat Genet* **34**(3): 267-273.
- Nakamura, T., Y. Furukawa, H. Nakagawa, T. Tsunoda, H. Ohigashi, K. Murata, O. Ishikawa, K. Ohgaki, N. Kashimura, M. Miyamoto, S. Hirano, S. Kondo, H. Katoh, Y. Nakamura and T. Katagiri (2004). "Genome-wide cDNA microarray analysis of gene expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection." *Oncogene* **23**(13): 2385-2400.
- Nardinocchi, L., R. Puca, D. Givol and G. D'Orazi (2010). "Counteracting MDM2-induced HIPK2 downregulation restores HIPK2/p53 apoptotic signaling in cancer cells." *FEBS Lett* **584**(19): 4253-4258.
- Nardinocchi, L., R. Puca, A. Sacchi, G. Rechavi, D. Givol and G. D'Orazi (2009). "Targeting hypoxia in cancer cells by restoring homeodomain interacting protein-kinase 2 and p53 activity and suppressing HIF-1alpha." *PLoS One* **4**(8): e6819.
- Neiger-Aeschbacher, G. (2002). "[Anaesthesia and analgesia of small mammals. Part 2: Intra- and postoperative care]." *Schweiz Arch Tierheilkd* **144**(11): 597-604.
- Newcombe, A. R., R. W. Stockley, J. L. Hunter and M. R. Webb (1999). "The interaction between rac1 and its guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI), monitored by a single fluorescent coumarin attached to GDI." *Biochemistry* **38**(21): 6879-6886.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos and J. Massague (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 274-284.
- Offermanns, S. (2001). "In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice." *Oncogene* **20**(13): 1635-1642.
- Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher and G. Schultz (1994). "G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 504-508.
- Pan, C. Q., Y. C. Liou and B. C. Low (2010). "Active Mek2 as a regulatory scaffold that promotes Pin1 binding to BPGAP1 to suppress BPGAP1-induced acute Erk activation and cell migration." *J Cell Sci* **123**(Pt 6): 903-916.
- Pantelouris, E. M. (1968). "Absence of thymus in a mouse mutant." *Nature* **217**(5126): 370-371.
- Pasca di Magliano, M., A. V. Biankin, P. W. Heiser, D. A. Cano, P. J. Gutierrez, T. Deramandt, D. Segara, A. C. Dawson, J. G. Kench, S. M. Henshall, R. L. Sutherland, A. Dlugosz, A. K. Rustgi and M. Hebrok (2007). "Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma." *PLoS One* **2**(11): e1155.
- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.
- Potti, A., S. Mukherjee, R. Petersen, H. K. Dressman, A. Bild, J. Koontz, R. Kratzke, M. A. Watson, M. Kelley, G. S. Ginsburg, M. West, D. H. Harpole, Jr. and J. R. Nevins (2006). "A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer." *N Engl J Med* **355**(6): 570-580.
- Ramaswamy, S., K. N. Ross, E. S. Lander and T. R. Golub (2003). "A molecular signature of metastasis in primary solid tumors." *Nat Genet* **33**(1): 49-54.
- Richter, A., M. Niedergethmann, J. W. Sturm, D. Lorenz, S. Post and M. Trede (2003). "Long-term results of partial pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreatic head: 25-year experience." *World J Surg* **27**(3): 324-329.
- Riethdorf, S., H. Wikman and K. Pantel (2008). "Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients." *Int J Cancer* **123**(9): 1991-2006.
- Rizzolo, L. J., X. Chen, M. Weitzman, R. Sun and H. Zhang (2007). "Analysis of the RPE transcriptome reveals dynamic changes during the development of the outer blood-retinal barrier." *Mol Vis* **13**: 1259-1273.

