

Technische Universität München

II. Medizinische Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Prof. Dr. Roland M. Schmid)

Molekulare Analyse der Metastasierung des Pankreaskarzinoms

Maren Susanne Hieber

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dieter Saur

2. Priv.-Doz. Dr. Rickmer Braren

Die Dissertation wurde am 21.10.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2021 angenommen.

Für meine Großmutter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	1
1.1 Das duktales Pankreaskarzinom	1
1.2 Metastasierungsmodelle	2
1.3 Mausmodelle für das duktales Adenokarzinom des Pankreas.....	4
1.4 <i>Transforming Growth Factor Beta</i> (TGFB).....	5
1.5 Die Rolle des TGFB-Signalweges und insbesondere von TGFB1 in der Karzinogenese im Pankreas.....	6
1.6 Kandidatengene	7
1.6.1 GATA5.....	7
1.6.2 OSMR.....	8
1.6.3 IL18.....	9
1.6.4 TGFB3	10
1.6.5 S100A8.....	10
1.6.6 MMP2	10
1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	11
2 Material	12
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	12
2.2 Kommerziell erhältliche Kits	14
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.4 Geräte und Instrumente.....	16
2.5 Lösungen und Puffer	17
2.6 Small hairpin RNA (shRNA).....	18
2.7 PCR-Primer und Oligonukleotide.....	19
3 Methoden	21
3.1 Klonierung	21
3.1.1 Präparative Gelelektrophorese und Gelextraktion.....	21
3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	21
3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA	21
3.1.4 Transformation kompetenter Bakterien	22
3.1.5 Restriktionsendonukleasen	22
3.1.6 Herstellung von glatten Enden bei DNA-Fragmenten (Blunting)	23
3.1.7 Dephosphorylierung	24
3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten.....	24
3.1.9 Klonasereaktion.....	24
3.1.10 Kryokonservierung von Bakterienstämmen	25
3.2 Embryonale Stammzellkultur (ES-Kultur).....	25
3.2.1 Kultur muriner embryonaler Stammzellen	25

3.2.2 Kryokonservierung von embryonalen Stammzellen	25
3.2.3 Vorbereitung des Targeting-Vektors zur Transfektion der embryonalen Stammzellen	26
3.2.4 Transiente Transfektion mittels Elektroporation	26
3.2.5 Selektion und Expansion	27
3.2.6 Nachweis der homologen Rekombination	27
3.2.7 Überprüfung der genetischen Veränderung mittels PCR	28
3.2.8 Mykoplasmentest.....	30
3.2.9 Blastozysteninjektion	31
3.3 Tierexperimente.....	31
3.3.1 Tierhaltung und Mauslinien.....	31
3.3.2 Genotypisierung aus Schwanzspitzenbiopsien	32
3.3.3 Orthotope Implantation	32
3.3.4 Biolumineszenzbildgebung.....	33
3.3.5 Sektion.....	34
3.4 Zellkultur	34
3.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen und –methoden.....	34
3.4.2 Lentivirale Transfektion und Transduktion.....	35
3.4.3 small hairpin RNA-vermittelter Knockdown	36
3.4.4 DNA-Isolation aus Zellen	37
3.4.5 MTT-Assay	37
3.4.6 Scratch-Assay	37
3.4.7 Clonogenic Assay.....	38
3.4.8 Soft-Agar Assay.....	38
3.5 Genexpression	40
3.5.1 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA (RT-PCR).....	40
3.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	40
3.5.3 Standardkurven für qPCR	41
3.6 Statistische Analyse	42
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Klonierung des Targeting Vektors pRosa26-LSL-Tgfb1	43
4.2 Generierung gentechnisch veränderter embryonaler Stammzellen: Knock-In von LSL-Tgfb1 in den Rosa26-Lokus	46
4.3 Etablierung einer PCR zum Nachweis des LSL-Tgfb1-Knockins in der Maus	47
4.4 shRNA-vermittelter Knockdown der Zielgene in Pankreastumorzellen.....	50
4.5 Proliferation der Tumorzellen nach Herunterregulation von <i>Gata5</i>, <i>Il18</i>, <i>Osmr</i> und <i>Tgfb3</i>	53
4.6 Migrationsverhalten der Tumorzellen nach Herunterregulation von <i>Gata5</i>, <i>Il18</i>, <i>Osmr</i> und <i>Tgfb3</i>	55
4.7 Koloniebildungsfähigkeit der Tumorzellen nach Herunterregulation von <i>Gata5</i>, <i>Il18</i>, <i>Osmr</i> und <i>Tgfb3</i>	57
4.8 Verankerungs- und substratunabhängiges Wachstum der Tumorzellen nach Herunterregulation von <i>Gata5</i>, <i>Il18</i>, <i>Osmr</i> und <i>Tgfb3</i>.....	58

4.9 In-vivo Analyse des Tumorwachstums und der Metastasierung nach Herunterregulation von <i>Gata5</i>, <i>IL18</i>, <i>Osmr</i> und <i>Tgfbr3</i>	60
4.9.1 Überleben nach orthotoper Implantation von Tumorzellen mit Herunterregulation von <i>Gata5</i> , <i>IL18</i> , <i>Osmr</i> und <i>Tgfbr3</i>	60
4.9.2 Metastasierungsstärke nach orthotoper Implantation von Tumorzellen mit Herunterregulation von <i>Gata5</i> , <i>IL18</i> , <i>Osmr</i> und <i>Tgfbr3</i>	62
4.9.3 Biolumineszenzbildgebung nach orthotoper Implantation von Tumorzellen mit Herunterregulation von <i>Gata5</i> , <i>IL18</i> , <i>Osmr</i> und <i>Tgfbr3</i>	62
5 Diskussion	66
6 Zusammenfassung	73
7 Literaturverzeichnis	75
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	84
8.1 Abbildungsverzeichnis	84
8.2 Tabellenverzeichnis	84
Danksagung.....	86

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ADM	azinär-duktales Metaplasie
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BLI	Biolumineszenzmessung/-bildung
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BRCA2	Gen für Breast Cancer 2, early-onset
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
CCD	charge coupled device
CDKN2A	Gen für cyclin dependent kinase inhibitor 2A, = p16INK4a
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTC	zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPC4	Gen deleted in pancreatic cancer-4, = SMAD4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ES	Embryonale Stammzellen
et al.	und andere (et alii)
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
fLuc	firefly Luciferase
fmol	Femtomol
G	Gain
H	Stunde (hour)
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNF-1alpha	hepatocyte nuclear factor 1 alpha
i.d.R.	in der Regel
IL18	Interleukin 18
KCM	Kalium-/ Calcium-/ Magnesiumchlorid
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KLF5	Krueppel-like factor 5
Kras	V-Ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene
LB	lysogeny broth
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor
LoxP	locus of crossing over in P1

LSL	LoxP-Stop-LoxP
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MEK1	mitogen-activated protein kinase kinase 1, = MAP2K1
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMF	Medetomidin/Midazolam/Fentanyl
MMP2	Matrixmetalloproteinase 2
mRNA	messenger RNA
mTor	mechanistic target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
OP	Operation
ORF	open reading frame
OSMR	Onkostatin M Rezeptor
P48	Pankreastranskriptionsfaktor 1a- Untereinheit 48
PanIN	pankreatische intrapitheliale Neoplasie
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDAC	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDX1	pancreatic and duodenal homeobox 1
PPT	Pankreatischer Primärtumor
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
shRNA	small hairpin Ribonukleinsäure
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB-Medium mit Glukose
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFB	transforming growth factor beta
TP53	Gen für Tumorsuppressor p53
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZEB	zinc finger E-box binding homeobox

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt unter den Neoplasien des Pankreas mit mehr als 85 % die häufigste und bösartigste Entität dar (Hezel et al. 2006).

Obwohl das duktales Pankreaskarzinom bei Männern bezüglich der Inzidenz nicht unter den häufigsten zehn Krebsarten zu finden ist, zeichnet es sich als die vierthäufigste Krebs-assoziierte Todesursache in den USA aus. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 6 % ist das duktales Pankreaskarzinom dort eine der Krebserkrankungen mit der höchsten Letalität. Selbst nach einer signifikanten Steigerung von den Jahren 1975-1977 bis heute ist die 5-Jahres-Überlebensrate weiterhin auf einem äußerst niedrigen Niveau (Siegel et al. 2014).

In Deutschland zeigt das Pankreaskarzinom eine steigende Inzidenz mit 16.080 Neuerkrankungen im Jahr 2010 und einer prognostizierten Zahl von Neuerkrankungen von 17.400 für 2014, sowie eine vergleichbar niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von 7% (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2013).

Diese schlechte Prognose ist unter anderem bedingt durch eine späte Diagnosestellung im bereits fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, so dass eine kurative Behandlung durch operative Resektion nur in etwa 15 % der Fälle möglich ist (Siegel et al. 2014; Vincent et al. 2011). Obwohl die mittlere Überlebensdauer bei metastasiertem Pankreaskarzinom durch die Kombinationschemotherapie FOLFIRINOX (Oxaliplatin, Irinotecan, Fluouracil, Leucovorin) im Vergleich zur Therapie mit Gemcitabin allein von 6,8 auf 11,1 Monate verbessert werden konnte (Conroy et al. 2011), ist die Prognose bei Pankreaskarzinom weiterhin schlecht, so dass neben einer verbesserten und vor allem früheren Diagnosestellung, neue Therapiekonzepte und ein tieferes Verständnis der Krankheitsprozesse, insbesondere der Metastasierung, nötig sind.

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas entwickelt sich aus den duktales Pankreaszellen über nichtinvasive Vorläuferläsionen, den sogenannten pankreatischen intrapithelialen Neoplasien (PanINs) und azinär-duktales Metaplasien (ADMs) (Cubilla und Fitzgerald 1976). Parallel zu den auf histologischer Ebene zunehmenden Veränderungen kommt es auf genetischer Ebene zu einer typischen

sequentiellen Anhäufung von Mutationen und Deletionen. Dabei stellen onkogene *KRAS*-Mutationen die sequentiell ersten und im finalen Adenokarzinom die quantitativ häufigsten Mutationen dar, die in bis zu 100 % nachweisbar sind (Rozenblum et al. 1997). In der weiteren Folge kommt es zur Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *TP53*, *BRCA2* und *DPC4* (*SMAD4*) (Hidalgo 2010).

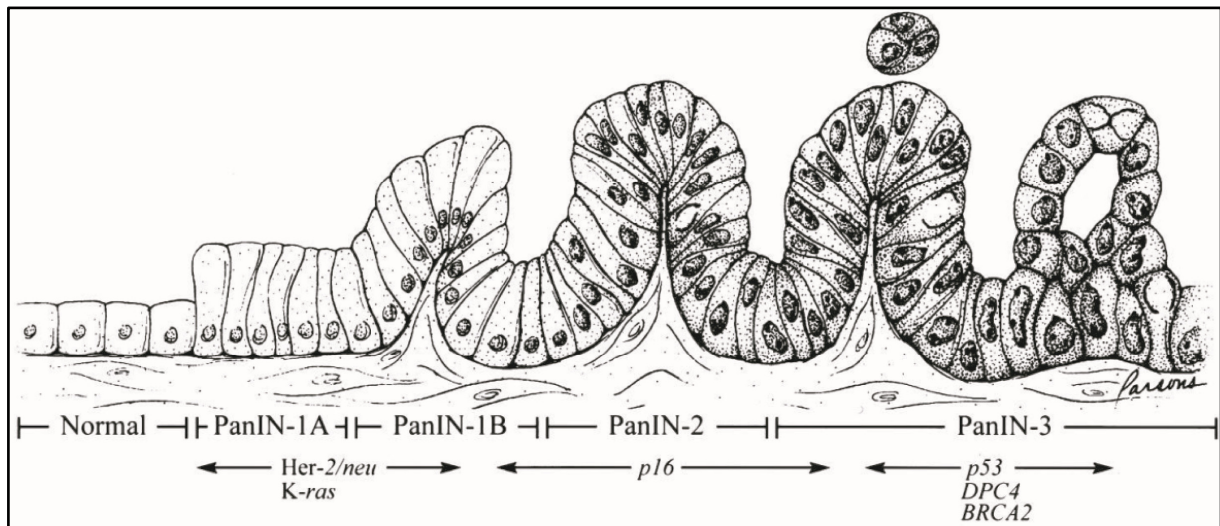


Abbildung 1: Histologisch-genetisches Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms im Pankreas (aus Hruban et al. 2000)

Auf histologischer Ebene (oben) entwickelt sich aus dem normalen duktales Epithel (links) über nichtinvasive Vorläuferläsionen (PanINs) letztlich das invasiv wachsende Pankreaskarzinom. Auf genetischer Ebene (unten) kommt es zu einer sequentiellen Anhäufung von Mutationen (Hruban et al. 2000)

1.2 Metastasierungsmodelle

Metastasierung als der eigentlich tödliche Prozess vieler Tumorerkrankungen lässt sich aufgliedern in verschiedene Schritte. Während diese einzelnen Metastasierungsschritte mittlerweile gut bekannt sind, bestehen bezüglich der Regulatoren (und damit möglichen therapeutischen Angriffspunkten) der einzelnen Schritte weiterhin große Wissens- und Verständnislücken, insbesondere da zahlreiche Studien gezeigt haben, dass neben verschiedenen Metastasierungsmodellen auch verschiedene Regulationsmechanismen bei unterschiedlichen Tumorentitäten vorliegen.

Metastasierung besteht als Gesamtprozess aus einer Abfolge einzelner Schritte. Folgend auf die Invasion in umgebendes Gewebe und Intravasation einzelner Tumorzellen, gelangen die Zellen, entweder als Einzelzellen oder in einem Zellverband, über den Blutstrom als sogenannte zirkulierende Tumorzellen (*circulating*

tumor cells, CTC) in andere Organe, die damit zu möglichen Metastasierungsorten werden. Hier erfolgen die Extravasation und Invasion in das jeweilige Gewebe, mit anschließender Proliferation.

Auf genetischer Ebene werden grundsätzlich zwei vorherrschende Metastasierungsmodelle unterschieden. Das parallele Modell postuliert einen frühen Beginn des Metastasierungsprozesses und beschreibt damit eine frühe Absiedelung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor, was sich auf genetischer und epigenetischer Ebene widerspiegelt in einer voneinander unabhängigen Entwicklung mit resultierenden unterschiedlichen Mutationen und stark divergierenden Genexpressionsprofilen zwischen Primärtumor und Metastase. Im Gegensatz dazu

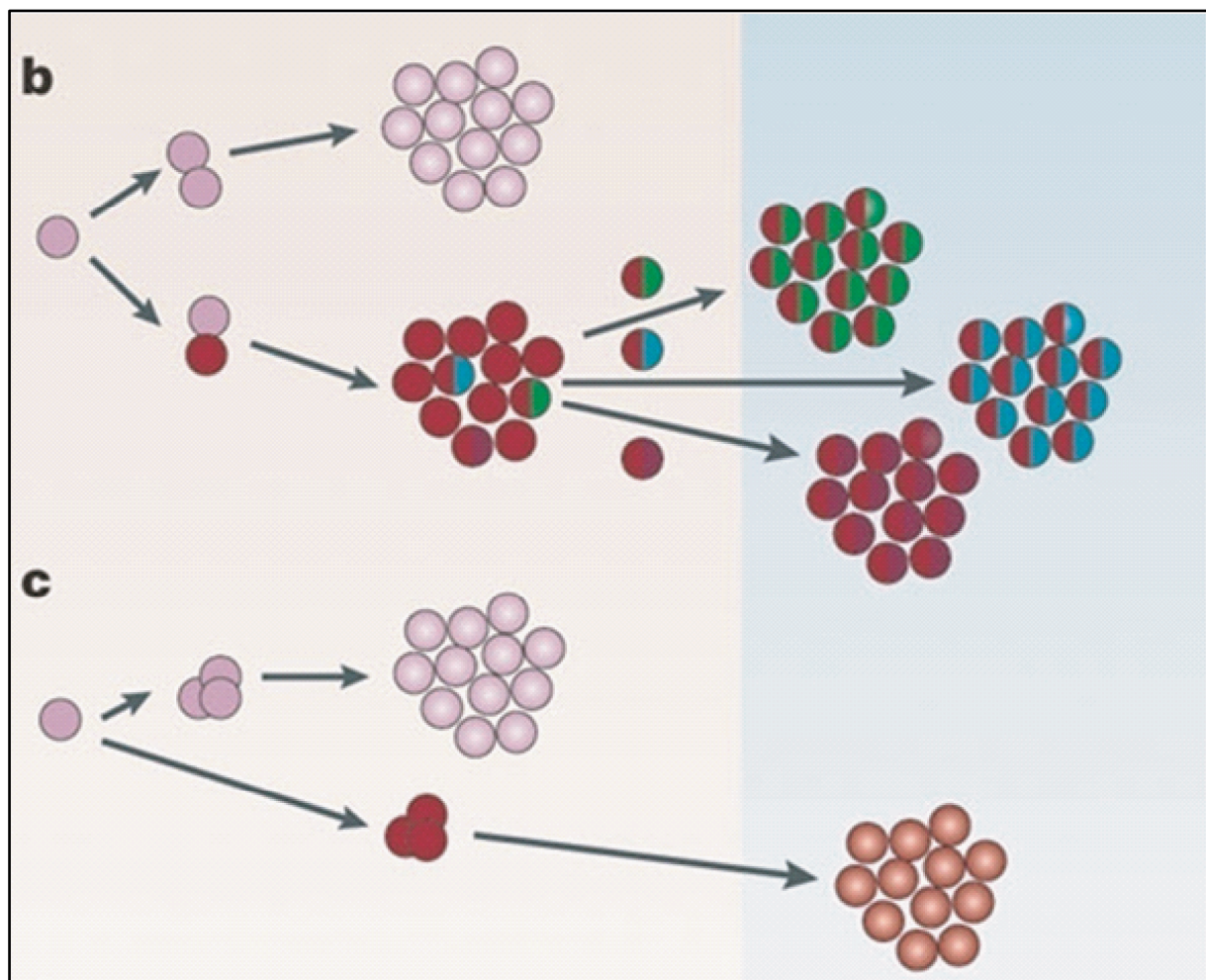


Abbildung 2: Modelle der Metastasierung (aus Weigelt et al. 2005)

Es werden grundsätzlich zwei Metastasierungsmodelle unterschieden: Das lineare Metastasierungsmodell (b) postuliert einen späten, im Verlauf der Onkogenese stattfindenden Erwerb der Metastasierungsfähigkeit bei nur einzelnen Tumorzellen (rot), andere Tumorzellen erreichen nicht die Fähigkeit zu metastasieren (rosa). Unterschiedliche Mutationen ermöglichen dabei eine gewebsspezifische Metastasierung (grün/blau/lila). Dagegen postuliert das parallele Metastasierungsmodell (c), dass Metastasierung früh in der Onkogenese stattfindet, und Primärtumor und Metastasen im weiteren Verlauf der Onkogenese unabhängig voneinander proliferieren, was sich in stark divergierenden Genexpressionsprofilen widerspiegelt (Weigelt et al. 2005).

geschieht der Metastasierungsprozess gemäß dem linearen Modell in einem späten Stadium der Tumorerkrankung als letztlich Kontinuum der lokalen Tumorprogression. Auf genetischer Ebene lässt sich dieses Modell anhand zeitlich hintereinander geschalteter Mutationen und anderer genetischer Veränderungen erklären, von denen letztlich wenige einigen Tumorzellen im späten Verlauf die Fähigkeit zur Metastasierung verleihen.