- Robert-Koch-Institut (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. Berlin, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. **7. Ausgabe.**
- Rosenberger, P., J. M. Schwab, V. Mirakaj, E. Masekowsky, A. Mager, J. C. Morote-Garcia, K. Unertl and H. K. Eltzschig (2009). "Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia." Nat Immunol **10**(2): 195-202.
- Ruhl, D. D., J. Jin, Y. Cai, S. Swanson, L. Florens, M. P. Washburn, R. C. Conaway, J. W. Conaway and J. C. Chrivia (2006). "Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes." Biochemistry **45**(17): 5671-5677.
- Sabath, E., H. Negoro, S. Beaudry, M. Paniagua, S. Angelow, J. Shah, N. Grammatikakis, A. S. Yu and B. M. Denker (2008). "Alpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly." J Cell Sci **121**(Pt 6): 814-824.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, A. Daskalakis, M. Granzow, A. Ahr, T. J. Blankenstein, M. Kaufmann, J. Diebold, H. Arnholdt, P. Muller, J. Bischoff, D. Harich, G. Schlimok, G. Riethmuller, R. Eils and C. A. Klein (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7737-7742.
- Schmitt, I., M. Linden, H. Khazneh, B. O. Evert, P. Breuer, T. Klockgether and U. Wuellner (2007). "Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination." Biochem Biophys Res Commun **362**(3): 734-739.
- Schneider, G., J. T. Siveke, F. Eckel and R. M. Schmid (2005). "Pancreatic cancer: basic and clinical aspects." Gastroenterology **128**(6): 1606-1625.
- Schultz, J. M., Y. Yang, A. J. Caride, A. G. Filoteo, A. R. Penheiter, A. Lagziel, R. J. Morell, S. A. Mohiddin, L. Fananapazir, A. C. Madeo, J. T. Penniston and A. J. Griffith (2005). "Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2." N Engl J Med **352**(15): 1557-1564.
- Schwarting, G. A., D. Raitcheva, E. P. Bless, S. L. Ackerman and S. Tobet (2004). "Netrin 1-mediated chemoattraction regulates the migratory pathway of LHRH neurons." Eur J Neurosci **19**(1): 11-20.
- Segal, E., N. Friedman, D. Koller and A. Regev (2004). "A module map showing conditional activity of expression modules in cancer." Nat Genet **36**(10): 1090-1098.
- Sener, S. F., A. Fremgen, H. R. Menck and D. P. Winchester (1999). "Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database." J Am Coll Surg **189**(1): 1-7.
- Shapiro, S. S. and M. B. Wilk (1965). "An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples)." Biometrika **52**: 591-&.
- Siemens, J., P. Kazmierczak, A. Reynolds, M. Sticker, A. Littlewood-Evans and U. Muller (2002). "The Usher syndrome proteins cadherin 23 and harmonin form a complex by means of PDZ-domain interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14946-14951.
- Simon, A. R., H. G. Vikis, S. Stewart, B. L. Fanburg, B. H. Cochran and K. L. Guan (2000). "Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase." Science **290**(5489): 144-147.
- Singh, D., P. G. Febbo, K. Ross, D. G. Jackson, J. Manola, C. Ladd, P. Tamayo, A. A. Renshaw, A. V. D'Amico, J. P. Richie, E. S. Lander, M. Loda, P. W. Kantoff, T. R. Golub and W. R. Sellers (2002). "Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior." Cancer Cell **1**(2): 203-209.
- Sipos, B., S. Moser, H. Kalthoff, V. Torok, M. Lohr and G. Kloppel (2003). "A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards



- the establishment of an in vitro research platform." *Virchows Arch* **442**(5): 444-452.
- Slupianek, A., S. Yerrum, F. F. Safadi and M. A. Monroy (2010). "The chromatin remodeling factor SRCAP modulates expression of prostate specific antigen and cellular proliferation in prostate cancer cells." *J Cell Physiol* **224**(2): 369-375.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3.
- Smyth, G. K. and T. Speed (2003). "Normalization of cDNA microarray data." *Methods* **31**(4): 265-273.
- Song, J. Y., J. K. Lee, N. W. Lee, H. H. Jung, S. H. Kim and K. W. Lee (2008). "Microarray analysis of normal cervix, carcinoma in situ, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer." *Int J Gynecol Cancer* **18**(5): 1051-1059.
- Stathis, A. and M. J. Moore (2010). "Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges." *Nat Rev Clin Oncol* **7**(3): 163-172.
- Strathmann, M. and M. I. Simon (1990). "G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9113-9117.
- Strickland, P., G. C. Shin, A. Plump, M. Tessier-Lavigne and L. Hinck (2006). "Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis." *Development* **133**(5): 823-832.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-15550.
- Suzuki, K., D. Hu, T. Bustos, J. Zlotogora, A. Richieri-Costa, J. A. Helms and R. A. Spritz (2000). "Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia." *Nat Genet* **25**(4): 427-430.
- Takahashi, K., H. Nakanishi, M. Miyahara, K. Mandai, K. Satoh, A. Satoh, H. Nishioka, J. Aoki, A. Nomoto, A. Mizoguchi and Y. Takai (1999). "Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein." *J Cell Biol* **145**(3): 539-549.
- Takatsu, H., K. Hase, M. Ohmae, S. Ohshima, K. Hashimoto, N. Taniura, A. Yamamoto and H. Ohno (2006). "CD300 antigen like family member G: A novel Ig receptor like protein exclusively expressed on capillary endothelium." *Biochem Biophys Res Commun* **348**(1): 183-191.
- Tan, M. H., N. J. Nowak, R. Loor, H. Ochi, A. A. Sandberg, C. Lopez, J. W. Pickren, R. Berjian, H. O. Douglass, Jr. and T. M. Chu (1986). "Characterization of a new primary human pancreatic tumor line." *Cancer Invest* **4**(1): 15-23.
- Tang, Y., V. Katuri, A. Dillner, B. Mishra, C. X. Deng and L. Mishra (2003). "Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice." *Science* **299**(5606): 574-577.
- Tang, Y., V. Katuri, R. Srinivasan, F. Fogt, R. Redman, G. Anand, A. Said, T. Fishbein, M. Zasloff, E. P. Reddy, B. Mishra and L. Mishra (2005). "Transforming growth factor-beta suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis." *Cancer Res* **65**(10): 4228-4237.
- Tjiu, J. W., P. J. Lin, W. H. Wu, Y. P. Cheng, H. C. Chiu, H. Y. Thong, B. L. Chiang, W. S. Yang and S. H. Jee (2011). "SLURP1 mutation-impaired T-cell activation in a family with mal de Meleda." *Br J Dermatol* **164**(1): 47-53.
- van 't Veer, L. J., H. Dai, M. J. van de Vijver, Y. D. He, A. A. Hart, M. Mao, H. L. Peterse, K. van der Kooy, M. J. Marton, A. T. Witteveen, G. J. Schreiber, R. M. Kerkhoven, C. Roberts, P. S. Linsley, R. Bernards and S. H. Friend (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." *Nature* **415**(6871): 530-536.