Sowohl Daten von Yachida et al. als auch frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Prof. Saur konnten zeigen, dass – während für Brustkrebs sehr wahrscheinlich das parallele Progressionsmodell zutrifft (Weigelt et al. 2003) – beim Pankreaskarzinom das lineare Modell den Prozess der Metastasierung am ehesten widerspiegelt (Yachida et al. 2010).

1.3 Mausmodelle für das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Genetisch modifizierte Mäuse werden in der Forschung als Modellorganismen für zahlreiche humane Krankheiten genutzt, um damit das komplexe Zusammenspiel der spezifischen genetischen Modifikation und der physiologisch ablaufenden Vorgänge im Modellorganismus zu erfassen. Im Gegensatz zu anderen Modellorganismen, wie *Drosophila melanogaster*, bietet die Maus (*Mus musculus*) den Vorteil, als Säugetier hinsichtlich Organanatomie und physiologischen Abläufen große Ähnlichkeiten zum menschlichen Organismus aufzuweisen (van Deursen und Hofker 2003). Auch auf genetischer Ebene besteht mit einer Homologie von über 90 % eine hohe Ähnlichkeit (Chinwalla et al. 2002).

Die genetische Modifikation wird dabei über verschiedene Methoden erreicht. Während bei transgenen Mausmodellen der Einbau der fremden bzw. modifizierten DNA ungerichtet, also an zufälliger Stelle innerhalb des Mausgenoms geschieht, erfolgt durch homologe Rekombination eine gerichtete, das heißt an vordefinierter Stelle stattfindende Integration (Thomas und Capecchi 1987).

Als großer Fortschritt bei der Entwicklung von genetisch modifizierten Mausmodellen für das duktales Pankreaskarzinom etablierten Hingorani et al. das endogene *Kras*^{G12D}-Expressionsmodell. Hierbei wurde ein endogenes *Kras*-Allel durch onkogenes *Kras*^{G12D} ersetzt, dem eine LoxP-Stop-LoxP-Sequenz (LSL-Sequenz) vorgeschaltet war. Über die Nutzung des konditionalen Rekombinationssystem Cre-LoxP gelang durch Kombination mit der – durch Vorschaltung eines pankreasspezifischen Promotors, wie PDX1 oder P48 – pankreasspezifisch exprimierten Cre-Rekombinase so eine pankreasspezifische Expression des onkogenen *Kras*^{G12D}. Derart genetisch

modifizierte Mäuse entwickelten – analog zur humanen Tumorprogression – über murine PanINs als Vorläuferläsionen zum Teil und erst im langfristigen Verlauf letztlich invasive und metastasierende duktale Adenokarzinome (Hingorani et al. 2003; Ijichi 2011). Mittels Kombination der endogenen Kras^{G12D}-Mutation mit der Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene, analog zur Anhäufung sequentieller Mutationen und anderer genetischer Veränderungen beim humanen Pankreaskarzinom, wurde eine Beschleunigung der Tumorigenese (Ijichi 2011) und damit höhere Rate an invasiven und metastasierenden Tumoren erreicht. Inaktivierte Tumorsuppressorgene hierbei waren zum Beispiel p16^{INK4a} (über Knock-out) (Aguirre et al. 2003) oder TP53 (über Mutation oder Knock-out) (Bardeesy et al. 2006; Hingorani et al. 2005).

Neben genetisch modifizierten Mausmodellen lässt sich die Maus auch als Empfängerorganismus von Xeno- bzw. Allografts nutzen. Für die Untersuchung von Pankreastumoren werden dabei Pankreastumorzellen subkutan oder orthotop implantiert.

1.4 Transforming Growth Factor Beta (TGFB)

TGFB, mit seinen drei Isoformen TGFB1, -2 und -3, ist das namensgebende regulatorische Zytokin für die TGFB-Superfamilie, zu der neben TGFB die BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) sowie die Activine gehören. Dabei agiert TGFB als interzellulär wirkendes Zytokin, das über die Bindung an spezifische membranständige Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (TGFB-Rezeptor Typ I und II (TGFB1 bzw. TGFB2)) das Signal nach intrazellulär weiterleitet, und zwar hauptsächlich über den SMAD-Signalweg. Hierbei erfolgt die Phosphorylierung von bestimmten SMAD-Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Rezeptorsubstrat-SMADs. Diese RSMADs bilden einen Komplex mit SMAD4; dieser RSMAD-SMAD4-Komplex wandert in den Zellkern und assoziiert dort wiederum mit weiteren DNA-bindenden Kofaktoren. In Abhängigkeit des spezifischen Gesamtkomplexes werden unterschiedliche Zielgene aktiviert, was differenzierte Antworten auf die ursprünglich durch TGFB-Liganden in Gang gesetzte Signaltransduktion ermöglicht. Über diese Signaltransduktion spielen die TGFB-Liganden eine vermittelnde und regulierende Rolle für die Zellhomöostase, -differenzierung, -proliferation, Immunantwort, Angiogenese, Zellmotilität und Apoptose. Der exakte Effekt ist dabei zell- und kontextabhängig (Gatza et al. 2010; Massagué 1998). Der TGFB-Rezeptor Typ III (TGFB3, auch Betaglycan genannt) unterscheidet sich dabei von TGFB1 und -2 durch seine Funktion als Kofaktor und damit nicht Rezeptor im eigentlichen Sinne. Als Kofaktor bindet TGFB3 TGFB1 und

präsentiert dieses an TGFBR2. Durch die Aktivierung verschiedenster Zielgene durch TGFB können in Abhängigkeit des spezifischen Zellkontextes verschiedenste Zellantworten ausgelöst werden (Massagué 2008). In normalen epithelialen Zellen sowie in frühen Tumorstadien hat TGFB einen antiproliferativen Effekt (v.a. durch Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest), diese antiproliferative bzw. tumorsuppressive Wirkung verliert sich im Verlauf der Tumorigenese und wandelt sich um in protumorigene Effekte (Invasivität, Motilität, epithelial-mesenchymale Transition, Überleben, Angiogenese, Immunsuppression) (Leivonen und Kähäri 2007).

1.5 Die Rolle des TGFB-Signalweges und insbesondere von TGFB1 in der Karzinogenese im Pankreas

Wie bereits im Abschnitt 1.1 erwähnt, finden sich im humanen Pankreaskarzinom häufig Mutationen von *SMAD4* als Downstream-Effektor im TGFB-Signalweg (Hahn et al. 1996). Dies legt vor allem eine Funktion von TGFB als Tumorsuppressor nahe, andererseits gibt es nicht nur bei anderen Karzinomen, sondern auch für das Pankreaskarzinom Daten, die auch protumorigene Effekte von TGFB nachweisen.

Johnson et al. wiesen neben den bekannten häufigen *SMAD4*-Mutationen weitere Alterationen bei Mitgliedern des TGFB-Signalweges in Pankreaskarzinomzelllinien nach, unter anderem eine verstärkte Expression von *TGFBR2*. Zusätzlich zeigten Zellen mit Mutationen von *SMAD4*, *KRAS2*, and *TP53* eine verstärkte Proliferation nach Stimulation durch TGFB1 (Jonson et al. 2001).

Ellenrieder et al. wiesen in zellbasierten Arbeiten (Zugabe von TGFB1 zu Zellen) nach, dass TGFB1 in Pankreaskarzinomzellen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) induziert, ein Vorgang der mit einer verstärkten Zellmigration und -invasion (vermittelt unter anderem durch Aktivierung bzw. verstärkte Expression von *MMP2*) einherging. Durch Vorbehandlung mit einem MEK1-Inhibitor konnten diese Effekte von TGFB1 reduziert bis komplett verhindert werden (Ellenrieder et al. 2001a; Ellenrieder et al. 2001b).

Auch Song et al. konnten eine TGFB1-induzierte Erhöhung der Invasivität von Pankreaskarzinomzellen zeigen, die sie auf eine EMT-Induktion über die Aktivierung von *ZEB1*, *ZEB2*, *Snail1* und *Snail2* durch TGFB1 zurückführten (Song et al. 2015).

Ebenfalls den protumorigenen Effekt von TGFB unterstützte eine Arbeit von Rowland-Goldsmith et al.: Tumorzellen, die einen löslichen TGFB-Rezeptor Typ II exprimierten (der durch „Wegfangen“ von TGFB1 die Zellantwort auf TGFB1 verhinderte), zeigten

ein vermindertes Tumorwachstum und eine reduzierte Metastasierungsfähigkeit (Rowland-Goldsmith et al. 2002).

David et al. konnten zeigen, dass die duale Rolle von *Tgfb1* beim Pankreaskarzinom (tumorsuppressiv vs. protumorigen) vom *Smad4*-Status des Tumors abhängig ist: In *Smad4*-negativen Zellen erfolgte keine Transkriptionsaktivierung von *Snail*, aber die Aktivierung von *Sox4*. *Sox4* bewirkte zusammen mit *Klf5* einen protumorigenen Effekt. In *Smad4*-positiven Zellen dagegen erfolgte – neben der ebenfalls ablaufenden Aktivierung von *Sox4* – auch die Aktivierung von *Snail*. Dieses bildete mit *Smad2/3-Smad4* einen Komplex, der einerseits zu einer Inaktivierung von *Klf5* führte und eine epithelial-mesenchymale Transition induzierte. Gegensätzlich zu seinem protumorigenen Effekt auf epitheliale Zellen hatte *Sox4* nach erfolgter EMT einen pro-apoptotischen Effekt, ein Mechanismus der damit als „tödliche EMT“ bezeichnet wurde (David et al. 2016). Durch den Verlust von *Smad4* konnte dieser Mechanismus aufgehoben werden.

In einer klinischen Arbeit war bei Patienten mit Pankreaskarzinom im frühen Stadium eine Überexpression von *TGFB1* mit einem längeren Überleben assoziiert (Glazer et al. 2017). Diese Ergebnisse widersprechen einer frühen Arbeit von Friess et al., die anhand von humanen PDAC-Proben eine Assoziation zwischen dem Nachweis von *TGFB2* und einem fortgeschrittenem Tumorstadium beschrieben. Kongruent dazu war das Fehlen aller drei *TGFB*-Isoformen mit einem längeren Überleben assoziiert (Friess et al. 1993).

1.6 Kandidatengene

Basierend auf vorangegangenen Arbeiten bzw. früheren Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Saur wurden sechs Kandidatengene der Metastasierung ausgewählt, die in einer Mikroarray-Analyse eine signifikant unterschiedliche Expression in metastasierten und nicht-metastasierten Primärtumoren bzw. im Primärtumor und in den Metastasen endogener Mausmodelle gezeigt hatten:

Gata5, Osmr, Il18, Tgfbr3, S100a8, Mmp2.

1.6.1 GATA5

Das Gen *GATA5* kodiert für den Transkriptionsfaktor GATA5, der zwei GATA-typische Zinkfinger enthält und an HNF-1alpha (*hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) bindet. Frühere Arbeiten hatten vor allem die Rolle von GATA5 in der embryonalen Herzentwicklung gezeigt. Damit gehört GATA5, folgt man einer der ersten, auf der

vorrangigen Expression basierende Einteilungen der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren, zu den endodermalen GATA-Faktoren (GATA4, 5, -6), denen die hämatopoietischen GATA-Faktoren (GATA1, -2, -3) gegenüberstehen. Generelle Funktion der GATA-Faktoren ist eine Förderung der Zelldifferenzierung. Damit ist der Effekt des mangelnden Reifungsvermögens durch eine Funktionsstörung bzw. reduzierte Expression, und damit letztlich eine Funktion als Tumorsuppressor, naheliegend (Zheng und Blobel 2010). Allerdings scheint dies keine eindeutige Funktion zu sein, da zum Beispiel auch eine Überexpression von *GATA6* im Pankreaskarzinom (Fu et al. 2008) sowie im Kolonkarzinom (Shureiqi et al. 2007) beschrieben wurde. Spezifisch für *GATA5* überwiegen bislang die Daten, die eine Funktion als Tumorsuppressor nahelegen. So konnten Akiyama et al. zeigen, dass beim kolorektalen und Magenkarzinom häufig eine Promotor-Hypermethylierung vorliegt, die zu einem Stilllegen der Transkription der Zielgene führte. Im Gegenzug wurde durch eine pharmakologisch oder genetisch induzierte Demethylierung eine Expression der Zielgene erreicht. Die Expression von exogenem *GATA5* konnte diese Stilllegung ebenfalls überwinden und führte zu einer Reaktivierung der Zielgene (Akiyama et al. 2003). Ähnliches fand sich auch für das Nierenzellkarzinom. Hier zeigte sich zum einen eine Hypermethylierung der *GATA5*-CpG-Insel; zum anderen war eine verstärkte Methylierung statistisch assoziiert mit Metastasierung, fortgeschrittenem Erkrankungsstatus, und Verkürzung der progressionsfreien Überlebenszeit (Peters et al. 2012). In vitro führte die Überexpression von *GATA5* bei Zellen des kolorektalen Karzinoms zu einer Suppression von Koloniebildung, Proliferation, Migration, Invasion und verankerungsunabhängigem Wachstum (Hellebrekers et al. 2009).

1.6.2 OSMR

Das Gen *OSMR* codiert für den *Oncostatin M Receptor* (OSMR), ein Transmembran-Rezeptor, der zur Familie der Typ-I-Zytokin-Rezeptoren gehört. Trotz seiner Namensgebung stellt OMSR dabei im Grunde nur eine Untereinheit des Rezeptors dar. So bindet der Ligand OSM primär an die andere Untereinheit des Rezeptors (gp130), woraufhin OSMR als zweite Untereinheit rekrutiert wird und es zur Heterodimerisierung kommt. Dieses Heterodimer wird als OSM Typ II Rezeptor bezeichnet, dem der Typ I Rezeptor, bestehend aus gp130 und LIFR (*leukemia inhibitory factor receptor*), gegenübergestellt wird (Mosley et al. 1996; Hermanns 2015). Die Bindung von OSM an seine Rezeptoren bewirkt dabei letztendlich eine Hemmung der Zellproliferation sowie in Tumoren eine Induktion der Zelldifferenzierung

und Apoptose. Eine erhöhte Methylierungsrate von *OSMR*, die zur verminderten Expression von *OSMR* führte, und damit wiederum zu einer Resistenz gegen die proliferationsinhibierenden Effekte von OSM, wurde sowohl im kolorektalen Karzinom (Kim et al. 2009), als auch im Magen- und Pankreaskarzinom nachgewiesen (Deng et al. 2009).

Im Gegensatz dazu wiesen beispielsweise Savarese et al. eine Ko-Expression des Rezeptorliganden OSM sowie seiner Rezeptortypen (Typ I und II) in humanen Ovarialkarzinomen nach, eine Konstellation, die von den Autoren als möglicher autokriner Signalweg, im Sinne einer Selbsterhaltung der Tumorzellen, gewertet wurde (Savarese et al. 2002). Beim Zervixkarzinom wurde eine Überexpression von *OSMR* (durch Zunahme der Genkopienzahl) nachgewiesen, die mit einem ungünstigen klinischen *Outcome* assoziiert war (Ng et al. 2007). Die Einschätzung von OSM, wirkend über seinen Rezeptor OSMR, als potentiell Onkogen wurde außerdem unterstützt durch die OSM-induzierte Verstärkung Tumorzell-spezifischer Eigenschaften, wie zum Beispiel Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps (Junk et al. 2017; Smigiel et al. 2017).

1.6.3 IL18

Das Gen *IL18* codiert für das proinflammatorische Zytokin Interleukin 18 (IL18), das zur Superfamilie der IL1-Zytokine gehört. IL18 spielt über die Induktion der Interferon- γ -Produktion in T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen eine wichtige Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunantwort (Dinarello 1999). In der Karzinogenese scheint IL18 eine duale Rolle zu spielen. So sind einerseits tumorprotektive bzw. -suppressive Effekte von IL18 (z.B. (Coughlin et al. 1998; Lian et al. 2007; Zaki et al. 2010), andererseits auch gegenteilige protumorigene Effekte (z.B. Kim et al. 2006a; Kim et al. 2006b; Vidal-Vanaclocha et al. 2000) beschrieben. Auch spezifisch beim Pankreaskarzinom sind gegensätzliche Effekte von IL18 beschrieben. So waren höhere Serum- bzw. Plasmalevel von IL18 mit einem längeren Überleben assoziiert, höhere IL18-Level im Tumorgewebe selbst jedoch mit kürzerem Überleben sowie vermehrter Invasion und Metastasierung (Carbone et al. 2009; Guo et al. 2016). Eine gegenteilige Assoziation, nämlich von niedrigeren IL18-Serumlevels mit längerem Überleben wurde von Bellone et al. beschrieben (Bellone et al. 2006).

1.6.4 TGFBR3

Das Gen *TGFBR3* codiert für den TGF-beta-Rezeptor Typ III (TGFBR3), ein Co-Rezeptor innerhalb des TGFβ-Signalwegs, auch Betaglycan genannt. Allgemeine Funktionen innerhalb des TGF-beta-Signalwegs von TGFBR3 werden im Abschnitt 1.4 erläutert. Bezüglich der Karzinogenese zeigt eine wachsende Anzahl von Arbeiten eine supprimierende Rolle für Tumorprogression und Metastasierung. Beim Mammakarzinom fand sich eine reduzierte Expression von *TGFBR3*, unter anderem durch Verlust der Heterozygotie (Dong et al. 2007), ebenso wie beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Finger et al. 2008). Auch beim Pankreaskarzinom fand sich eine reduzierte *TGFBR3*-Expression, wobei sich mit zunehmendem Tumorgrad ein zunehmender Verlust von TGFBR3 zeigte. Insbesondere während der epithelial-mesenchymalen Transition, ein wichtiger Vorgang zur Förderung der Zellmotilität und -invasivität sowohl im Rahmen der Embryonalentwicklung als auch der Tumorigenese, fand sich hier ein Verlust von TGFBR3 (Gordon et al. 2008).

1.6.5 S100A8

Das Gen *S100A8* codiert für das Kalzium-bindende Protein S100A8, auch Calgranulin A genannt. Zusammen mit S100A9 bildet es das Heterodimer Calprotectin.

Ursprünglich als immunmodulierendes, von Neutrophilen exprimiertes und sezerniertes Protein beschrieben, zeigt eine zunehmende Menge jüngerer Arbeiten eine Rolle von S100A8 bzw. des Heterodimers S100A8/A9 in der Karzinogenese. So fand sich eine Hochregulation bzw. Überexpression in zahlreichen Tumorentitäten (Cross et al. 2005), unter anderem im Magenkarzinom (El-Rifai et al. 2002), Mammakarzinom (Seth et al. 2003) und Pankreaskarzinom (Shen et al. 2004). Auf mechanistischer Ebene zeigte eine Arbeit von Ichikawa et al., dass S100A8/A9 über die rezeptorvermittelte Aktivierung von Signalwegen Tumorwachstum und Metastasierung fördert (Ichikawa et al. 2011). Effekte von unter anderem S100A8 im Pankreaskarzinom waren die Inhibition von NF-κB und Stimulation von mTor (Basso et al. 2014).