- Vicent, S., D. Luis-Ravelo, I. Anton, I. Garcia-Tunon, F. Borrás-Cuesta, J. Dotor, J. De Las Rivas and F. Lecanda (2008). "A novel lung cancer signature mediates metastatic bone colonization by a dual mechanism." *Cancer Res* **68**(7): 2275-2285.
- Waalder, J., O. Machon, J. P. von Kries, S. R. Wilson, E. Lundenes, D. Wedlich, D. Gradl, J. E. Paulsen, O. Machonova, J. L. Dembinski, H. Dinh and S. Krauss (2011). "Novel synthetic antagonists of canonical Wnt signaling inhibit colorectal cancer cell growth." *Cancer Res* **71**(1): 197-205.
- Watson, R. L., A. C. Spalding, S. P. Zielske, M. Morgan, A. C. Kim, G. T. Bommer, H. Eldar-Finkelman, T. Giordano, E. R. Fearon, G. D. Hammer, T. S. Lawrence and E. Ben-Josef (2010). "GSK3beta and beta-catenin modulate radiation cytotoxicity in pancreatic cancer." *Neoplasia* **12**(5): 357-365.
- Weigelt, B., A. M. Glas, L. F. Wessels, A. T. Witteveen, J. L. Peterse and L. J. van't Veer (2003). "Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15901-15905.
- Weigelt, B., J. L. Peterse and L. J. van 't Veer (2005). "Breast cancer metastasis: markers and models." *Nat Rev Cancer* **5**(8): 591-602.
- Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*. New York, Garland Science.
- Weiss, L., J. C. Holmes and P. M. Ward (1983). "Do metastases arise from pre-existing subpopulations of cancer cells?" *Br J Cancer* **47**(1): 81-89.
- Wells, C. M. and G. E. Jones (2010). "The emerging importance of group II PAKs." *Biochem J* **425**(3): 465-473.
- West, M., C. Blanchette, H. Dressman, E. Huang, S. Ishida, R. Spang, H. Zuzan, J. A. Olson, Jr., J. R. Marks and J. R. Nevins (2001). "Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11462-11467.
- Winter, M., D. Sombroek, I. Dauth, J. Moehlenbrink, K. Scheuermann, J. Crone and T. G. Hofmann (2008). "Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR." *Nat Cell Biol* **10**(7): 812-824.
- Wong, M. M., L. K. Cox and J. C. Chrivia (2007). "The chromatin remodeling protein, SRCAP, is critical for deposition of the histone variant H2A.Z at promoters." *J Biol Chem* **282**(36): 26132-26139.
- Wortis, H. H. (1971). "Immunological responses of 'nude' mice." *Clin Exp Immunol* **8**(2): 305-317.
- Xie, D., C. Gore, J. Liu, R. C. Pong, R. Mason, G. Hao, M. Long, W. Kabbani, L. Yu, H. Zhang, H. Chen, X. Sun, D. A. Boothman, W. Min and J. T. Hsieh (2010). "Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(6): 2485-2490.
- Xie, D., C. Gore, J. Zhou, R. C. Pong, H. Zhang, L. Yu, R. L. Vessella, W. Min and J. T. Hsieh (2009). "DAB2IP coordinates both PI3K-Akt and ASK1 pathways for cell survival and apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(47): 19878-19883.
- Yachida, S., S. Jones, I. Bozic, T. Antal, R. Leary, B. Fu, M. Kamiyama, R. H. Hruban, J. R. Eshleman, M. A. Nowak, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and C. A. Iacobuzio-Donahue (2010). "Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer." *Nature* **467**(7319): 1114-1117.
- Yang, F., X. Li, M. Sharma, M. Zarnegar, B. Lim and Z. Sun (2001). "Androgen receptor specifically interacts with a novel p21-activated kinase, PAK6." *J Biol Chem* **276**(18): 15345-15353.
- Yano, M., S. Toyooka, K. Tsukuda, H. Dote, M. Ouchida, T. Hanabata, M. Aoe, H. Date, A. F. Gazdar and N. Shimizu (2005). "Aberrant promoter methylation of human DAB2 interactive protein (hDAB2IP) gene in lung cancers." *Int J Cancer* **113**(1): 59-66.
- Yao, Z. X., W. Jogunoori, S. Choufani, A. Rashid, T. Blake, W. Yao, P. Kreishman, R. Amin, A. A. Sidawy, S. R. Evans, M. Finegold, E. P. Reddy, B. Mishra, R. Weksberg, R. Kumar and L. Mishra (2010). "Epigenetic silencing of beta-spectrin,

- a TGF-beta signaling/scaffolding protein in a human cancer stem cell disorder: Beckwith-Wiedemann syndrome." J Biol Chem **285**(46): 36112-36120.
- Ying, S., S. Dong, A. Kawada, T. Kojima, S. Chavanas, M. C. Mechin, V. Adoue, G. Serre, M. Simon and H. Takahara (2009). "Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes." J Dermatol Sci **53**(1): 2-9.
- Yoshizawa, T., Y. Yamagishi, N. Koseki, J. Goto, H. Yoshida, F. Shibasaki, S. Shoji and I. Kanazawa (2000). "Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch." Hum Mol Genet **9**(1): 69-78.
- Yunis, A. A., G. K. Arimura and D. J. Russin (1977). "Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase." Int J Cancer **19**(1): 128-135.
- Zhu, X., K. Higashimoto, H. Soejima, H. Yatsuki, H. Sugihara, T. Mukai and K. Joh (2000). "C11orf21, a novel gene within the Beckwith-Wiedemann syndrome region in human chromosome 11p15.5." Gene **256**(1-2): 311-317.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schritte der Metastasierung .....	9
Abbildung 2: Linear Progression Model .....	10
Abbildung 3: Parallel Progression Model .....	11
Abbildung 4: Mesenchymaler Phänotyp der MiaPaCa-2 Zellen .....	15
Abbildung 5: In-vivo Bildgebung .....	18
Abbildung 6: Ex-vivo Bildgebung .....	19
Abbildung 7: Befundung der isolierten Metastasen .....	29
Abbildung 8: Western Blot anti E-Cadherin .....	32
Abbildung 9: Genexpressionsvergleich: Zelllinien mit epithelalem (n=12) versus mesenchymalen (n=6) Phänotyp .....	33
Abbildung 10: Genexpressionsvergleich: Organspezifische Metastasierung .....	39
Abbildung 11: Diffuse Infiltration der Lunge durch Tumorzellen .....	40
Abbildung 12: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Primärtumor (n=3) versus Metastase (n=6) .....	42
Abbildung 13: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 und BxPc3 Zellen: Primärtumor (n=7) versus Metastase (n=12) .....	47
Abbildung 14: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Metastasierende- (n=5) versus nicht metastasierende Zelllinien (n=8) .....	48
Abbildung 15: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 und BxPc3 Zellen: Metastasierende- (n=13) versus nicht metastasierende Zelllinien (n=9) .....	50
Abbildung 16: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Primärtumore (n=3) versus im Blut zirkulierende Tumorzellen (n=4) .....	51
Abbildung 17: Genexpressionsvergleich: MiaPaCa-2 Zellen: Metastasen (n=6) versus im Blut zirkulierende Tumorzellen (n=4) .....	52

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erst- und biotinylierter Zweitantikörper IHC .....	22
Tabelle 2: Zusammensetzung Sammel- und Trenngel Western Blot .....	23
Tabelle 3: Antikörper Western Blot .....	24
Tabelle 4: Metastasierungspotential orthotop implantierter MiaPaCa-2 Zelllinien ...	30
Tabelle 5: Metastasierungspotential der orthotop implantierten BxPc3 Zelllinien ...	31
Tabelle 6: Mittlere Tumolvolumina der implantierten Zelllinien .....	35

---

## 9. Grafikverzeichnis

Grafik 1: Principal Component Analysis.....	34
Grafik 2: Streudiagramm: Verteilung von mittlerem Tumorvolumen und Metastasierungspotential.....	36
Grafik 3: Boxplot: Vergleich der Tumorvolumina in metastasierten und nicht metastasierten Primärtumoren.....	37
Grafik 4: Balkendiagramm: Organspezifität der Metastasierung.....	38

## 10. Anhang

### 10.1 Mausliste

	<u>OP datum</u>	<u>implantierte Zellen:</u>	<u>Anzahl</u>	<u>In-vivo imaging Befund</u>	<u>getötet am</u>	<u>Primärtumor:</u>	<u>Sonstiges:</u>	<u>Ex-vivo imaging Befund</u>
19901	20.08.2007	MiaPaCa βactin fluc EGFP tva 8 P18	10e6 Zellen	Tumor: (+)	23.11.2007	2,5x2x1 cm		Lunge
19902	20.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	16.10.2007	3x2x2 cm		abd+th Lks+Leber
19903	20.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	16.10.2007	3x2,5x2cm		Leber+Lunge+th Lk
19904	21.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	29.10.2007	1,5x1x1 cm		Lunge flächig + abd Lk
19905	21.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	07.11.2007	2,5x2x1,5 cm		Primärtumor+Lunge+ abd+ th Lk
19906	21.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: (+)	27.01.2008	1,5x1,1 cm	Splenomegalie	makroskopischer Leberbefund negativ
19907	21.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	28.10.2007	1,5x1x1 cm	Aszites: ++	2th Lks+abd Lk +Lunge diffus +
19908	22.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	07.11.2007	3x2x1,5 cm	Aszites: +++	viele abd Lks+ Leber+ Lunge+ Bursatumor+ Peritonealtumor +
19909	22.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	12.11.2007	3x3x2 cm	Aszites: + Magen, Milz, Pankreas in großem Tumor verwachsen; 2. Peritonealmetastase	abd Tumor+ Leber+ Lunge+ viele abd Lks+
19910	22.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	12.11.2007	1x0,5x1 cm	großer Tumor ins Peritoneum infiltrierend +Peritonealmetastase Aszites:++	Primärtumor+ Lunge+ 2abd Lks+ th Lk
19911	30.08.2007	MiaPaCa βactin fluc EGFP tva 8 P5 aus 1640 Lymphknotenmetastase thorakal	10e6 Zellen	Tumor: +++; 2.Herd!	30.09.2007	3x1x0,5cm		alles negativ
19912	30.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: ++	05.10.2007	2x1x0,5 cm		abd. Lks + Lunge
19913	30.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +++; >2 Zentren	30.09.2007	2x1x1cm		Abdomen+ Thoraxlk+
19914	30.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +; 2 Herde	12.10.2007	1,5x1,5x1 cm		Leber
19915	30.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: ++	05.10.2007	2x1,5x1,5 cm		LeistenLks+Lunge+Leber
19916	31.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: ++	04.10.2007	1x1x2 cm		alles negativ
19917	31.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: +++	04.10.2007	1x1x0,5 cm		2 AbdomenLks+Leistenlk
19918	31.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: ++	12.10.2007	2x1,5x1 cm		alles negativ
19919	31.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: ++	16.11.2007	2,5x2x2 cm	Aszites: +	abd Truncus Lk, Leber diffus Luzi +