1.6.6 MMP2

Das Gen *MMP2* codiert für die Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2), auch bekannt als Kollagenase Typ IV oder Gelatinase A. MMP2 gehört damit zu den Matrix-Metalloproteinasen, einer Familie zinkabhängiger Enzyme, die Komponenten der

Extrazellulären Matrix zerlegen können. Mit dieser Funktion scheint die Assoziation früher Arbeiten zwischen einer *MMP*-Überexpression und Tumorinvasion und -progression z.B. beim Kolonkarzinom (Levy et al. 1991), Mammakarzinom (Monteagudo et al. 1990) und auch Pankreaskarzinom (Ellenrieder et al. 2000), naheliegend (Shuman Moss et al. 2012). Neuere Arbeiten zeigten auch eine Rolle der *MMPs* in der Tumorangio-genese, andererseits aber auch gegenteilige Effekte, die auf der Wirkung von Spaltprodukten der *MMPs* als Angiogenese-Inhibitoren beruhen (Shuman Moss, al. 2012). Für das Pankreaskarzinom konnten Gordon et al. zeigen, dass die Hochregulation von *MMP2* (und Induktion von *SMAD1*) durch *BMPs* (*bone morphogenetic proteins*) eine erhöhte Invasivität bedingt (Gordon et al. 2009). Hinsichtlich einer möglichen prognostischen Bedeutung fand sich eine Korrelation zwischen epithelialer *MMP2*-Expression und dem Tumorstadium bzw. -grad (Juuti et al. 2006).

1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Metastasierung beim dukta-len Pankreaskarzinom mittels funktioneller Genanalysen zu untersuchen. Hierzu wurde zum einen ein neues genetisch definiertes Mausmodell zur Untersuchung der Rolle von *TGFB1* als Kandidatengen der Metastasierung im Pankreaskarzinom generiert, das eine ort- und zeitspezifische Überexpression von *TGFB1* ermöglicht. Zum anderen wurde die funktionelle Rolle von weiteren Kandidatengen der Metastasierung im Pankreaskarzinom (*GATA5*, *OSMR*, *IL18*, *TGFBR3*, *S100A8* und *MMP2*) mittels zellbasierter Assays und eines Allograftmodels in vitro und in vivo untersucht.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA Extension Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
2-Log DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
5-Azacytidine	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ammonium persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) Standard	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
D-Luciferin	Synchem, Kassel, Deutschland
EDTA (Etylendiamintetraessigsäure)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gel Loading Dye, blue (6x)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

GelStar Nukleinsäure Farbstoff	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
Isofluran Forene	Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LR Clonase® II Plus enzyme	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim, Deutschland
Oligofectamin™	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OrangeG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland

Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superfect	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TaqMan® RT-Reagenzien	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
TE-Puffer, pH 8,0	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TEMED	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 2: kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Plasmid Mini/Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
8er-Softstrips (0,2ml) (PCR-Tube)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Biopur Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Chirurgische Einmalskalpelle	Feather Safety Razor Co., Ltd, Osaka, Japan
Gefriergefäße (Cryo Tubes)	Nunc Brand Products, Naperville, IL, USA
Gene Pulser/Micro Pulser Elektroporationsküvette (0,2 cm gap)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Micro Amp™ optical 96-Well Reaction-Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistant, Sondheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Plattierungsspatel	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-lock Reaktionsgefäße Biopur	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterile Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Zellkulturverbrauchsmaterialien (Flaschen, Schalen, Loch-Platten, Röhrchen, Zellschaber)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA, TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen, Schweiz, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.4 Geräte und Instrumente

Tabelle 4: Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoreseapparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav 2540EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
AxioCam	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Bakterienschüttler Certomat	Thermoshake
Biolumineszenzkamera OrcaII ER	Hamamatsu, Herrsching, Deutschland
CO2 Incubator HERAcell®	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland
Einfrierbox Nalgene®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Eppendorf 5432 Mixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizblöcke	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Heraeus HERAsafe mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland
Inkubator (Thermoshake)	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Microliterspritze	Hamilton
Microzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop DM LB	Leica, Solms, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
Multipette® stream	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland

Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH&CoKG, Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage Kern FTB	Gottlieb Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommerns, Deutschland
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
StepOnePlus™ real time PCR system	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
Thermocycler TPersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Vortex VF2	IKA-Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH, Osterode, Deutschland

2.5 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1 % Agaroselösung	100ml 1x TAE, 1 g Agarose
5x KCM-Puffer	500 mM KCl, 150 mM CaCl ₂ , 250 mM MgCl ₂
ES-Zell Lysepuffer (DNA-Lysepuffer)	100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,8 mM HCl, 2% SDS, 200 mM NaCl, 0,1 mg/ml Proteinase K
Gelatinelösung	500 ml aqua dest., 0,5 g Gelatine
Ladepuffer Orange G (6x)	60 % (v/v) Glycerin, 60 mM EDTA, 0,24 % (w/v) Orange G, 0,12 % (w/v) SDS
Laemmli-Probenpuffer (5fach)	0,35M SDS, 50 % (v/v) Glycerin, 0,3M TRIS/HCl, 0,7mM Bromphenolblau Na-Salz, 5 % (w/v) Mercaptoethanol, pH 6,8
PBS (10fach)	1,4M NaCl, 27mM KCl, 40mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
TAE-Puffer (50x), pH 8,5	2 M Tris, 100 mM EDTA, 5,71% (v/v) Essigsäure (100 %), Glycerol

2.6 Small hairpin RNA (shRNA)

Tabelle 6: shRNA-Sequenzen

Zielgen	shRNA-Nr.	shRNA-Sequenz
Gata5	1	CCGGGCCCTATTTGTTAGCATCTTTCTCGAGAAAGATGCTAACAAATA GGGCTTTTTG
	2	CCGGCACAAACAGTTGCCGCTGATTCTCGAGAATCAGCGGCAACTGT TTGTGTTTTG
	3	CCGGGCATACATGAGTTCCGACGTAAGTCTCGAGTACGTCGGAACATG TATGCTTTTTG
	4	CCGGGAGTTCAAGTTCGAACCTGAACTCGAGTTCAGGTTCGAACTTGA ACTCTTTTTG
	5	CCGGACCGGACACTATCTATGCAATCTCGAGATTGCATAGATAGTGTC CGGTTTTTTG
Il18	1	CCGGCCGCAGTAATACGGAATATAACTCGAGTTATATTCCGTATTACT GCCGTTTTTG
	2	CCGGCCTCTCCTGTAAGAACAAGATCTCGAGATCTTGTTCTTACAGGA GAGGTTTTTG
	3	CCGGCCTCTCTGTGAAGGATAGTAACTCGAGTACTATCCTTCACAGA GAGGTTTTTG
	4	CCGGGCTTTCAAACCTCATTCTGAAACTCGAGTTTCAGAATGAGTTTGA AAGCTTTTTG
	5	CCGGCGTCAACTTCAAGGAAATGATCTCGAGATCATTTCTTGAAGTT GACGTTTTTG
Mmp2	1	CCGGGCTGAAAGATACCCTCAAGAACTCGAGTCTTGAGGGTATCTTT CAGCTTTTTG
	2	CCGGCCGGGATAAGAAATATGGATTCTCGAGAATCCATATTTCTTATC CCGGTTTTTG
	3	CCGGGCTGTGTTCTTCGCAGGGAATCTCGAGATTCCTGCGAAGAAC ACAGCTTTTTG
	4	CCGGGCAATACCTGAATACTTTCTACTCGAGTAGAAAGTATTCAGGTA TTGCTTTTTG
	5	CCGGCGGTGGTCATAGCTACTTCTTCTCGAGAAGAAGTAGCTATGACC ACCGTTTTTG
Osmr	1	CCGGCGTCCGTTACAACCTCAGAATCTCGAGATTCTGAAGTTGTAACG GACGTTTTTG
	2	CCGGCCTCTGTAAATACGACATCAACTCGAGTTGATGTCGTATTTACA GAGGTTTTTG
	3	CCGGCCTAAGAATGTTTCTGTGAACTCGAGTTCACAGGAAACATTCT TAGGTTTTTG

	4	CCGGACGACTTTGACTTGGCGTAAACTCGAGTTTACGCCAAGTCAAAG TCGTTTTTTG
	5	CCGGTTGGAAGTGGACGTCTGATATCTCGAGATATCAGACGTCCAGTT CCAATTTTTG
S100a8	1	CCGGTGCAATTAAGTTCGAGGAGTTCTCGAGAAGTCTCGAAGTTAAT TGCATTTTTG
	2	CCGGCACTACTGAGTGTCTCAGTTCTCGAGAAGTGGAGACTCAG TAGTGTTTTTG
	3	CCGGTCCTCAGTTTGTGCAGAATATCTCGAGATATTCTGCACAACTG AGGATTTTTG
	4	CCGGTCAGAGAATTGGACATCAACTCGAGTATTGATGTCCAATTCT CTGATTTTTG
	5	CCGGCAACCTCATTGATGTCTACCACTCGAGTGGTAGACATCAATGAG GTTGTTTTTG
Tgfbr3	1	CCGGCCCTGTAAAGAGAGAGTGAATCTCGAGATTCCTCTCTTTAC AGGGTTTTTG
	2	CCGGGCAGAGAATGAGCATGTATATCTCGAGATATACATGCTCATTCT CTGCTTTTTG
	3	CCGGGTGGTTTACTATAACTCTATTCTCGAGAATAGAGTTATAGTAAAC CACTTTTTG
	4	CCGGGCAGAGAATGAGCATGTATATCTCGAGATATACATGCTCATTCT CTGCTTTTTG
	5	CCGGCCACGTGTAACATAGGGAAACTCGAGTTTCCCTATGTTACACG TGGGTTTTTG

2.7 PCR-Primer und Oligonukleotide

Tabelle 7: Primer und Proben für die RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz
Gata5-TM_fw	5'- AGGACCAGCTTCGTACCTGACTTC -3'
Gata5-TM_rv	5'- CGTCCCTGCGCCACAGT -3'
Gata5-TM_probe	5'- AGGGCCGGGAGTGCCTCAACTG -3'
Il18-TM_fw	5'- CTGTGTTTCGAGGATATGACTGATATTGA -3'
Il18-TM_rv	5'- ACAGCCAGTCTCTTACTTCACTGTC -3'
Osmr-TM_fw	5'- CACATGCTGCTGCAGATCATAAC -3'
Osmr-TM_rv	5'- ACTTCTCCTTCACCCACTGACTTT -3'
S100a8-TM_fw	5'- TGTCTCAGTTTGTGCAGAATATAAA -3'
S100a8-TM_rv	5'- TTATCACCATCGCAAGGAACTC -3'

Tgfb3-TM_fw	5'- CCCTGGTGTGGCATGTGA -3'
Tgfb3-TM_rv	5'- GAACCCTCCGAAACCAGGAA -3'
Tgfb1-TM_fw	5'- CCGGAGAGCCCTGGATACC -3'
Tgfb1-TM_rv	5'- CCAACCCAGGTCCTTCCTAAAG -3'

Tabelle 8: PCR-Primer zur Überprüfung der Klonierungsschritte und der ES-Klone

Bezeichnung	Sequenz
pEntr_sc_UP1	GTTGTAAAACGACGGCCAGTCTT
neoTm-LP1	GTGCCAGTCATAGCCGAAT
E1loxSE1Li-UP	AATTCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATACGT
FsaSF-sc-neo-LP2	ATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCT
pGl3-UP	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
mTGF-b1-LP	GCTGATCCCGTTGATTTCC
mTGF-b1-UP	AGGTCACCCGCGTGCTAAT
RosES-UP2	GCTCCTCAGAGAGCCTCGGCTAGGTAG
RosES-UP1	CTTGGTGCGTTTGCGGGGATG
R26-Tva-GT_UP	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
RosES-LP1	GGAGCCTGCTTTTTTGTACAAACTTGTGA
RosES-LP2	ACCTCGAGGGTACCCGGTGAAGG
R26-Tva-GT-SA-mut_LP	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
neoTM_UP1	TGGATTGCACGCAGTTCT
FsaSFneosc_LP2	ATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCT
pGL3-pA-pause-4645-UP	TGAATAGTTAATTGGAGCGGCCGCAATA
pGL3-pA-pause-4812-LP	GATCAGTTATCTAGAGAAATGTTCTGGCACCTGCA
BrPa-UP1	AGAAATTGGACAGCAAGAAAGCGAGCTTCTAG
BroadPA 5038—UP	CGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTAT
BroadPA 5219—UP	GGTCAGTGCATTTAAACATAAAGAAAT
BrPa-LP1	TAAATACAGCATAGCAAACTTTAACCTCCAAATC
R26-Tva-GT-wt_LP	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
R26-IA_LP1	CATTCTCAGTGGCTCAACAACACT
pBroadpA-5268-LP	AAATGAAGAGCTAGTTCAAACCTTGG

3 Methoden

3.1 Klonierung

3.1.1 Präparative Gelelektrophorese und Gelextraktion

Zur Extraktion eines DNA-Fragments für die weitere Verwendung nach Gelelektrophorese wurde ein Ethidiumbromid-freies Gel hergestellt. Als alternativer DNA-Marker diente der Nukleinsäure-Farbstoff *GelStar*, der bei Beleuchtung des Gels mit blauem Licht die aufgetrennten DNA-Fragmente sichtbar macht. Das Gelstück, welches das gewünschte DNA-Fragment (das anhand der Größe identifiziert wurde) enthielt, wurde mithilfe eines Skalpell herausgeschnitten und das enthaltene DNA-Fragment unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits gemäß den Herstellerangaben extrahiert und aufgereinigt.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Die jeweiligen DNA-Bereiche werden dabei durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide (auch Primer genannt) definiert, die als Startpunkt für die DNA-amplifizierende DNA-Polymerase dienen.

Die Größe als Identifikationsmerkmal des jeweiligen DNA-Abschnittes wird im Anschluss an die PCR durch Gelelektrophorese bestimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kam die PCR sowohl als Screening-Methode zur Verifizierung der Klonierungsschritte und Identifikation positiver ES-Klone zum Einsatz, als auch zur Genotypisierung der Mäuse, um jeweils mutierte Allele vom Wildtyp unterscheiden zu können. Die Techniken der Reversen Transkriptions-PCR (RT-PCR) und der quantitativen PCR (qPCR) werden gesondert erläutert.

3.1.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA, also zur Entfernung von Überresten der PCR-Reaktion erfolgte eine Säulenaufreinigung. In Abhängigkeit der Größe und gewünschten Konzentration des PCR-Produktes erfolgte hierzu die Aufreinigung mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit oder des MinElute PCR Purification Kit entsprechend den Herstellerangaben. Auch zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien erfolgte eine Säulenisolation. Hierfür wurde das QiagenTip20 Kit gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.1.4 Transformation kompetenter Bakterien

Sämtliche Plasmid-Konstrukte der einzelnen Klonierungsschritte wurden in chemisch kompetente Bakterien transformiert. Zum Einsatz kamen dabei sowohl chemisch kompetente E.coli One Shot® TOP10 (Invitrogen) als auch One Shot® Stbl3™ (Invitrogen), wobei letztere besonders geeignet sind für die Transformation großer instabiler DNA-Sequenzen, da sie die Häufigkeit ungewünschter homologer Rekombination verringern. Die Transformation erfolgte entweder mittels Hitzeschock-Methode oder mittels KCM-Methode. Für die Hitzeschock-Methode wurden 2 µl der Klonierungsreaktion auf die kompetenten Bakterien gegeben. Anschließend erfolgte die 30-minütige Inkubation auf Eis, gefolgt vom namensgebenden Hitzeschock (42 °C für 30 sec). Nach einer erneuten 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt und die resultierende Bakteriensuspension für 1 h bei 37 °C inkubiert. 5 µl der Suspension wurden auf einer vorgewärmten Agarplatte (mit antibiotikahaltigem Selektivmedium) ausplattiert. Anschließend erfolgte die Kultivierung bei 37 °C bzw. 25 °C.

Bei der KCM-Methode erfolgt die Transformation der Bakterien chemisch durch Zugabe von Kalium-, Calcium- und Magnesiumchlorid (KCM-Puffer). Als DNA-Lösung wurden 200 - 500 ng der DNA-Probe mit 20 µl 5x KCM-Puffer gemischt und mit ddH₂O bis zu einem Volumen von 100 µl aufgefüllt. 100 µl der kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit den 100 µl DNA-Lösung vorsichtig gemischt. Daraufhin erfolgte die Inkubation bei 4 °C für 20 min, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C (im Falle von One Shot ® TOP10) bzw. für 2 h bei 25 °C (im Falle von One Shot ® Stbl3™) und 200 rpm inkubiert, um die Expression des Resistenzgens zu ermöglichen. Anschließend wurden die Bakterien auf vorgewärmten mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C bzw. 25 °C kultiviert (vgl. (Chung et al. 1989).

3.1.5 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an bestimmten, jeweils Enzymspezifischen Sequenzen (id est Basenabfolgen) erkennen und schneiden können. Für die enzymatische Reaktion ist neben dem jeweiligen Restriktionsenzym und der zu verdauenden DNA, der Zusatz eines Enzym-abhängigen Puffers (NEB 1-4), sowie z.T. von bovinem Serumalbumin (BSA) notwendig. Der resultierende Reaktionsansatz wurde bei der optimalen Reaktionstemperatur (25 °C oder 37 °C, abhängig vom

verwendeten Restriktionsenzym) für 2 - 12 h inkubiert, anschließend erfolgte zumeist eine Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 65 °C für 20 Minuten. Die Größenbestimmung der resultierenden DNA-Fragmente (als Identifikationsmittel) erfolgte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Reagenzien	20 µl Ansatz
DNA	2 µl
NEB-Puffer (10x)	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
BSA (10x)	2 µl
aqua dest.	13 µl

3.1.6 Herstellung von glatten Enden bei DNA-Fragmenten (*Blunting*)

Infolge des Verdau mit Restriktionsendonukleasen entstehen in Abhängigkeit vom verwendeten Enzym und dessen Schnittstelle zwei unterschiedliche Typen von DNA-Enden. Man unterscheidet sogenannte Klebeenden (*sticky ends*), bei denen an einem der beiden Stränge ein aus wenigen Basen bestehender Überhang entsteht, von glatten Enden (*blunt ends*), die keinen solchen Überhang aufweisen. Eine Ligation von mehreren DNA-Fragmenten ist nur über komplementäre Klebeenden oder glatte Enden möglich, so dass bei nicht komplementären Klebeenden ein Blunting erfolgte. Hierzu wurden die überhängenden 5'- und 3'-Enden von DNA-Fragmenten durch die T4 DNA Polymerase zu Doppelsträngen ergänzt. Diese Reaktion erfolgte für 15 min bei 22 °C mit anschließender Hitzeinaktivierung bei 70 °C (für 10 min).

Tabelle 10: Reaktionsansatz zur Herstellung glatter Enden

Reagenzien	25 µl Ansatz
DNA (bis 5 µg)	10 µl
10x Blunting Puffer	2,5 µl
2x dNTPs	5 µl
Blunt Enzyme Mix	1 µl
ddH ₂ O	6,5 µl

3.1.7 Dephosphorylierung

Um die Religation eines mittels Restriktionsendonukleasen aufgeschnittenen Vektors zu verhindern, erfolgte im direkten Anschluss an den Verdau die Entfernung der Phosphatgruppe an den 5'-Enden der DNA durch die *rAPid Alkaline Phosphatase* durch Inkubation bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurde die Phosphatase durch 5-minütige Inkubation bei 75 °C inaktiviert.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für Dephosphorylierung

Reagenzien	20 µl Ansatz
DNA (bis 1 µg)	17 µl
10x rAPid Alkaline Phosphatase Puffer	2 µl
rAPid Alkaline Phosphatase	1 µl

3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Verknüpfung mehrerer (meistens zwei) DNA-Fragmente (i.d.R. einerseits ein Vektor, andererseits das einzufügende DNA-Fragment (=Insert)) erfolgt enzymkatalysiert die sogenannte Ligation durch Ausbildung von Phosphodiesterbindungen. Als Ligationenzym fand für die vorliegende Arbeit die T4 DNA Ligase (Invitrogen) Verwendung. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 22 °C.

Tabelle 12: Reaktionsansatz für Ligation

Reagenzien	21 µl Ansatz
Vektor (30 fmol))	2 µl
Insert (90 fmol)	6 µl
2x Quick Ligation Puffer	10 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
ddH ₂ O	2 µl

3.1.9 Klonasereaktion

Zur Übertragung, also Einklonierung, von spezifischen Genen bzw. Genfragmenten, im Rahmen dieser Arbeit der LSL-Tgfb1-Kassette, in einen Zielvektor kann die Gateway® Technologie (Invitrogen) verwandt werden. Hierbei geschieht der Transfer des zu übertragenden DNA-Fragments aus dem Ausgangs- in den Zielvektor über Rekombination an den spezifischen *attachment sites*. Hierzu wurde der Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen) genutzt. Für die Klonasereaktion wurden jeweils

37,5 µg DNA des Ausgangs- und des Zielvektors eingesetzt und mit 0,5 µl des Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix über Nacht bei 25 °C inkubiert. Mittels Zugabe von 0,25 µl Proteinase K und anschließender Inkubation bei 37 °C für 10 Minuten wurde die Reaktion beendet. 2,75 µl der Klonasereaktion wurden anschließend für die Transformation des so generierten Targeting-Vektors (hier pRosa26-LSL-Tgfb1) in One Shot® Stbl3™ E.coli Bakterien eingesetzt.

3.1.10 Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterienstämme erfolgte die Herstellung von Glycerinkulturen. Hierzu wurden der Bakteriensuspension (500 µl) 400 µl Glycerin zugefügt und gemischt. Diese Mischung wurde anschließend bei -80 °C verwahrt.

3.2 Embryonale Stammzellkultur (ES-Kultur)

3.2.1 Kultur muriner embryonaler Stammzellen

Die murinen embryonalen Stammzellen wurden von der Firma Taconic bezogen. Es handelt sich dabei um Zellen aus dem Mausstamm 129S6 (W4/129S6 Zellen).

Embryonale Stammzellen wachsen auf einer Einzelschicht von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs), die als Fütterschicht der Ernährung der embryonalen Stammzellen dienen. Um beim späteren Picken von ES-Einzelklonen eine dauerhafte Kontamination mit MEFs zu vermeiden, sind die Fibroblasten mitotisch inaktiv, was durch eine Bestrahlung der Zellen mit 34 Gray erreicht wurde. Als Fütterschicht wurden MEFs der Passage 4 bis 11 auf mit Gelatinelösung beschichteten Zellkulturschalen ausgesät und unter Verwendung von MEF-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurden die MEFs jeweils einen Tag vor Zugabe der embryonalen Stammzellen ausgesät, und vor endgültiger Nutzung als Fütterschicht nochmals auf komplette Konfluenz überprüft.

Die Kultivierung der embryonalen Stammzellen auf der Einzelschicht von MEFs erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in ES-Medium, das täglich gewechselt wurde.

3.2.2 Kryokonservierung von embryonalen Stammzellen

Für die Kryokonservierung wurden die embryonalen Stammzellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Trypsins abgelöst. Durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die resultierende Zellsuspension wurde bei 1200 rpm für

5 min zentrifugiert, und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem, frisch angesetztem Einfriermedium resuspendiert und unmittelbar in ein Einfrierröhrchen transferiert. Durch Platzieren des Einfrierröhrchens in einer mit Isopropanol isolierte Einfrierbox (Nalgene®) bei -80 °C wurde eine konstante Kühlungsrate von -1 °C/min. gewährleistet. Nach 12-24 h erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

3.2.3 Vorbereitung des Targeting-Vektors zur Transfektion der embryonalen Stammzellen

Der generierte Targeting-Vektor (im Rahmen dieser Arbeit pRosa26-LSL-Tgfb1) wurde für die Transfektion der embryonalen Stammzellen mit dem Ziel der Generierung eines neuen Mausmodells, das die zeit- und ortspezifischen Überexpression von Tgfb1 ermöglicht, wie folgt kultiviert und aufgereinigt. Aus der angelegten Glycerinkultur der den Targeting-Vektor enthaltenden Stbl3-Bakterien wurde eine Starterkultur (5 ml LB-Medium + 5 µl Ampicillin) angeimpft und diese bei 25 °C kultiviert. Eine finale Flüssigkultur von 150 ml wurde anschließend mit 4 ml der Starterkultur inokuliert und wiederum bei 25 °C und 200 rpm kultiviert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bis zu einer Optischen Dichte von 1,1. Die Plasmidisolierung erfolgte mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Nach der vorgeschriebenen Elution der zuvor mit Isopropanol gefällten DNA erfolgte eine erneute Präzipitation mit Ethanol, wobei zuvor die Konzentration des ersten DNA-Eluats bestimmt wurde, und dieses aufgeteilt wurde in eine Hauptprobe für die weitere Verwendung zur Transfektion und eine Analyseprobe für Kontrollverdau und -linearisierung.

3.2.4 Transiente Transfektion mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wurde die wie unter 3.2.3 beschrieben präparierte gefällte Plasmid-DNA des Targeting-Vektors pRosa26-LSL-Tgfb1 nach Zentrifugation, Waschen mit Ethanol und erneuter Zentrifugation in 100 µl steril filtriertem TE-Puffer gelöst. 30 µg des Targeting-Vektors wurden durch Verdau mit PacI linearisiert und der Erfolg der Linearisierung mittels Gelelektrophorese bestätigt.

1×10^7 embryonale Stammzellen wurden nach Trypsin-vermittelter Ablösung und Zentrifugation in 750 µl kaltem PBS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einer gekühlten Elektroporationsküvette (BioRad) mit dem linearisierten Targeting-Vektor vermischt. Die Elektroporation erfolgte im GenePulser II (BioRad) unter

Einstellung von 250 V und 500 μ F. Anschließend wurden die elektroporierten Zellen zu vorgewärmtem ES-Medium gegeben und auf Zellkulturschalen mit MEF-Fütterschicht ausgesät.

3.2.5 Selektion und Expansion

Um nur embryonale Stammzellen mit erfolgter Integration des Zielkonstrukts zu expandieren, wurde ab 18 h nach Elektroporation bei jedem Mediumwechsel Geneticin in einer Endkonzentration von 250 μ g/ml zugesetzt. Durch die von LoxP-Sequenzen flankierte Stopprezision, die ein Neomycinresistenzgen enthält (neo-stop), sind nur Zellen mit Integration des Zielkonstrukts in der Lage das zugesetzte Geneticin durch Phosphorylierung zu inaktivieren, und somit zu wachsen.

Unter beständiger Selektion mit Geneticin wurden die ES-Einzelklone expandiert, bis zum einen die nicht resistenten Zellen sicher abgestorben waren und zum anderen die resistenten Klone groß genug zum Picken waren. Etwa 1 bis 1,5 Wochen nach Elektroporation wurden die gewachsenen Einzelklone gepickt und jeweils auf ein Loch einer 96-Loch-Platte (zur DNA-Gewinnung für Screening-PCR) sowie einer 24-Loch-Platte (zur weiteren Kultivierung) transferiert.

Bei Nachweis der homologen Rekombination in der Screening-PCR (siehe unten) erfolgte die weitere Expansion der Einzelklone ausgehend von der 24-Loch-Platte über Anzucht auf einer 6-Loch-Platte, von der bereits ein Teil der Zellen kryokonserviert wurde, bis zur Kultur in einer 6cm-Schale. Bei ausreichender Zellzahl dort erfolgte die finale Kryokonservierung der embryonalen Stammzellen.

3.2.6 Nachweis der homologen Rekombination

Zur Überprüfung, ob die Transfektion der embryonalen Stammzellen mit dem Targeting-Vektor pRosa26-LSL-Tgfb1 durch Elektroporation zu einer homologen Rekombination der LSL-Tgfb1-Kassette am Rosa26-Lokus geführt hatte, wurde eine Screening-PCR von allen gepickten Einzelklonen durchgeführt. Durch Einsatz der Primer RosES-UP2, der in der Rosa26-Region im Mausgenom bindet, und RosES-LP2, der in der Rosa26-5'-Homologie-Region des Targeting-Vektors bindet, kann bei Nachweis des PCR-Amplifikates von einer erfolgten Integration ausgegangen werden. Als einzusetzende Proben für die Screening-PCR wurde die DNA der gepickten embryonalen Stammzellen in der 96-Loch-Platte isoliert. Zu diesem Zweck wurde das Medium abgesaugt und je 20 μ l PCR-Lysepuffer hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 55 °C für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend in PCR-

Reaktionsgefäße pipettiert. Daraufhin wurden die DNA-Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Die Größe der PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese bestimmt. Bei stattgehabter homologer Rekombination war dabei ein DNA-Amplifikat mit einer Größe von 1229 bp zu erwarten.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für Screening-PCR

Reagenzien	Menge
RosES-UP2 (10 µM)	2 µl
RosES-LP2 (10 µM)	2 µl
5x Q-Lösung	11 µl
10x Puffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
ddH ₂ O	25,65 µl
HotStar Taq DNA Polymerase	0,35 µl
DNA	2 µl

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für Screening-PCR

Temperatur	Zeit	
95 °C	16 min	
95 °C	40 sec	45x
62 °C	45 sec	
65 °C	4 min, +3 sec/Zyklus	
65 °C	10 min	
23 °C	Pause	

3.2.7 Überprüfung der genetischen Veränderung mittels PCR

Mit der unter Abschnitt 3.2.5 beschriebenen Screening-PCR erfolgt letztlich nur der Nachweis der homologen Rekombination. Um in den dort positiven ES-Klonen weiterführend das komplette Konstrukt zu überprüfen bzw. zu gewährleisten, dass dieses in seiner Gesamtheit in den Rosa26-Locus integriert wurde, wurden weitere PCRs durchgeführt, die zusammengenommen die gesamte LSL-Tgfb1-Kassette abdecken (vgl. Abb. 3). Zur Sicherstellung der Spezifität und Sensitivität wurden in den PCRs stets auch eine Negativ- und eine Positivkontrolle eingesetzt.

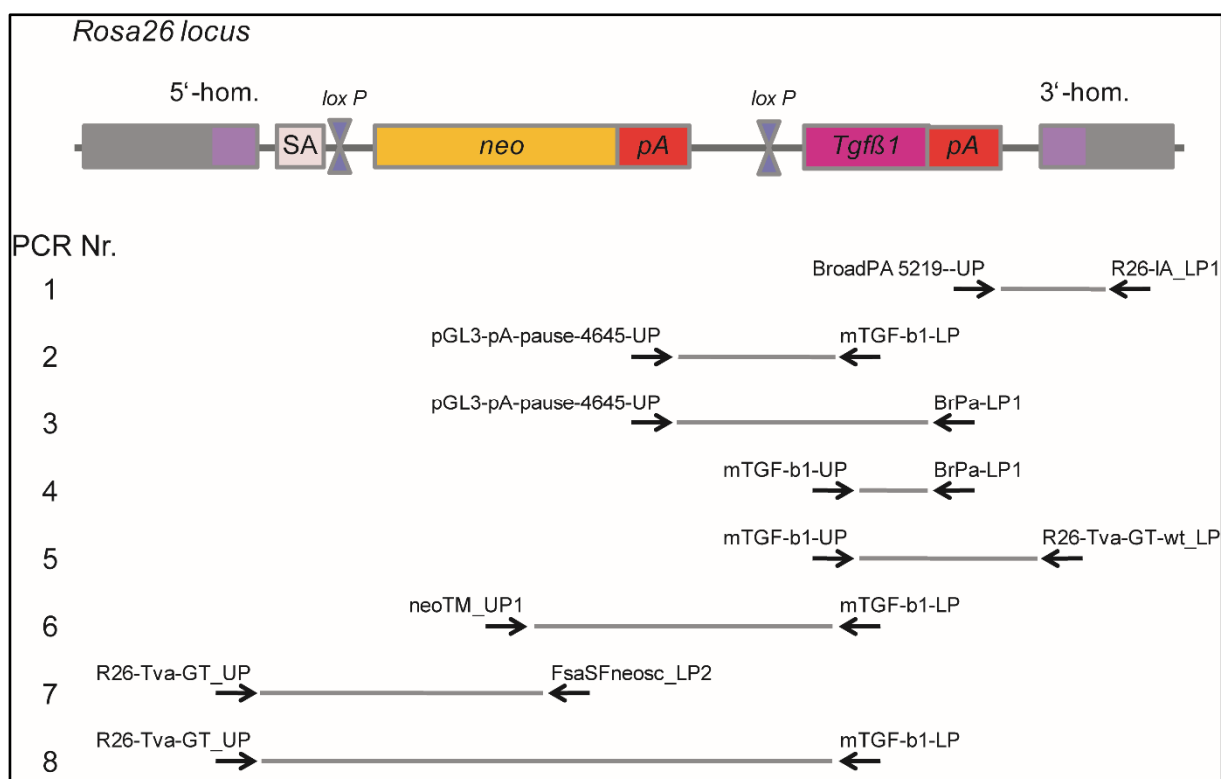


Abbildung 3: LSL-Tgfb1 im Rosa26-Locus

Schema der in den Rosa26-Locus integrierten LSL-Tgfb1-Kassette sowie der Primer, die in PCRs zur Überprüfung der ES-Klone Verwendung fanden.

5'-hom.: 5'-Homologie-Region; SA: Spleißakzeptorstelle (*splice acceptor site*); neo: Neomycin-Resistenzgen; pA: Poly-A-Sequenz; 3'-hom.: 3'-Homologie-Region.

Tabelle 15: Allgemeiner Reaktionsansatz für die PCRs zur Überprüfung der ES-Klone. Als Primer wurden jeweils die in Abbildung 3 aufgeführten Primer eingesetzt.

Reagenzien	Menge
Vorwärtsgerichteter Primer (10 µM)	3,2 µl
Rückwärtsgerichteter Primer (10 µM)	3,2 µl
5x Q-Lösung	17,6 µl bzw. 0 µl
10x Puffer	8 µl
dNTPs (10 mM)	3,2 µl
ddH ₂ O	42,4 µl bzw. 60 µl
HotStar Taq DNA Polymerase	0,56 µl
DNA	2 µl

Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für PCRs zur Überprüfung der ES-Klone

Temperatur	Zeit	
95 °C	20 min	
95 °C	35 sec	9x
65 °C	1 min, -1 °C/Zyklus	
65 °C	10 min,	
95 °C	35 sec	40x
55 °C	45 sec	
65 °C	10 min, +5 sec/Zyklus	
65 °C	20 min	
25 °C	Pause	

3.2.8 Mykoplasmentest

Um eine Kontamination der embryonalen Stammzellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde eine auf Mykoplasmen gerichtete PCR durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 3.2.1 beschrieben kultiviert. Bei einer Konfluenz von circa 50 % wurde der komplette Überstand in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei Raumtemperatur für 2 Minuten abzentrifugiert (250 xg). Der resultierende Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und über 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (20000 xg). Der nun resultierende Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet in 30 - 50 µl sterilem H₂O resuspendiert. Selbige Probe wurde für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt und dann bei -20 °C aufbewahrt. Für die PCR wurden 2 µl der gewonnenen Probe eingesetzt. Entsprechend dem Protokoll der Methodensammlung der Bund/ Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik wurde für die Mykoplasmen-PCR eine Mischung verschiedener Primer eingesetzt, um bei positiven Befunden, durch Verdauung des PCR-Produkts mit Restriktionsendonukleasen die Mykoplasmenart zu bestimmen zu können. Für eine 30µl-PCR wurde folgender Ansatz bzw. Reaktionsbedingungen gewählt:

Tabelle 17: Reaktionsansatz für Mykoplasmen-PCR

Reagenzien	Menge
RedTaq	15 µl
5'-primer mix	2 µl
3'-primer mix	2 µl

ddH ₂ O	9 µl
Sample	2 µl

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für Mykoplasmen-PCR

Temperatur	Zeit	
95 °C	15 min	
94 °C	1 min	40x
60 °C	1 min	
74 °C	1 min	
72 °C	10 min	
25 °C	Pause	

Zeigte sich in der anschließend durchgeführten Gelelektrophorese eine Bande der Größe 510 bp, wurde dies als positiver Mykoplasmentest gewertet.

3.2.9 Blastozysteninjektion

Die Blastozysteninjektion der embryonalen Stammzellen wurde von der Firma Polygene AG (Schweiz) durchgeführt. Die genetisch veränderten murinen embryonalen Stammzellen wurden in Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen injiziert, und die Blastozysten anschließend in CD-1-Weibchen implantiert. Die geborenen Tiere waren in unterschiedlichem Maße chimär, wobei der Grad des Chimärismus anhand der Fellfärbung abgeschätzt wurde. Hoch-chimäre Tiere, die damit eine höhere Wahrscheinlichkeit der Keimbahntransmission hatten, wurden von der Polygene AG für die weitere Verpaarung mit C57Bl/6-Mäusen eingesetzt.

3.3 Tierexperimente

3.3.1 Tierhaltung und Mauslinien

Sowohl die Mauslinien für ein endogenes Pankreaskarzinommodell zur Verpaarung mit der im Rahmen dieser Arbeit generierten LSL-Tgfb1 Mauslinie als auch die für die orthotope Implantation verwandten immuninkompetenten SCID-Mäuse wurden in einzeln belüfteten Käfigen mit einer Besetzung von max. 6 Mäusen gehalten.

Sämtliche tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern, welche die zuständige Genehmigungsbehörde darstellt, genehmigt.

3.3.2 Genotypisierung aus Schwanzspitzenbiopsien

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde genomische DNA aus einer Schwanzspitzenbiopsie gewonnen. Dazu wurden die letzten 2 mm des Mausschwanzes scharf abgetrennt. Dieses Schwanzspitzenbiopsat wurde unmittelbar in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in das 60 µl PCR-Lysepuffer zugegeben wurden. Die Lyse erfolgte bei 55 °C über 1,5 h. Durch das anschließende Erhitzen auf 95 °C für 20 min wurde die enthaltene Proteinase K, und damit die Lysereaktion, gestoppt. Mithilfe eines Schüttelgerätes erfolgte zunächst die Mischung, mittels anschließender Zentrifugation (14000 rpm – 4 °C – 10 min) die Abtrennung des Überstandes, der dann als Substrat für die Genotypisierungs-PCRs diente. Der allgemeine Ansatz sowie generelle Reaktionsbedingungen der Genotypisierungs-PCRs sind in Tabelle 19 und 20 aufgeführt; zum Teil erfolgte – beispielsweise bei großen PCR-Produkten oder der Schmelztemperatur der Primer entsprechend – eine Modifikation der Reaktionsbedingungen.

Tabelle 19: Allgemeiner Ansatz für Genotypisierungs-PCRs

Reagenzien	Menge
RedTaq	15 µl
5'-primer mix	2 µl
3'-primer mix	2 µl
ddH ₂ O	9 µl
Sample	2 µl

Tabelle 20: Allgemeine Reaktionsbedingungen der Genotypisierungs-PCRs

Temperatur	Zeit	
95 °C	15 min	
94 °C	1 min	40x
60 °C	1 min	
74 °C	1 min	
72 °C	10 min	
25 °C	Pause	

3.3.3 Orthotope Implantation

Um das Wachstums – und Metastasierungsverhalten in vivo zu analysieren, wurden die in ihrer Genexpression durch shRNA-vermittelten Knockdown veränderten Zellen sowie die entsprechenden Kontrollzellen (transduziert mit ungerichteter scrambled

shRNA) orthotop in das Pankreas von immuninkompetenten Mäusen implantiert. Dabei wurden jeweils 3000 Zellen in 30 µl DMEM ohne Zusätze in das Pankreas injiziert.