19920	31.08.2007		10e6 Zellen	Tumor: ++	21.10.2007	2,5x2x1 cm		Lunge+Leber
19931	06.09.2007	MiaPaCa βsactin fluc EGFP tva 8 P 4 aus 1640 Lebermetastase	10e6 Zellen	Tumor: (+)	14.11.2007	3x1,5x1,5 cm	Splenomegalie	Primärtumor schwach +, alles andere -
19932	06.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: (+)	26.10.2007		Maus tot im Käfig	
19933	06.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	29.10.2007	2,5x2x1,5 cm	nekrotischer Leberlappen?	alles negativ
19934	06.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	03.11.2007	1x1x1 cm	abd+ax+th Lks deutlich vergrößert	alles negativ
19935	07.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +			Maus tot im Käfig	
19936	07.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	21.10.2007	3x2x1 cm		Leber +2 abd Lks+th Lk
19937	07.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	26.10.2007	1,5x1,5x1 cm		Lebermetastase
19938	07.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	28.10.2007	1x1x0,5 cm	Aszites: +	Leber +Lunge diffus +abd Lk+th Lk
19939	08.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	28.10.2007	2,5x2x1		alles negativ
19940	08.09.2007		10e6 Zellen	Tumor: +	26.10.2007	1,5x1,5x1 cm	Aszites +	Lunge, 2th Lks + abd Lk
19921	25.01.2008		19909 Primärtumor P4	10e5 Zellen	-----	21.02.2008	2,5x2x1 cm	Aszites +++
19922	25.01.2008	10e5 Zellen		-----	22.02.2008	2,5x2x1 cm	Aszites +	alles negativ
19923	25.01.2008	10e5 Zellen		-----	21.02.2008	3x3x3 cm	Aszites +++	abd Lk; 2 th-Lks; Lunge diffus+
19924	27.01.2008	MiaPaCa βsactin fluc EGFP tva 8 P18	10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/ +	06.04.2008		Maus tot im Käfig	
19925	27.01.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/ +	06.04.2008	2x1x1 cm		alles negativ
19926	27.01.2008		10e5 Zellen	Tumor: -/-/	28.10.2008		kein Tumor gewachsen	
19941	21.02.2008	19917 abd Lk1 P6 (e)	10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/ +	04.05.2008	3x2,5x2 cm		alles negativ
19942	21.02.2008		10e5 Zellen	Tumor: ++/+++/ ++++	20.04.2008	2,2x1,6x1,5cm		abd Lk + th-Lk
19943	22.02.2008		10e5 Zellen	Tumor: ++/+++/ ++++	06.04.2008		Maus tot im Käfig	
19944	22.02.2008		10e5 Zellen	Tumor: -/-/	28.10.2008		kein Tumor gewachsen	
19945	22.02.2008		10e4 Zellen	Tumor: +/-/(+)	28.10.2008		kein Tumor gewachsen	
19946	21.02.2008	19902 th-Lk2 P8	10e5 Zellen	Tumor: -/-	28.10.2008		kein Tumor gewachsen	
19947	21.02.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++	11.04.2008	2x1x1 cm	Aszites (+)	alles negativ
19948	21.02.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++	10.04.2008	3x2x1 cm	Aszites +; großer stark verwachsener Primärtumor; Splenomegalie; vermutl. weitere Lks im Tumorpaket	abd Lk + TruncusLk + 2 th-Lks