Für die Implantation wurden die Mäuse mit einer gewichtsadaptierten Dosis MMF (0,5 mg/kgKG Medetomidin, 5 mg/kgKG Midazolam und 0,05 mg/kgKG Fentanyl) narkotisiert. Prä- und postoperativ erhielten die Mäuse ebenfalls gewichtsadaptiert Metacam zur Analgesie. Nach Entfernung des Fells in der OP-Region mit einem Rasierer, wurde die enthaarte Haut mit 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend mit sterilem Besteck mit einem 1 - 1,5 cm langen schräg verlaufenden Schnitt im Bereich des linken Oberbauchs eröffnet. Nach sorgfältiger Separation der Haut vom Peritoneum wurde die Bauchhöhle über der durchscheinenden Milz mit einem zweiten Satz sterilen Bestecks eröffnet. Nach Darstellung von Milz und Pankreas wurden diese vorsichtig mit einer atraumatischen Pinzette nach außen disloziert. Unter vorsichtigem Spannen des Pankreasgewebes wurden 30 µl der Zellsuspension ($c = 1 \times 10^5$ /ml, entsprechend 3000 Zellen) mit einer Mikroliterspitze in den Pankreasschwanz injiziert. Dabei diente das Auftreten einer flüssigkeitsgefüllten Blase an der Injektionsstelle ohne Auslaufen von Zellsuspension als unmittelbare Qualitätskontrolle. Anschließend wurden Pankreas und Milz vorsichtig reponiert und das Peritoneum mittels Einzelknopfnähten mit Ethilon-Nahtmaterial verschlossen. Der Hautschnitt wurde mit Hautklammern verschlossen, die nach 10 Tage entfernt wurden. Nach intraperitonealer Applikation der Antagonisten-Mischung AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon) wurden die Mäuse zum Aufwachen in eine auf 33 °C vorgeheizte Wärmekammer gesetzt und nach vollständigem Erwachen in die Käfige zurückgesetzt. Die implantierten Tiere erhielten an den ersten drei postoperativen Tagen eine Analgesie mit Metacam und wurden kontinuierlich hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes und Gewichtsverlaufs kontrolliert. Gemäß den Vorgaben des Tierversuchsantrags wurden die Tiere bei Anzeichen der Beeinträchtigung durch das Tumorwachstum oder Erreichen der Abbruchkriterien getötet.

3.3.4 Biolumineszenzbildgebung

Biolumineszenz ist ein chemischer Prozess, durch den Energie frei wird, die in Form von Licht abgegeben wird. Bei der Biolumineszenzbildgebung im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Prozess zum nicht-invasiven und nicht-radiogenen Nachweis von Zellen in Mäusen (in vivo und ex vivo bzw. post mortem) genutzt, die – im Rahmen der vorliegenden Arbeit – i.d.R. durch genetische Manipulation zu diesen biochemischen

Prozessen (id est enzymatischen Reaktionen) fähig sind. Katalysierende Enzyme der Biolumineszenz-Reaktion sind unterschiedliche Luciferasen, von denen die bekannteste – die *firefly* Luciferase (fLuc) des Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*) – auch in dieser Arbeit Anwendung fand. Die Messung erfolgte mit einer -70 °C kalten CCD-Kamera mit Bildverstärker. Für die Messung wurden die Mäuse gewichtsadaptiert mit MMF intraperitoneal narkotisiert (0,5 mg/kgKG Medetomidin, 5 mg/kgKG Midazolam und 0,05 mg/kgKG Fentanyl). Nach Eintreten der Narkosewirkung wurden 150 mg/kgKG D-Luciferin, das als Substrat von fLuc dient, intraperitoneal injiziert. Durch die katalytische Aktivität der fLuc entstehen instabile Dioxetane und Dioxetanone, die unter Freisetzung von Energie in Form von Licht zerfallen, was mithilfe der CCD-Kamera detektiert wird. Nach der Injektion von D-Luciferin wurden die Mäuse in die komplett abgedunkelte Aufnahmebox der Kamera gelegt. Zunächst erfolgte die Aufnahme eines Weißlichtbildes als Referenz. 10 Minuten nach Injektion des D-Luciferins erfolgte die eigentliche Biolumineszenz-Messung durch Aufnahme mehrerer Bilder mit unterschiedlichen Belichtungszeiten bei einer Bildverstärkung von 900 G. Die weitere Bildverarbeitung erfolgte mit der Software SimplePCI. Nach erfolgter Bildgebung erfolgte die Antagonisierung der Narkose mit AFN.

3.3.5 Sektion

Bei Anzeichen der Beeinträchtigung durch das Tumorwachstum (nach orthotoper Implantation von Tumorzellen) oder Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere nach erfolgter Biolumineszenzbildgebung in vivo mittels Inhalation von Isofluran und nachfolgendem Genickbruch getötet. Nach Desinfektion des Bauchfells mit 70%igem Ethanol wurden die Mäuse mit einer medianen Laparotomie eröffnet. Die Organe wurden entnommen und einzeln in ein Loch einer 6- oder 12-Loch-Platte (gefüllt mit isotonomischer Kochsalzlösung) gelegt. Es erfolgte dann rasch (um die Umsetzung des noch in vivo applizierten D-Luciferins zu nutzen) eine erneute Biolumineszenzbildgebung der Organe.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen und –methoden

Die Tumorzellen wurden – sofern nicht anders angegeben – in DMEM-Zellkulturmedium unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin in Brutschränken bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Sämtliche Arbeiten mit den Zellen

erfolgten in Sterilwerkbänken. Den wachsenden Zellen wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte alle 1 - 3 Tage frisches Medium zugesetzt.

Wurden abgelöste Zellen benötigt (bspw. zur weiteren Passagierung, Aussaat für Zellkulturversuche, Kryofixierung) wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels Inkubation mit Trypsin für 1 - 5 min bei 37 °C gelöst. Die Inaktivierung von Trypsin wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium erreicht. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde eine Einzelzellsuspension gewonnen, die zur weiteren Kultivierung auf neue Zellkulturschalen oder –lochplatten verteilt oder anderweitig zur Kryokonservierung oder Zellzählung weiterverwandt wurde.

War die Kenntnis der exakten Konzentration der Zellsuspension nötig, erfolgte die Auszählung der Zellen in einer Neubauerzählkammer. Zur Kryokonservierung der Zellen wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Zellkulturüberstand abgesaugt und das gewonnene Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen überführt und zunächst bei -80 °C eingefroren. Nach 24-stündiger Lagerung bei -80 °C erfolgte zur definitiven Aufbewahrung die Überführung in flüssigen Stickstoff.

3.4.2 Lentivirale Transfektion und Transduktion

Um die Genexpression in den Zellen shRNA-vermittelt herabzuregulieren, wurden die Zellen lentiviral transduziert.

Für die Virusproduktion wurden je 1×10^6 HEK293FT-Zellen in 10cm-Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag erfolgte bei einer Konfluenz von 40 – 50 % die lentivirale Transfektion mit Plasmid-DNA, die wie oben beschrieben aufgereinigt worden war. Zu insgesamt 6 µg DNA (zusammengesetzt aus 3 µg DNA des entsprechenden shRNA-Plasmids, sowie 3 µg DNA der Helferplasmide pCMVdR8.74 (1,95 µg) und pMD2.G (1,05 µg)) wurde bis zu einem Volumen von 300 µl EC-Puffer hinzugefügt. Nach Zugabe von 48 µl Enhancer wurde die Mischung für 1 sec gevortext und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Effectene-Reagens, wurde für 10 sec gevortext. Während der anschließenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Medium von den HEK293FT-Zellen entfernt, diese einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und 7 ml frisches Medium hinzugefügt. Zur DNA-Transfektionsmischung wurde nun 3 ml HEK-Medium dazugegeben und die resultierende Mischung nach vorsichtigem Mischen tropfenweise auf die HEK-Zellen gegeben.

Mithilfe des Transfektionsreagens (Effectene) wird die DNA in die Zelle eingebracht und in das Genom der Zelle integriert. Dies führt zur Produktion von Lentiviren, die die jeweilige shRNA-Sequenz enthalten, durch die transfizierte Zelle. Die produzierten Viren werden von der Zelle in das Medium abgegeben, sodass das Medium zum virushaltigen Überstand wird, der zur Transduktion der Zielzellen, in denen die Genexpression verändert werden soll, genutzt wird.

Die Abnahme des virushaltigen Überstandes erfolgte nach 50, 72 und 96 Stunden (nach Abnahme wurde jeweils frisches HEK-Medium zugesetzt). Der gewonnene Überstand wurde in ein 50ml-Probenröhrchen überführt und abzentrifugiert (1250 rpm für 5 min), um möglicherweise enthaltene abgelöste Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde mit einer Kanüle in eine 10ml-Spritze aufgenommen, daraufhin ein 0,45µm-Filter auf die Spritze aufgesetzt, und der Überstand in ein neues Probenröhrchen filtriert, um weitere Zellreste zu entfernen. Der so aufgereinigte Überstand wurde nun entweder direkt tropfenweise auf die Zielzellen, deren Medium zuvor entfernt worden war, gegeben, zur Konzentrierung mit Lenti-X-Konzentrator vermischt oder zur Aufbewahrung bei -80 °C eingefroren.

3.4.3 *small hairpin RNA-vermittelter Knockdown*

small hairpin RNA (shRNA) sind kleine, etwa 60 bp große RNA-Moleküle, die aufgrund ihrer komplementären Basenabfolge (Sense-Strang + Antisense-Strang + Loop-Sequenz) eine Haarnadelstruktur bilden und mittels RNA-Interferenz (RNAi) zur gezielten Degeneration von mRNA und damit zur verminderten Expression der entsprechenden Gene führen. Die in der vorliegenden Arbeit verwandten shRNAs wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Dabei wurden pro Zielgen fünf verschiedene shRNAs genutzt, um zunächst die Knockdown-Effizienz zu evaluieren und später die effizientesten shRNAs für weitere Versuche zu nutzen. Die erworbenen shRNAs lagen initial, jeweils integriert in den Vektor pLKO.1-puro, als Glycerinkulturen vor. Zur weiteren Verwendung erfolgte die Animpfung einer Flüssigkultur (0,5 ml TB-Medium) mithilfe einer Impföse aus der Glycerinkultur. Nach Schüttelinkubation (200 rpm) bei 37 °C für 1 h erfolgte durch Ausstreichen und anschließende Kultivierung (bei 37 °C für ca. 12 h) auf einer Agarplatte mit Selektivmedium die Isolation eines Einzelklons. Je ein Einzelklon wurde zur Animpfung einer neuen Flüssigkultur (10 ml TB + 10 µl Ampicillin) verwandt, die über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurde. Bei einer ausreichenden optischen Dichte erfolgte die Pelletierung mittels Zentrifugation (7500 rpm – 15 min – 4 °C). Aus dem gewonnenen Bakterienpellet

erfolgte – wie unter 3.1.3 beschrieben – die Plasmidisolierung mittels Säulchen-Isolation (QiagenTip20).

3.4.4 DNA-Isolation aus Zellen

Für die DNA-Isolation Zellen wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

3.4.5 MTT-Assay

Zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens bzw. der Vitalität der Zellen wurde der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay durchgeführt. Dessen Prinzip beruht auf der mitochondrialen Umwandlung des wasserlöslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu wasserunlöslichem, blauem Formazan. Die Menge des Formazan, die direkt proportional zur Anzahl der vitalen Zellen ist, wird durch Messung der optischen Dichte bei 540 nm bestimmt (Mosmann 1983). Hierzu wurden 1×10^3 (R254 PPT) bzw. 2×10^3 (8182 PPT) Zellen pro Loch in je 100 μ l Medium in eine 96-Loch-Platte ausgesät. Zu definierten Zeitpunkten (24, 48, 72, 96 und 120 Stunden nach Aussaat) wurde 10 μ l MTT-Reagens pro Loch hinzugegeben und die Zellen anschließend für vier weitere Stunden unter normalen Bedingungen inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und 100 μ l einer 1:1-Mischung von 100%igem Ethanol und DMSO zugefügt. Anschließend wurden die Platten für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die Absorption der resultierenden Suspension in jedem einzelnen Loch der 96-Loch-Platte wurde mit einem Plattenlesegerät bei 540 nm bestimmt.

3.4.6 Scratch-Assay

Zur Evaluierung der Migrationsfähigkeit der Zellen fand der *Scratch-Assay* Anwendung.

Hierzu wurden auf einer 6-Loch-Platte 1×10^6 Zellen pro Loch ausgesät. Mit dieser Anzahl erreichten die Zellen nach etwa 24 h volle Konfluenz. Dann wurde dem Medium Mitomycin C in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml zugesetzt. Nach weiteren 2 h erfolgte das *Scratching*. Hierzu wurde eine 10 μ l-Pipettenspitze mit leichtem gleichmäßigem Druck durch die konfluente Zellschicht gezogen, sodass diese durch eine gerade Linie unterbrochen wurde. Anschließend wurde das Medium gewechselt, um abgelöste Zellen zu entfernen. In den folgenden Stunden und Tagen wurden Wachstum und Migration der Zellen in regelmäßigen Zeitabständen durch Bilder festgehalten. Dabei wurde durch eine anfangs angebrachte Markierung sichergestellt,

dass die zeitlich aufeinanderfolgenden, korrespondierenden Bilder stets an derselben Stelle gemacht wurden.

Die Auswertung erfolgte automatisiert mithilfe eines ImageJ-Plugins, des „*Scratch Assay Analyzer*“ (Glaß et al. 2011; Glaß et al. 2012).

3.4.7 Clonogenic Assay

Um zu überprüfen, ob die genetische Manipulation, im Sinne des Knockdowns der Kandidatengene, die Zellen in ihrer Fähigkeit verändert, Kolonien zu bilden, wurde der *Clonogenic Assay* angewandt. Hierzu wurden 2×10^3 Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Platte ausgesät. Sobald die Zellen eine gleichmäßige Verteilung sichtbarer Kolonien zeigten (ca. 2 Wochen nach Aussaat), wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und kalter 99%iger Methanol zugegeben, um die Zellen zu fixieren. Nach einer 30-minütigen Schüttelinkubation bei Raumtemperatur, wurde der Methanol abgesaugt und die Zellkolonien mit Giemsa-Lösung (als 1:20 mit Wasser verdünnte Lösung) angefärbt. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Kolonien mit destilliertem Wasser gewaschen und die Platten anschließend an der Luft getrocknet (Rafehi et al. 2011). Die Auswertung erfolgte qualitativ mittels visueller Schätzung sowie quantitativ mittels Bildbearbeitung und Flächenberechnung mit ImageJ (Version 1.52a).

3.4.8 Soft-Agar Assay

Der *Soft-Agar Assay* dient zur Analyse der Fähigkeit von Zellen zu verankerungs- und substratunabhängigem Wachstum, was im Rahmen des Metastasierungsprozesses eine Eigenschaft von malignen Zellen darstellt, die benötigt wird, um nach Intravasation als zirkulierende Tumorzellen zu überleben.

Durch die Kultivierung in „Soft Agar“ wird einerseits ein Andocken der Zellen an den Boden der Zellkulturschale verhindert (verankerungsunabhängig), andererseits die einzelnen Zellen separiert voneinander gehalten, so dass untereinander kein Austausch von Wachstumssignalen und -faktoren erfolgen kann (substratunabhängig).

Zunächst erfolgte hierfür die Herstellung des 0,5%igen Soft-Agars für die Bodenschicht (siehe Ansatz in Tabelle 21) bei einer Temperatur von 41 °C. Jeweils 4 ml dieses Soft-Agars wurden in 6cm-Zellkulturschalen gegossen. Anschließend erfolgt das Aushärten bei Raumtemperatur. Für die zellhaltige Soft-Agar-Schicht wurde Agarose mit einem niedrigeren Schmelzpunkt verwendet (*low melting agarose*). Zunächst

erfolgte die Zugabe von FCS, Penicillin/Streptomycin und DMEM in den berechneten Mengen zur 1%igen Stammlösung. Diese Mischung wurde anschließend auf 37 °C temperiert, worauf die Zugabe der Zellen (für eine Konzentration von 5×10^4 /ml) erfolgte (siehe Tab. 22).

Tabelle 21: Mischungsverhältnis zur Herstellung des Soft-Agars für die Bodenschicht

Reagenzien	Endgültige Konzentration
1,0 % Agarose	0,5 %
FCS	10 %
Pen/Strep	1 %
DMEM	ad benötigte Menge

Tabelle 22: Mischungsverhältnis des zellhaltigen Soft-Agars

Reagenzien	Endgültige Konzentration
1,0 % <i>low melting</i> Agarose	0,5 %
FCS	10 %
Pen/Strep	1 %
DMEM	ad benötigte Menge
Zellen	5×10^4 /ml

Jeweils 2 ml dieser Zellsuspension wurden vorsichtig auf die Bodenschicht gegeben und anschließend ebenfalls bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die Kultivierung erfolgte über 2 Wochen bei 27 °C, wobei 2x /Woche 1 ml frisches Medium zugegeben wurde. Für die Auswertung wurde schließlich der verbleibende Mediumüberstand abgenommen und die Kolonien mit 0,005%iger Kristallviolett-Lösung (2 ml pro 6cm-Schale) über Nacht bei Raumtemperatur angefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Bildanalyse mit ImageJ Version 1.52a. Hierzu wurden die Zellkulturschalen gescannt, die resultierenden Bilder binarisiert und die Gesamtfläche der Kolonien berechnet.

3.5 Genexpression

3.5.1 Reverse Transkription zur Generierung von cDNA (RT-PCR)

Zur Gewinnung von cDNA, die anschließend mittels qPCR zur Analyse der Genexpression quantifiziert wurde (siehe 3.5.2) oder im Rahmen von Klonierungen Anwendung fand, wurde die Gesamt-RNA von Zellen mithilfe des kommerziell erhältlichen RNeasy Kit entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der in doppelt destilliertem Wasser eluierten RNA wurde photometrisch in einem Nanodrop-Photometer gemessen. Durch reverse Transkription (Reaktionsansatz siehe Tab. 23, Reaktionsbedingungen siehe Tab. 24) wurde jeweils 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Die Reagenzien für die reverse Transkription wurden von Applied Biosystems bezogen.

Tabelle 23: Reaktionsansatz für RT-PCR

Reagenzien	Endgültige Konzentration
10x TaqMan RT Puffer	1x
MgCl ₂	5,5 mM
dNTP-Mix	je 500 µM
Random hexamers	2,5 µM
RNase Inhibitor	0,4 U/µl
Multiscribe RT	1,25 U/µl
RNA	1 µg
RNase freies Wasser	Ad 100 µl

Tabelle 24: Reaktionsbedingungen für RT-PCR

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
48 °C	1 h
95 °C	5 min
4 °C	Pause

3.5.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Zur Quantifizierung der – wie unter 3.5.1 beschrieben – gewonnenen cDNA, und damit indirekt der RNA und damit wiederum der Genexpression, erfolgte die qPCR. Deren Prinzip beruht auf der Echtzeit-Messung eines Fluoreszenz-Farbstoffes, der nur bei

Interkalation in doppelsträngige DNA detektierbar ist. Dadurch ist anhand des Vergleichs mehrerer Proben untereinander bzw. mit Standardkurven (siehe Abschnitt 3.5.3) eine relative bzw. absolute Quantifizierung möglich. Die Spezifizierung auf eine cDNA bzw. mRNA wird durch den Einsatz spezifischer Primer erreicht. Durchgeführt wurde die qPCR in einer speziellen 96-Loch-Platte im StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Die Auswertung erfolgte mit der Software StepOne™ (Applied Biosystems).

Tabelle 25: Reaktionsansatz für qPCR

Reagenzien	Endgültige Konzentration
2x SYBR MM Puffer	1x
Vorwärts-Primer	100 nM
Rückwärts-Primer	100 nM
Matrize/ Probe	5 ng
Wasser	ad 25 µl

3.5.3 Standardkurven für qPCR

Zur Quantifizierung der Genexpression mittels qPCR wurden zum Vergleich der zu analysierenden Probe Standardkurven angefertigt. Dazu erfolgte die qPCR von Verdünnungsreihen, die ein Plasmid mit der jeweiligen cDNA-Sequenz in bekannter Konzentration enthielten. Die spezifischen Plasmide, die die jeweilige cDNA enthielten, wurden mittels Einklonierung der cDNA-Sequenz in unterschiedliche Plasmide hergestellt. Durch Bestimmung der Konzentration und Kenntnis der Plasmidgröße wurde die jeweilige Kopienzahl in der Ausgangsprobe mittels folgender Formel bestimmt:

$$Kopien/\mu l = \frac{1000 \text{ bp}}{\text{Plasmidgröße [bp]}} \times 9,1 \times 10^{11} \times c \left[\frac{\mu g}{\mu l} \right].$$

Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe, die dann als Standardkurve diente, mit folgenden Konzentrationen angesetzt:

Tabelle 26: Konzentrationen der qPCR-Standardkurven

Standard	Konzentration [Kopien/μl]
S1	$1,5 \times 10^5$
S2	3×10^4
S3	6×10^3
S4	$1,2 \times 10^3$
S5	240
S6	48
S7	9,6

3.6 Statistische Analyse

Die Datensätze wurden mittels Varianzanalyse und Student's t-Test miteinander verglichen. Der Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven erfolgte über Cox-Regression und Log-Rank-Test. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Bei multiplen Vergleichen innerhalb eines Datensatz wurde ergänzend eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Die entsprechend adjustierten Signifikanzwerte werden als p_{adj} zusätzlich aufgeführt. Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen bzw. Diagramme wurde mit der Software Graph Pad Prism (Version 8.1.2) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung des Targeting Vektors pRosa26-LSL-Tgfb1

Die Klonierungsschritte für die Herstellung des *Targeting vectors* pRosa26-LSL-Tgfb1 zur Generierung eines konditional Tgfb1-exprimierenden Mausmodells wurden praktisch von Lisa Girschick durchgeführt.

Dazu wurde das die Tgfb1-cDNA enthaltende Plasmid pBluTgfb1 mittels der Restriktionsendonukleasen ClaI und XhoI aufgeschnitten und die resultierenden DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das die Tgfb1-cDNA enthaltende DNA-Fragment wurde mittels Gelelution mit dem QIAquick Gel Extraction Kits aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Anschließend erfolgte das *Blunting* der gewonnenen DNA. Die für die konditionale Expression nötige, vor der Neomycin-Stopkassette 5'-gelegene LoxP-Sequenz wurde als sogenannter LoxLinker in einen modifizierten *Entry vector* pENTR™/D-TOPO®-Vektor (pENTR™-gtneo-stop-lox-MCS-PA)

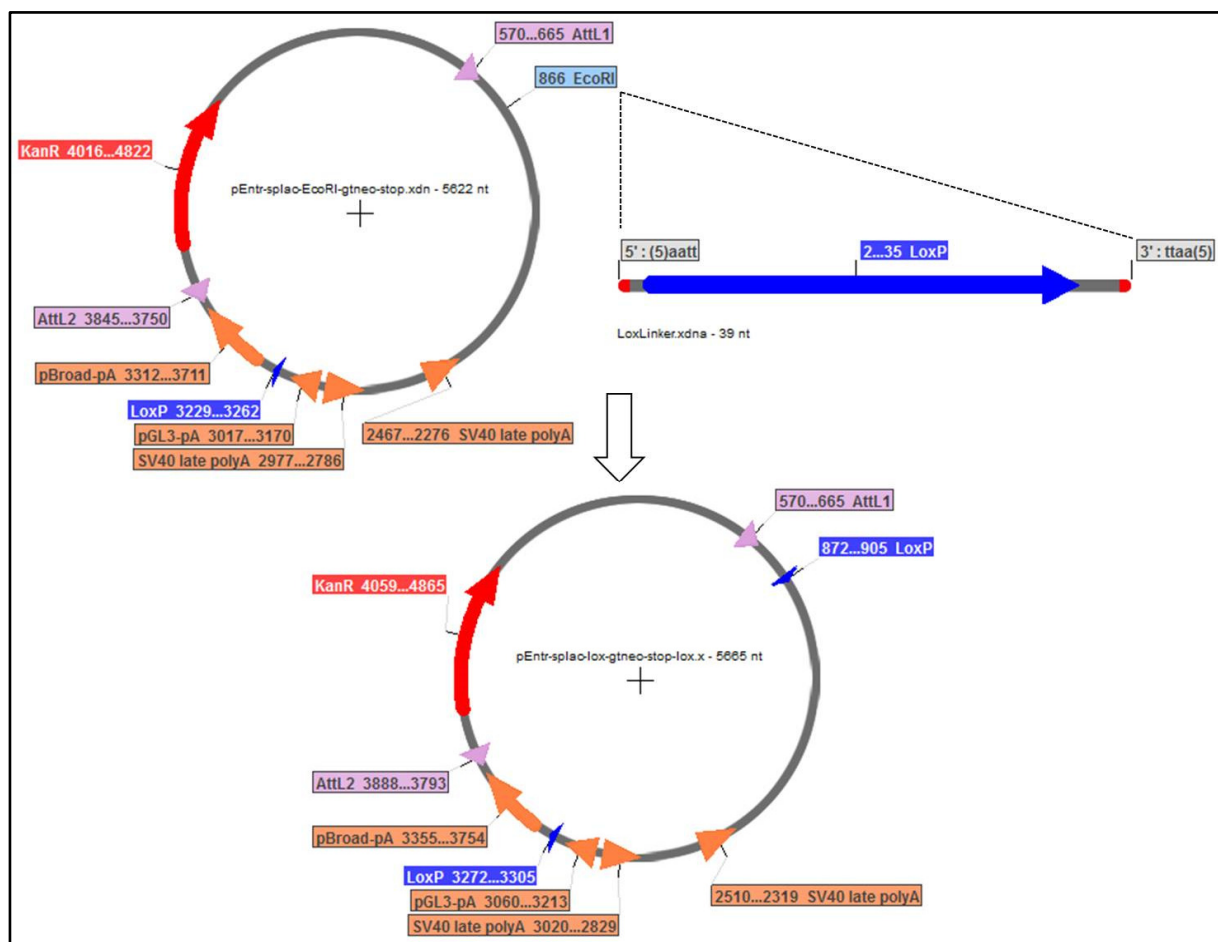


Abbildung 4: 1. Klonierungsschritt

Einfügen des zweiten LoxP-Segments als LoxLinker in den *Entry Vector*

eingefügt. Dazu wurde der LoXLinker als zwei komplementäre DNA-Einzelstränge von MWG Eurofins synthetisiert, und mittels *Annealing* zum Doppelstrang hybridisiert.

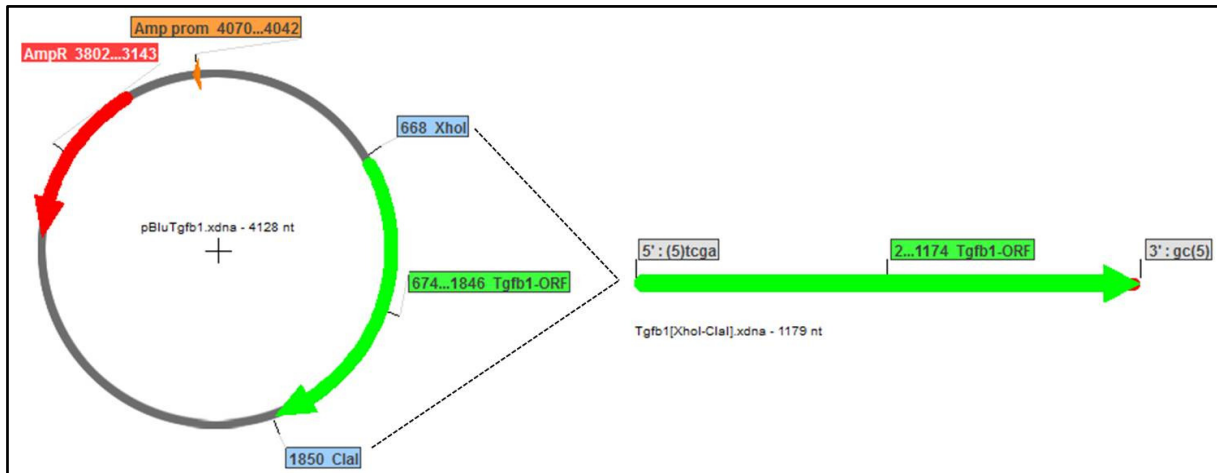


Abbildung 5: 2. Klonierungsschritt

Ausschneiden des Tgfb1-ORF aus pBLu-Tgfb1 durch den Verdau mit XhoI und ClaI. Die Gewinnung des DNA-Fragments erfolgte durch präparative Gelelektrophorese und anschließende Gelelektion.

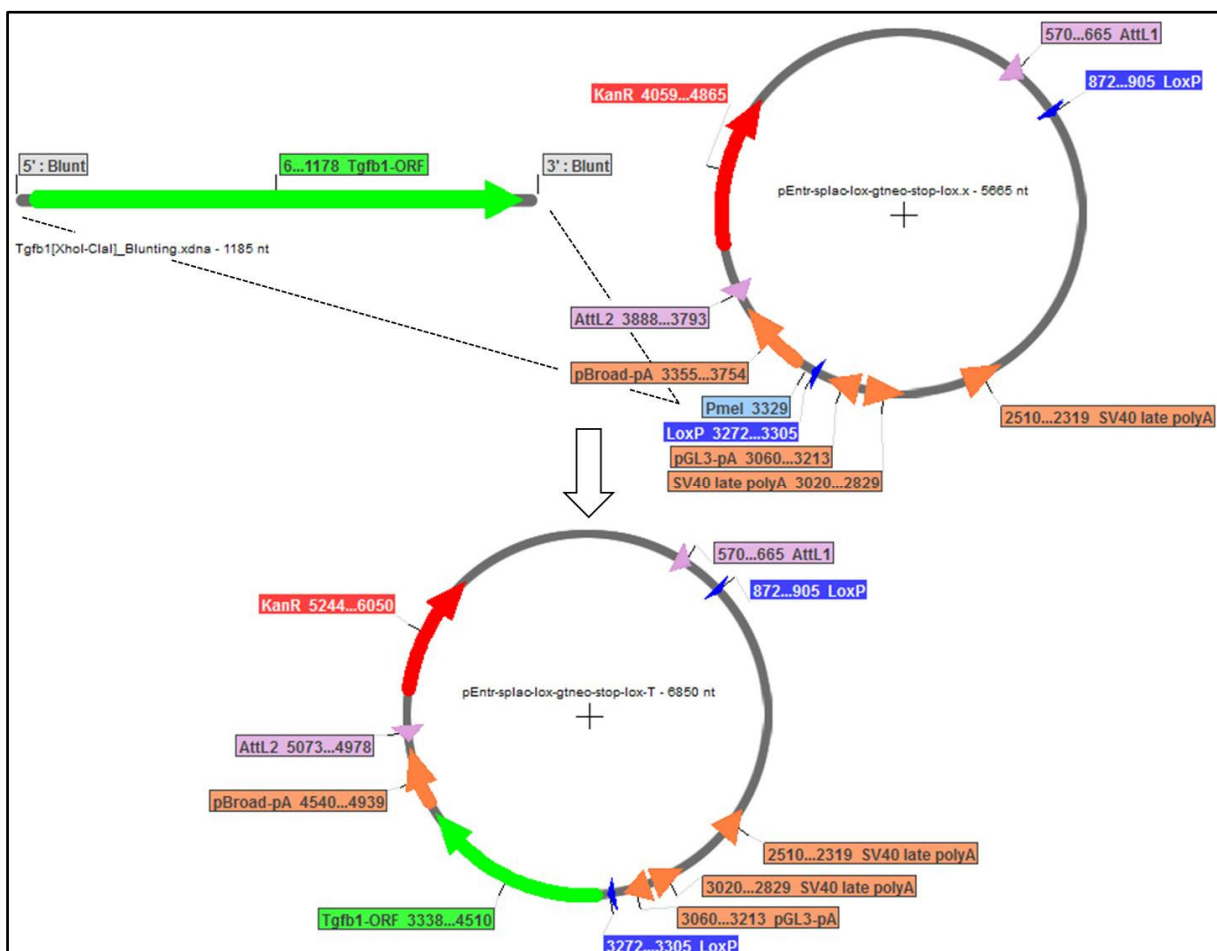


Abbildung 6: 3. Klonierungsschritt

Einfügen des Tgfb1-ORF in den *Entry Vector*.

Der *Entry vector* wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI eröffnet und mit der *rAPid Alkaline Phosphatase* dephosphoryliert, anschließend erfolgte die Ligation des doppelsträngigen LoxLinkers mit dem dephosphoryliertem *Entry vector*. Das resultierende weiter modifizierte Plasmid (pENTR™-lox-gtneo-stop-lox-MCS-PA) wurde mittels KCM-Methode in kompetente Stbl3-Bakterien transformiert. Durch Screening-PCR, Kontrollverdaus mit Restriktionsendonukleasen und Sequenzierung wurde ein korrekter Klon identifiziert, und dieser für die weiteren Klonierungsschritte aufgereinigt.

Als nächster Schritt erfolgte der Einbau der Tgfb1-cDNA in den modifizierten *Entry vector* pENTR™-lox-gtneo-stop-lox-MCS-PA. Dazu wurde letzterer mit PmeI eröffnet und anschließend dephosphoryliert. Hierauf erfolgte die Ligation der vorbereiteten Tgfb1-cDNA (siehe oben) mit dem *Entry vector*. Auch dieses Plasmid (pENTR™-lox-gtneo-stop-lox-Tgfb1-PA) wurde mittels KCM-Methode in Stbl3-Bakterien transformiert, und anschließend ein korrekter Einzelklon mittels Screening-PCRs, Kontrollverdaus, Kontrolllinearisierung und Sequenzierung identifiziert. Mittels des Gateway® LR Clonase™ Enzym Mix wurde die Lox-Stop-Lox-Tgfb1-pA-Kassette

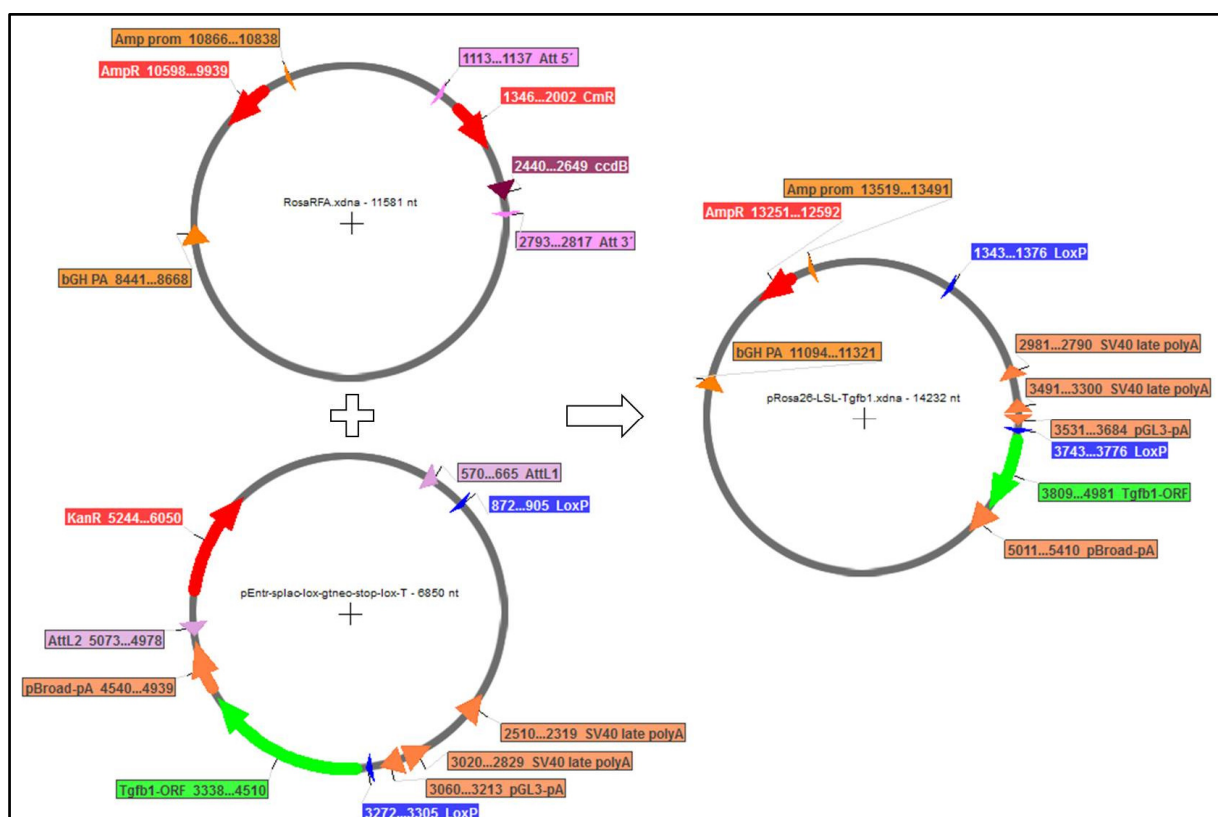


Abbildung 7: 4. Klonierungsschritt

Die Klonase-Reaktion von RosaRFA und dem *Entry Vector* generiert den finalen Targeting Vector pRosa26-LSL-Tgfb1.

(LSL-Tgfb1-pA) durch Rekombination in den Rosa26 Targeting-Vektor pRosaRFA (modifiziert in unserem Labor ausgehend von pROSA26-1, der freundlicherweise von P. Soriano zur Verfügung gestellt wurde) transferiert und so der gewünschte *Targeting vector* pRosa26-LSL-Tgfb1 generiert, dessen Korrektheit durch Größenbestimmung mittels Kontrollverdau und Kontrolllinearisierung überprüft wurde.

4.2 Generierung gentechnisch veränderter embryonaler Stammzellen:

Knock-In von LSL-Tgfb1 in den Rosa26-Lokus

Zur Generierung eines Mausmodells, das eine zeit- und ortsspezifische Überexpression von Tgfb1 ermöglicht, wurden murine embryonale Stammzellen mit dem oben beschriebenen Targeting-Vektor pRosa26-LSL-Tgfb1 mittels Elektroporation transfiziert. Die für die Elektroporation benötigte große Menge von 30 µg endotoxinfreier DNA wurde unter Gebrauch des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) isoliert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend durch Verdau mit PacI linearisiert, um die Rekombinationseffizienz zu erhöhen.

Im Anschluss an die Elektroporation erfolgte die Selektion der ES-Klone auf erfolgreiche Integration der Plasmid-DNA durch den Zusatz Geneticin zum Zellkulturmedium. Am achten und neunten Tag nach Elektroporation wurden 10 bzw. 20 Einzelklone gepickt und diese mittels der ES-Screening-PCR auf die Integration in den Rosa26-Lokus überprüft. In dieser ES-Screening-PCR zeigten sich zwei Klone positiv.