19949	21.02.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ +	08.05.2008	3x2,5x2 cm	dicker Bauch durch großen Primärtumor -- > Kachexie	alles negativ
19950	05.03.2008		10e4 Zellen	Tumor: +(+)/+++/>+ +	19.07.2008	2,5x1,5x1 cm	blutiger Aszites: +++, Peritonealtumor hinter li Leberlappen am Diaphragma, positive Leberfoci	th-Lks + Lunge flächig diffus + Leberfoci+
19951	14.03.2008	19908 Leber	10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ +	04.06.2008	3,5x2,5x2 cm	Aszites: ++ ; sehr große abd Lks am Tumorpaket	th- + abd-Lks, Leber, Lunge sehr stark flächig luzi +
19952	14.03.2008		10e5 Zellen	Tumor: ++/+++/>+ + + +	28.04.2008	0,5x0,5x0,5 cm	Maus wegen großem Peritonealtumor getötet	Leber + abd Lks
19953	17.03.2008		10e5 Zellen	Tumor: ++/+++/>+ + + +	04.06.2008	3x2x2 cm	Aszites: ++ ; große abd Lks am Tumorpaket	th- + abd-Lks, Leber, Lunge stark flächig +
19954	17.03.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ + +	14.05.2008	3x2x1,5 cm	Aszites ++, Magenulcus	Leber +
19955	17.03.2008		10e4 Zellen	Tumor: -/-/-	07.10.2008	2x3x2 cm	Aszites +++ ;	abd Lk+Lk Strang + th Lk + Lunge diffus + Leberfocus+
19956	13.03.2008		19909 Leber	10e5 Zellen	Tumor: -/-/-	28.10.2008		kein Tumor gewachsen
19957	13.03.2008	10e5 Zellen		Tumor: ++/++/+(+)	13.06.2008	2x1,5x1 cm	evtl Trichomonadeninfektion - Kachexie	alles negativ
19958	14.03.2008	10e5 Zellen		Tumor: +++/+++/>+ +	07.05.2008	3x2,5x2 cm	dicker Bauch durch großen Primärtumor -- > Kachexie	alles negativ
19959	14.03.2008	10e5 Zellen		Tumor: +++/+++/>+ +	28.04.2008	2,5x2x1,5 cm		alles negativ
19960	13.03.2008	10e4 Zellen		Tumor: -/-/-	28.10.2008		kein Tumor gewachsen	
19961	03.12.2008	19953 Lunge 2 4h P5		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ +	26.01.2009	2,5x2,5x1,5cm	wegen großem Peritonealtumor getötet
19962	03.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ +	13.02.2009	2x2,5x2 cm	Aszites +++ ; vBlut wegen unsicherer Punktion verworfen	Lunge schwach flächig +, Leber +
19963	03.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ +	21.02.2009	3x2x1 cm		alles negativ
19964	03.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/>+ +	26.01.2009	3,5x2x2 cm	Aszites +++ ; verwachsenes Tumorpaket im ganzen Abdomen	abd+th Lks, Lunge flächig+, Tumorinfiltrate der Leber
19965	03.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: -/-/-	05.05.2009		kein Tumor angewachsen; ohne Histo	



19966	27.12.2008	19951 vBlut P4	10e5 Zellen	Tumor: +/+++/+++	25.03.2009	3,5x2x2 cm	Aszites: +++	Lunge diffus, Lebermetastasen, th-Lks
19967	27.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/+ +	21.02.2009	3x2x1 cm	eingeblytetes Abdomen	alles negativ
19968	27.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/+ +	21.03.2009	4x2,5x1,5 cm	blutiger Aszites: ++ ; Milztumor	Lunge und Leber diffus flächig +
19969	27.12.2008		10e5 Zellen	Tumor: +++/+++/+ +	28.03.2009	2x2x1,5 cm	bis auf großen Tumor fitte Maus	Primärtumor + 2xLunge + Leber + th-Lk +
19970	27.12.2008		10e5 Zellen				kein Tumor gewachsen	