Diese zwei Klone, die in der ES-Screening-PCR eine Integration gezeigt hatten, wurden weiter expandiert. Zur genaueren Überprüfung der Einzelklone, das heißt auf Integration der kompletten Zielsequenz LSL-Tgfb1-pA wurden verschiedene PCRs durchgeführt, um die einzelnen Abschnitte des Konstruktes nachzuweisen (vgl. Abb. 3.). Weiterhin erfolgte ein Mykoplasmentest, durch den eine Kontamination der embryonalen Stammzellen mit Mykoplasmen ausgeschlossen werden konnte.

Um eine Mehrfach-Integration auszuschließen wurde eine qPCR durchgeführt, die über den Vergleich der cDNA der beiden ES-Klone mit Wildtypzellen als Negativkontrolle und einer Doppelt-Positivkontrolle nachweisen konnte, dass die Neomycinkassette nur einmal enthalten war.

Die Blastozysteninjektion des einen ausgewählten korrekten Einzelklons wurde von der PolyGene AG (Schweiz) durchgeführt, ebenso wie die anschließende Generierung chimärer Tiere. Vor der Blastozysteninjektion wurde dort außerdem ein Karyogramm der embryonalen Stammzellen angefertigt, um chromosomale Anomalien

auszuschließen. Hier zeigte sich ein korrekter Karyotyp in 80 % der Zellen, so dass Zellen dieses ES-Klons in 17 Blastozysten von C57Bl/6-Mäusen injiziert wurden, von denen die 16 überlebenden Blastozysten in eine CD-1-Maus transferiert wurden. Von den sechs geborenen Mäusen waren zwei hoch-chimär. Diese wurden anschließend mit C57Bl/6-Mäusen verpaart, um eine Keimbahntransmission des LSL-Tgfb1-Allels zu erreichen.

4.3 Etablierung einer PCR zum Nachweis des LSL-Tgfb1-Knockins in der Maus

Um im Rahmen der Mauszucht Mäuse mit dem neu generierten LSL-Tgfb1-Knockin in den Rosa26-Locus eindeutig identifizieren zu können, wurde eine spezifische Genotypisierungs-PCR etabliert. Hierbei war wichtig zu beachten, dass einerseits der modifizierte Rosa26-Locus vom Wildtyp spezifisch unterschieden werden muss, andererseits aber der reine, aufgrund des kleineren PCR-Produkts einfachere, Nachweis des Knockins der LSL-Kassette nicht hinreichend spezifisch ist, da bereits mehrere Mauslinien in der Arbeitsgruppe existieren, deren Knockin in den Rosa26-Locus eine LSL-Kassette vorgeschaltet ist. Basierend auf den beschriebenen PCRs zur Überprüfung der ES-Klone sowie den bereits etablierten Genotypisierungs-PCRs anderer Mauslinien der Arbeitsgruppe wurden zwei verschiedene PCR-Ansätze getestet. Abbildung 8 zeigt schematisch die mit den jeweils eingesetzten Primern theoretisch errechnete Größe der PCR-Produkte. Aufgrund der für die Genotypisierungs-PCRs eingesetzten, weniger effektiven DNA-Polymerase war das 4950bp-große PCR-Produkt bereits a priori nicht zu erwarten. Ein 600bp-großes PCR-Produkt aus diesen beiden Primern (R26-Tva-GT_UP und R26-Tva-GT-wt_LP) weist aber das Wildtyp-Allel des Rosa26-Locus nach. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine bereits etablierte Genotypisierungs-PCR durchgeführt, die die Differenzierung zwischen dem mutierten Rosa26-Locus (i.e. nach homologer Rekombination) und dessen Wildtyp-Allel erlaubt (vgl. Abbildung 9). Abbildung 10 und 11 zeigen die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Produkte der beiden Genotypisierungs-PCRs mit DNA der ersten Nachkommen der Chimären (C123.08, .09, .10, .11, .12, .2001, .2003, .2006, .2007, .2008). Als Negativkontrolle diente DNA von 2 Mäusen, die keine Veränderung im Rosa26-Locus aufweisen, was darin resultiert, dass in beiden Genotypisierungs-PCRs hier nur die 600bp-Bande zu sehen ist. Bei den R26-LSL-Tgfb1-Mäusen weist die erste Genotypisierungs-PCR (Tgfb1-GT-PCR1) mit der 851bp-großen Bande die homologe Rekombination in den Rosa26-Locus nach.

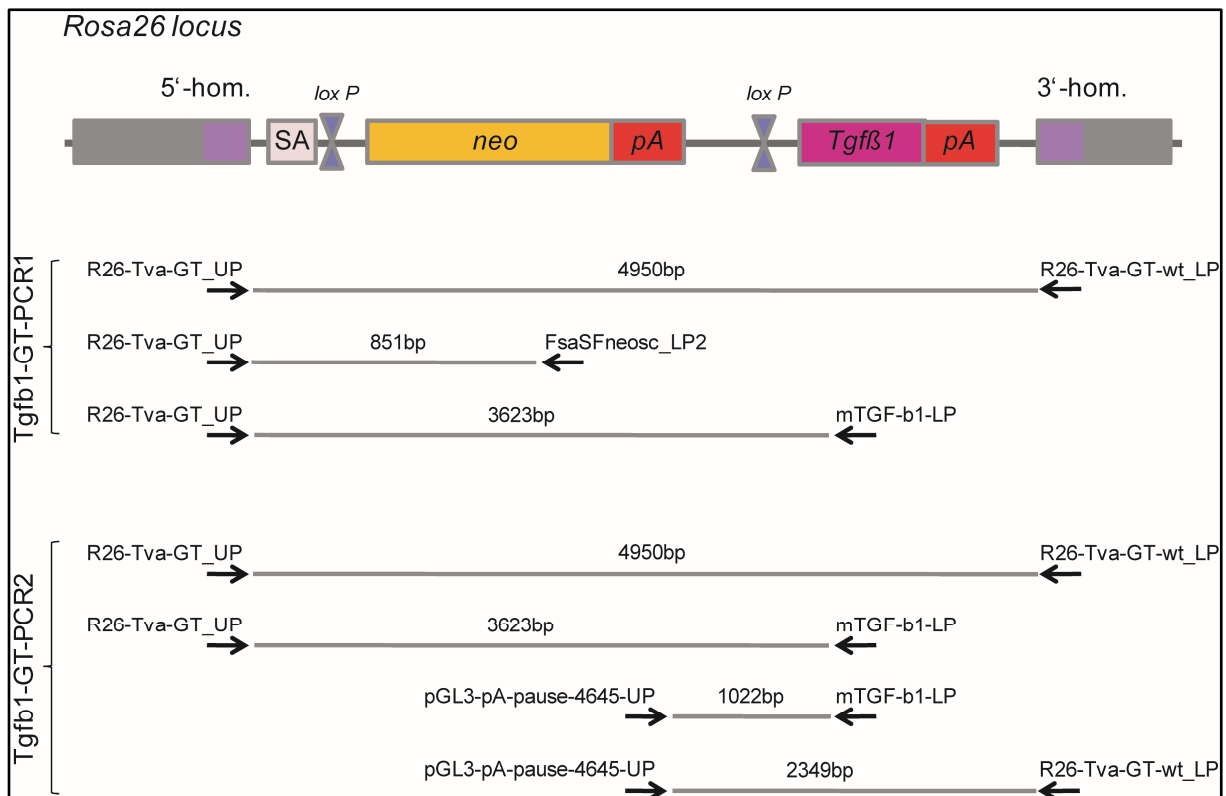


Abbildung 8: Modifizierter Rosa26-Locus

Nicht-maßstabgetreues Schema des modifizierten Rosa26-Locus. Unterhalb sind die in die beiden Genotypisierungs-PCRs (Tgfb1-GT-PCR1 bzw. Tgfb1-GT-PCR2) eingesetzten Primer sowie die daraus resultierenden theoretisch möglichen PCR-Produkte mit ihrer jeweiligen Größe (in bp) aufgeführt.

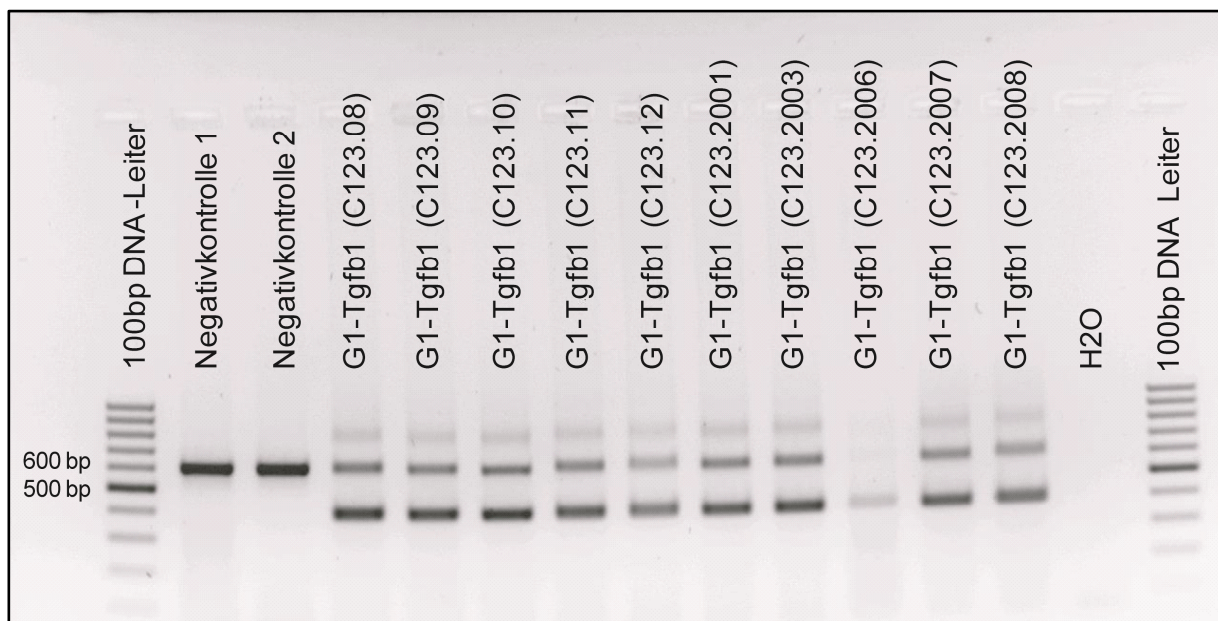


Abbildung 9: Rosa26-PCR der Chimären-Nachkommen

Die Rosa26-PCR ermöglicht die Unterscheidung zwischen dem mutierten Rosa26-Locus (=> Bande bei 310 bp) und dem Wildtyp-Allel (=> Bande bei 600 bp).

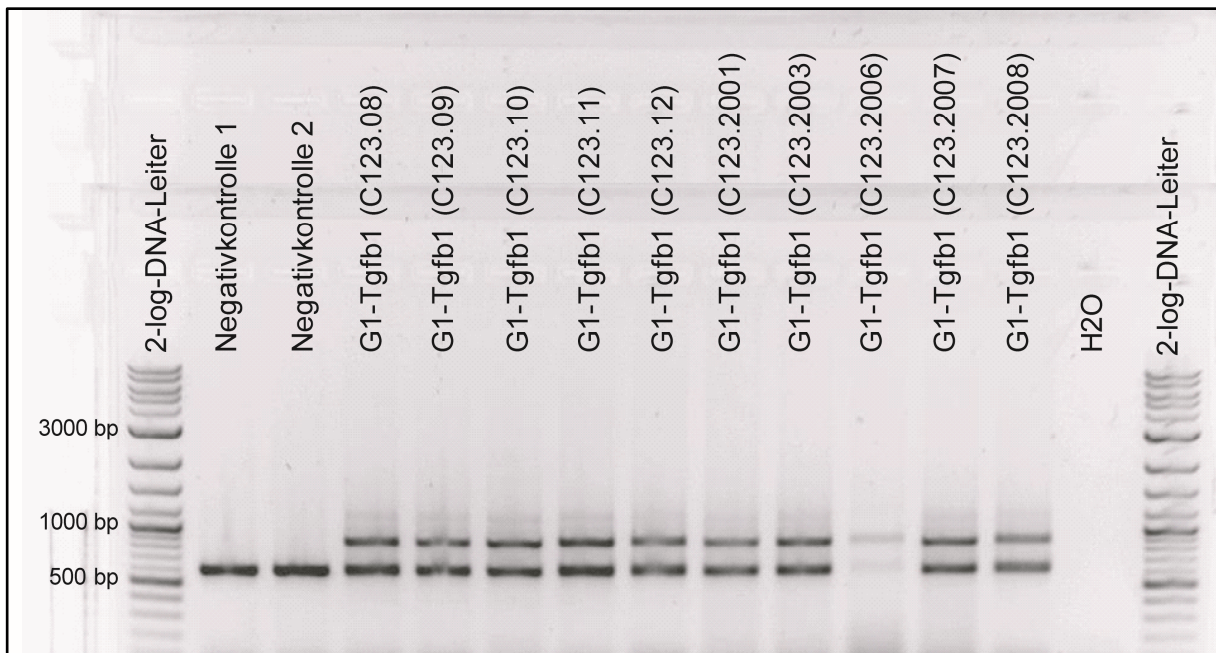


Abbildung 10: Erste Genotypisierungs-PCR

Erste Genotypisierungs-PCR zum Nachweis des LSL-Tgfb1-Knockin in den Rosa26-Locus (Tgfb1-GT-PCR1). Die Bande bei 600 bp weist das Wildtyp-Allel des Rosa26-Locus nach. Die 851bp-große Bande weist die Integration der LSL-Kassette nach (der Tgfb1-Kassette vorgeschaltet).

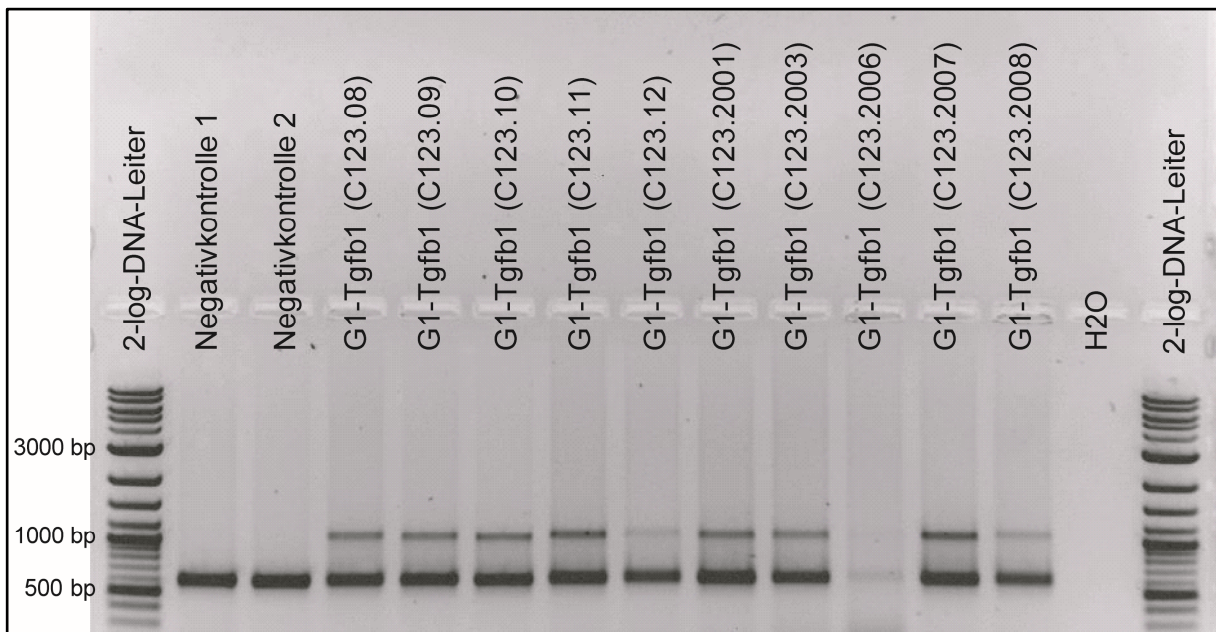


Abbildung 11: Zweite Genotypisierungs-PCR

Zweite Genotypisierungs-PCR (Tgfb1-GT-PCR2). Die Bande bei 1022 bp ist spezifisch für die Tgfb1-Kassette.

Da der rückwärtsgerichtete Primer aber in der LSL-Kassette bindet und nicht in der Tgfb1-Kassette, ist dies aber nur der Nachweis, dass die LSL-Kassette in den Rosa26-Locus rekombiniert wurde, was aufgrund anderer Mauslinien, deren

(modifiziertes) Genom ebenfalls die LSL-Kassette im Rosa26-Locus enthält (s.o.) nicht hinreichend spezifisch ist. Um eine hinreichende Identifizierung von LSL-Tgfb1 zu gewährleisten, weist die zweite PCR (Tgfb1-GT-PCR2) durch einen Primer, der direkt im Bereich der Tgfb1-cDNA-Sequenz bindet (kombiniert mit einem Primer der in der vorgeschalteten LSL-Kassette bindet), Tgfb1 spezifisch nach. Wie erwartet wurden die jeweils theoretisch möglichen, weiteren PCR-Produkte (3623 bp bzw. 2349 bp) nicht bzw. zumindest nicht in hinreichend großer Menge amplifiziert und waren somit nicht nachweisbar. Da diese zur exakten und spezifischen Genotypisierung aber auch nicht nötig waren, wurden die PCR-Bedingungen bezüglich dieses Ziels nicht weiter optimiert.

4.4 shRNA-vermittelter Knockdown der Zielgene in Pankreastumorzellen

Frühere Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Saur hatten durch Microarray-Analyse die (signifikant) unterschiedliche Expression verschiedener Gene in verschiedenen unterschiedlich stark metastasierten Pankreastumoren endogener Mausmodelle gezeigt. Anhand dieser Daten wurden sechs Zielgene ausgewählt, deren shRNA-vermittelter Knockdown und Analyse der möglichen Auswirkungen dessen (insbesondere auf die Metastasierungsfähigkeit) Ziel der vorliegenden Arbeit war.

Der Knockdown erfolgte hier in zwei unterschiedlichen pankreatischen Tumorzelllinien (R254 PPT und 8182 PPT (PPT: *pancreatic primary tumor*)), die aus den primären Pankreaskarzinomen endogener Mausmodelle isoliert worden waren. In vorausgegangenen Analysen hatte sich sowohl bei beiden primären Tumoren in den Mäusen selbst als auch nach orthotoper Implantation der aus den Primärtumoren gewonnenen Zelllinien ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Metastasierungsverhalten gezeigt. Dabei hatte R254 PPT (Genotyp: p48^{Cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+} +/-; LSL-Trp53^{R172H/+}; p53^{lox/+}) eine starke, 8182 PPT (Genotyp: p48^{Cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}) hingegen eine schwache Metastasierung gezeigt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu evaluierenden Kandidatengene waren *Gata5*, *Il18*, *Mmp2*, *Osmr*, *S100a8* und *Tgfbr3*. Entsprechend des Expressionsmusters in der vorangegangenen Analyse und des damit angenommenen Einflusses auf das Metastasierungsverhalten erfolgte der Knockdown von *Gata5* in der stärker metastasierenden Zelllinie R254 PPT, der Knockdown von *Il18*, *Mmp2*, *Osmr*, *S100a8* und *Tgfbr3* jeweils in der schwächer metastasierenden Zelllinie 8182 PPT.