## 10.2 Zelllinien für Genexpressionsanalyse

### 10.2.1 MiaPaCa-2

Dateiname	Maus ID	Name.Zelllinie	Passage Zelllinie	Maus Passagen zahl	Zell typ	Zell herkunft	Metas total	Metas Lunge	Metas Leber	Metas Lymph knoten	Aszites	Überleben in Tagen
19902_PPT	19902	19902 Primärtumor	6	1	Primärtumor	Pankreas	nein	nein	nein	nein	nein	57
19902_th_LK	19902	19902 th-Lk 2	6	1	Metastase	Thorakal Lymph knoten	JA	JA	JA	JA	nein	57
19908_Leber	19908	19908 Leber	6	1	Metastase	Leber	JA	JA	JA	JA	JA	77
19909_Leber	19909	19909 Leber	6	1	Metastase	Leber	nein	nein	nein	nein	JA	82
19917_abd_LK_1e	19917	19917 abd Lk1 e	6	2	Metastase	abdominal Lymph knoten	nein	nein	nein	nein	nein	34
19951_vBlut	19951	19951 vBlut	6	3	zirkulierende Zelle	Blut	JA	JA	JA	JA	JA	82
19953_Lunge	19953	19953 Lunge 2	6	3	Metastase	Lunge	JA	JA	JA	JA	JA	79
19957_PPT	19953	19957 Primärtumor	5	3	Primärtumor	Pankreas	nein	nein	nein	nein	nein	91
19969_PPT	19969	19969 Primärtumor	5	3	Primärtumor	Pankreas	nein	nein	nein	nein	nein	91
19969_vBlut	19969	19969 vBlut	5	3	zirkulierende Zelle	Blut	nein	nein	nein	nein	nein	91
19969_Lunge2	19969	19969 Lunge2	5	3	Metastase	Lunge	nein	nein	nein	nein	nein	91
19963_vBlut	19963	19963 vBlut	5	3	zirkulierende Zelle	Blut	nein	nein	nein	nein	nein	80
19967_vBlut	19967	19967 vBlut	5	3	zirkulierende Zelle	Blut	nein	nein	nein	nein	nein	56

### 10.2.2 BxPc3

Dateiname	Maus ID	Name Zelllinie	Passage. Zelllinie	Maus Passagen zahl	Zell typ	Zell herkunft	Metas total	Metas Lunge	Metas Leber	Metas Lymph knoten	Aszites	Überleben in Tagen
0008Lunge	8	0008Lunge	3	2	Metastase	Lunge	JA	JA	nein	unk	n/a	n/a
23_Primaryus	23	23_Primaryus	3	3	Primärtumor	Pankreas	JA	JA	nein	unk	n/a	94,00
23_Lunge	23	23_Lunge	3	3	Metastase	Lunge	JA	JA	nein	unk	n/a	n/a
4027_Lunge1	4027	4027_Lunge1	3	2	Metastase	Lunge	JA	JA	nein	nein	n/a	60,00
52335_Primaryus	52335	52335_Primaryus	3	1	Primärtumor	Pankreas	JA	JA	nein	unk	n/a	134,00

---

523_Lunge	52335	523_Lunge	3	1	Metastase	Lunge	JA	JA	nein	unk	n/a	n/a
523_Lunge_A	52335	523_Lunge_A	3	1	Metastase	Lunge	JA	JA	nein	unk	n/a	n/a
52620_Lunge1	52620	52620_Lunge1	3	1	Metastase	Lunge	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	60,00
S77_64	53564	64	3	1	Primärtumor	Pankreas	nein	nein	nein	nein	n/a	68,00
BxPC_3	n/a	BxPC_3	3	n/a	n/a	n/a	nein	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

## 11. Danksagung

Allen, die mir im Labor und beim Schreiben dieser Arbeit zur Seite standen, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland M. Schmid bedanke ich mich für die Möglichkeit und die Bereitstellung der nötigen Mittel zur Anfertigung dieser Arbeit in seiner Abteilung. Herrn PD Dr. Dieter Saur gilt mein besonderer Dank für das Angebot dieses Thema in seinem Labor zu bearbeiten, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragende wissenschaftliche Begleitung und der steten Möglichkeit zur kritischen Diskussion. Für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit möchte ich mich bei Dr. Florian Nagl, Monika Werb und dem gesamten Laborteam der Arbeitsgruppen Saur, Schneider und Geisler bedanken. Dies gilt insbesondere für Stefan Eser, der stets für methodische Fragen und fachliche Diskussionen zur Verfügung stand.

Die Auswertung der Microarray Daten war erst möglich mit der Hilfe von Philipp Eser vom Lehrstuhl für genomorientierte Bioinformatik der TUM.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei Dr. Andrea Gratza und Katja Töbelmann.

Abschließend möchte ich vor allem meinen Eltern für die offenen Ohren und die Unterstützung während Studium und Promotion danken. Ohne sie wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.