Zunächst erfolgte durch lentivirale Transfektion von HEK293FT-Zellen die Produktion von Lentiviren, die die jeweilige shRNA enthielten. Mittels Zugabe von virushaltigem

Überstand auf die entsprechende, für die Transfektion in 10cm-Schalen gezogene Zelllinie erfolgte die Transduktion, um damit den gewünschten Knockdown der Kandidatengene zu erreichen. Zur Selektion erfolgreich transduzierter Zellen wurde im Anschluss daran Puromycin dem Zellkulturmedium zugegeben. Unter anhaltender Puromycin-Selektion erfolgte die Vermehrung der Zellen für RNA- und DNA-Isolation sowie zur Kryokonservierung für weitere Analysen. Neben den pro Kandidatengen jeweils fünf einzelnen shRNAs (Benennung im Folgenden jeweils „*shKandidatengen-1*“ bis „*shKandidatengen-5*“) wurden die Zellen zusätzlich mit einer Mischung aller Einzel-shRNAs eines Kandidatengens (Gesamtvolumen des zugebenen Virus-enthaltendem Überstands jeweils zusammengesetzt aus mengenmäßig gleichem Virusüberstand der Einzel-shRNAs) transduziert (im Folgenden „*shKandidatengen-Mix*“ genannt). Die Auswertung der Knockdown-Effizienz erfolgte mittels qPCR. Die drei effizientesten shRNAs bzw. die mit diesen jeweils stabil transduzierten Zellen wurden für die weitere Analyse verwandt. Abbildung 12 zeigt die Knockdown-Effizienz. In Tabelle 27 werden die anhand dieser Ergebnisse ausgewählten shRNAs der jeweiligen Kandidatengene aufgeführt. Da im Fall von *Mmp2* sehr große Varianzen und eine ausgesprochen niedrige Genexpression in der Kontrolle (mit ungerichteter shRNA transduzierte Zellen) detektiert wurde und die gerichteten shRNA keine bis eine nur sehr geringe Knockdown-Effizienz zeigten, wurde die Analyse von *Mmp2* als Kandidatengen der Metastasierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt. Da die mit den gegen *S100a8* gerichteten shRNAs transduzierten Zellen eine sehr niedrige Proliferationsrate aufwiesen (bei entsprechend der Genexpressionsanalyse mittels qPCR guter Knockdown-Effizienz) wurde auch diese Analyse im Folgenden nicht fortgeführt.

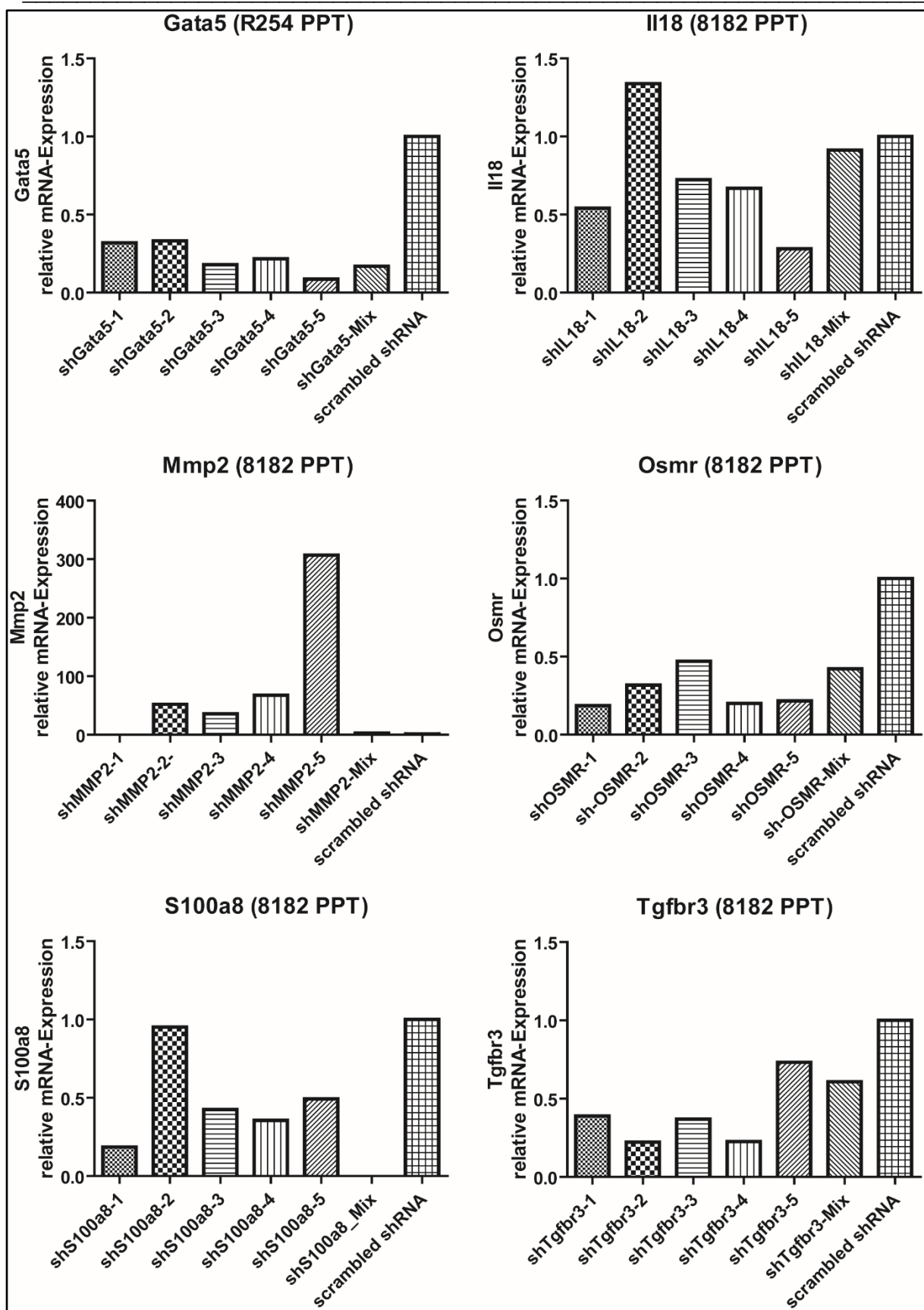


Abbildung 12: Knockdown-Effizienz

Knockdown-Effizienz der jeweiligen shRNAs der sechs Kandidatengene. Die mittels qPCR ermittelte Genexpression nach shRNA-vermitteltem Knockdown wurde in Relation zur Genexpression nach Transduktion mit einer ungerichteten shRNA („scrambled shRNA“) gesetzt.

Tabelle 27: Ausgewählte shRNAs

Anhand der ermittelten Knockdown-Effizienz ausgewählte shRNAs der jeweiligen Kandidatengene für weitere Analyse.

Kandidatengen	Ausgewählte shRNA
<i>Gata5</i>	shGata5-3
	shGata5-5
	shGata5-Mix
<i>Il18</i>	shIL18-1
	shIL18-4
	shIL18-5
<i>Mmp2</i>	Keine
<i>Osmr</i>	shOsmr-1
	shOsmr-4
	shOsmr-5
<i>S100a8</i>	Keine
<i>Tgfbr3</i>	shTgfbr3-2
	shTgfbr3-3
	shTgfbr3-4

4.5 Proliferation der Tumorzellen nach Herunterregulation von *Gata5*, *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Die Proliferation bzw. Zellviabilität der Tumorzellen nach Herunterregulation von *Gata5*, *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* wurde mittels *MTT-Assays* untersucht. Dazu wurden die Tumorzellen, die mit den in Tabelle 27 genannten shRNAs stabil transduziert worden waren (und in denen sich – wie beschrieben – eine gute Knockdown-Effizienz gezeigt hatte), eingesetzt. Als Vergleich dienten jeweils die mit der ungerichteten shRNA (*scrambled* shRNA) transduzierten Tumorzellen. Abbildung 13 zeigt als Marker der Zellviabilität bzw. der Stoffwechsellistung die Mittelwerte (aus drei unabhängigen Versuchen) der optischen Dichte (jeweils bezogen auf den 24h-Wert sowie auf den Kontrollwert) zum angegebenen Zeitpunkt nach Aussaat. Bei der Zelllinie R254 PPT zeigte sich nach Herunterregulation von *Gata5* durch alle drei untersuchten shRNAs (shGata5-3, shGata5-5 und shGata5-Mix) eine Tendenz zur gesteigerten Zellviabilität bzw. –proliferation, wobei dieser Trend aber nicht signifikant war. In der Zelllinie 8182 PPT waren uneindeutige Ergebnisse zu verzeichnen. Im Fall der Herunterregulation von *Il18* und *Tgfbr3* durch drei verschiedene shRNA zeigten sich uneinheitliche Effekte, die (bis auf shIl18-1) nicht statistisch signifikant waren. Auch bei

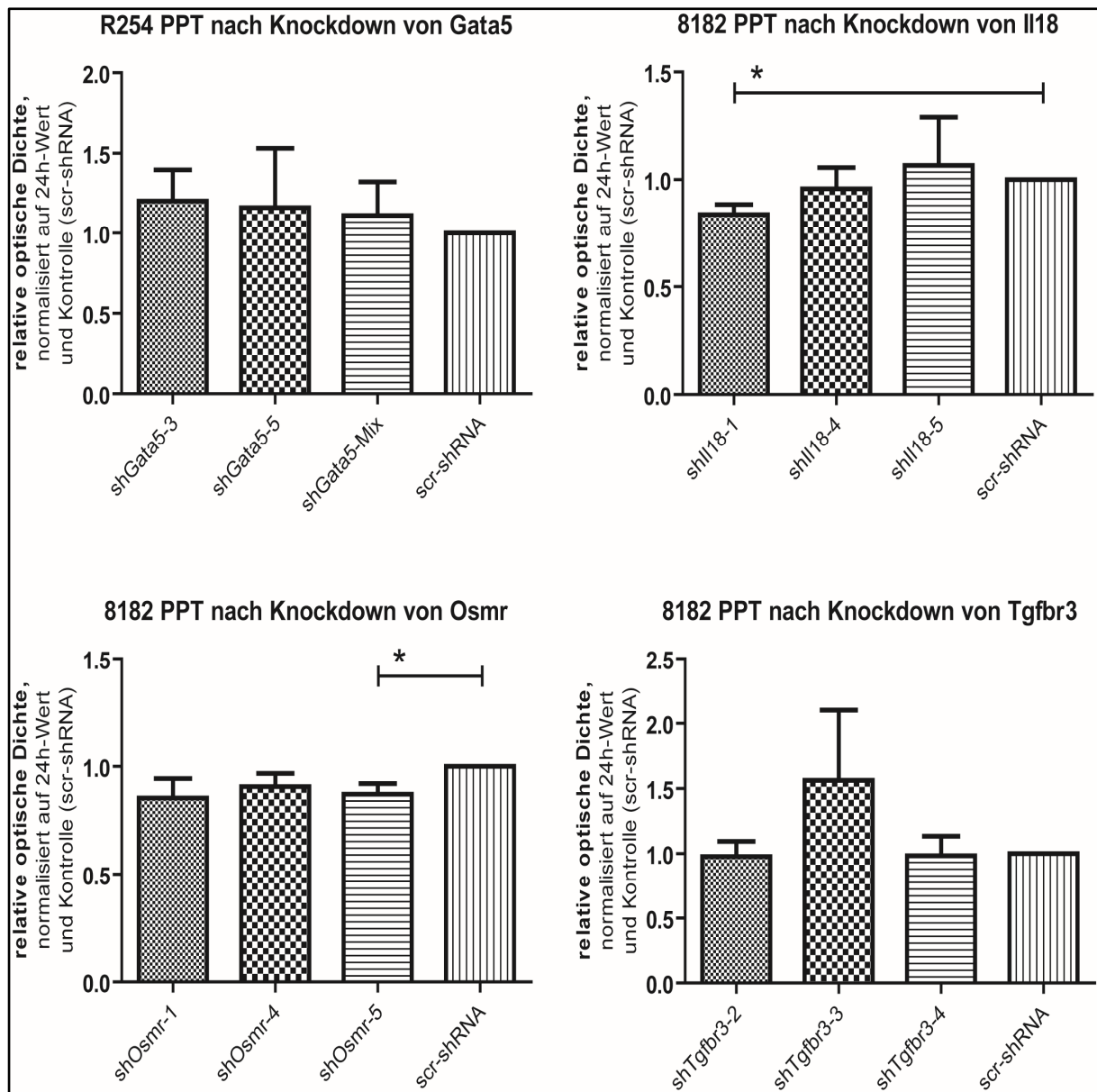


Abbildung 13: Zellviabilität nach Knockdown der Kandidatengene (MTT-Assay)

Einfluss der Herunterregulation der verschiedenen Kandidatengene auf Zellviabilität bzw. Stoffwechselleistung. In der Zelllinie 8182 PPT zeigte sich nach Herunterregulation von *Il18* durch shIl18-1 und von *Osmr* durch shOsmr-5 ohne Bonferroni-Korrektur eine signifikant verminderte Zellviabilität bzw. Stoffwechselleistung im MTT-Assay (* $p < 0,05$). Nach Bonferroni-Korrektur verfehlte shOsmr-5 die statistische Signifikanz ($p_{\text{adj}}(\text{shOsmr-5}) = 0,067$), während shIl18-1 auch nach Bonferroni-Korrektur statistisch signifikant blieb ($p_{\text{adj}}(\text{shIl18-1}) = 0,039$). Gezeigt ist die normalisierte optische Dichte (bei 540 nm) 96h nach Aussaat der Zellen, jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

der Herunterregulation von *Osmr* ergaben sich nur bei einer shRNA statistisch signifikante Ergebnisse, und dies auch nur ohne Bonferroni-Korrektur. Insgesamt lässt sich aus den hier dargestellten Ergebnissen kein Effekt der Herunterregulation der verschiedenen Kandidatengene auf die Proliferation bzw. Zellviabilität schlussfolgern. Die statistisch signifikanten Ergebnisse einzelner shRNAs sind bei fehlender

Reproduzierbarkeit durch mindestens eine zweite gegen dasselbe Gen gerichtete shRNA nicht von *off-target*-Effekten zu unterscheiden.

4.6 Migrationsverhalten der Tumorzellen nach Herunterregulation von *Gata5*, *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Das Migrationsverhalten der Zellen wurde im *Scratch Assay* untersucht. Abbildung 14 zeigt die Abnahme der Fläche des *Scratches* über die Zeit durch Migration der Zellen. In der Zelllinie R254 PPT zeigte sich nach Herunterregulation von *Gata5* eine Verlangsamung des Wiederverschlusses des *Scratches*, als Hinweis auf eine verminderte Migrationsfähigkeit. In der weiteren statistischen Analyse mittels Berechnung der *Area under the curve* (siehe Abb. 15) ergaben sich signifikante Unterschiede bei zwei der drei verwendeten shRNAs (shGata5-5 und shGata5-3),

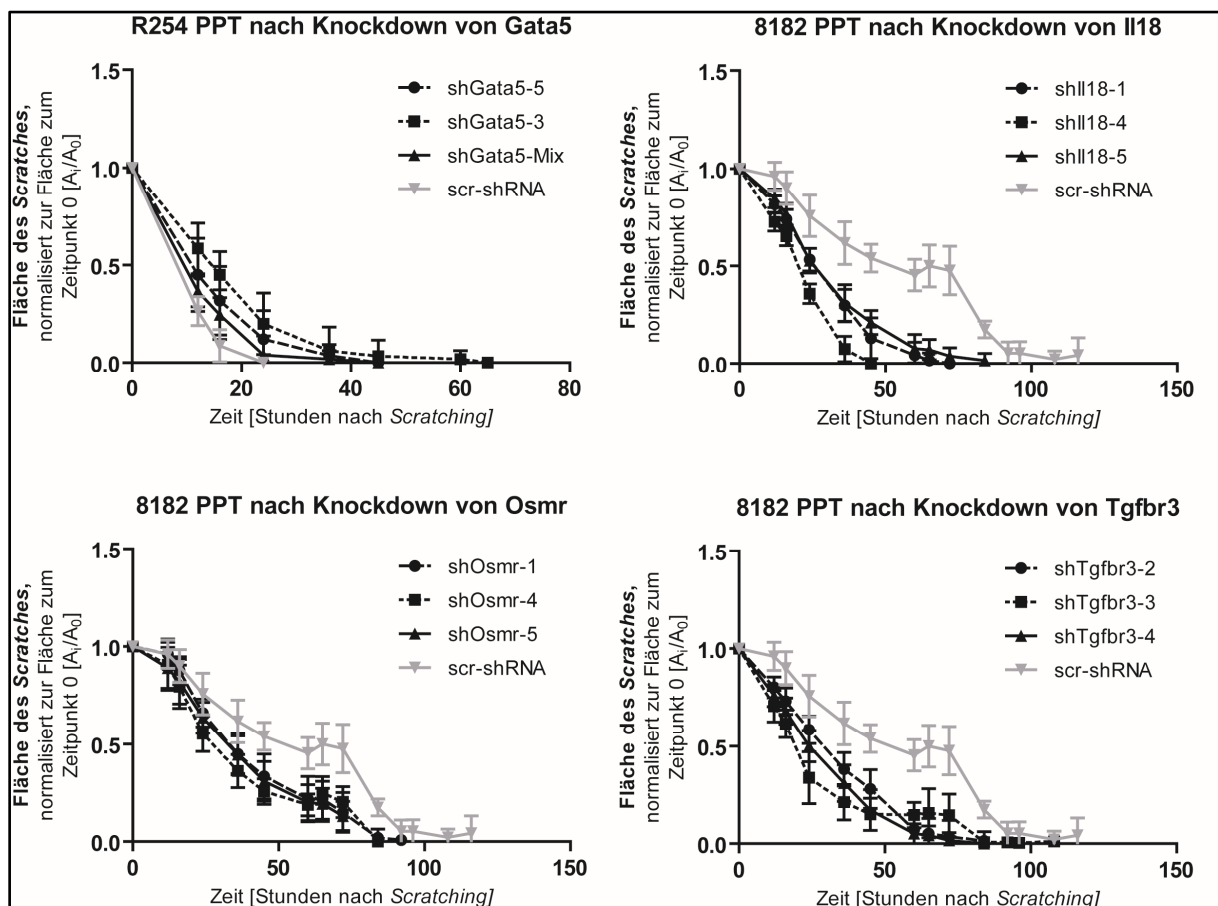


Abbildung 14: Migrationsverhalten nach Knockdown der Kandidatengene (*Scratch Assay*)

Migrationsverhalten der Zellen nach Herunterregulation der verschiedenen Kandidatengene. Nach Knockdown von *Gata5* in R254 PPT (links oben) war ein langsamerer Wiederverschluss des *Scratches* im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. In der Zelllinie 8182 PPT verschloss sich der *Scratch* nach Knockdown von *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* rascher im Vergleich zur Kontrolle (scr-shRNA). Dargestellt ist die durch Migration bedingte Abnahme der *Scratch*-Fläche über die Zeit, pro Zeitpunkt (Stunden nach *Scratching*) jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

sodass hier von einem tatsächlichen Effekt durch Herunterregulation von *Gata5*, im Sinne einer Hemmung der Migrationsfähigkeit, auszugehen ist. Allerdings verfehlte *shGata5-5* nach Bonferroni-Korrektur knapp das Signifikanzniveau. Im Gegensatz dazu schlossen sich die *Scratches* in der Zelllinie 8182 PPT nach Herunterregulation sowohl von *Il18* als auch *Osmr* und *Tgfr3* schneller im Vergleich zur Kontrolle, sodass hier eine Verstärkung der Migrationsfähigkeit vorhanden ist. Auch hier ergab die Analyse der *Area under the curve* statistisch signifikante Unterschiede, und zwar für jedes Kandidatengene bei allen drei verwendeten shRNAs. Damit ist auch hier von

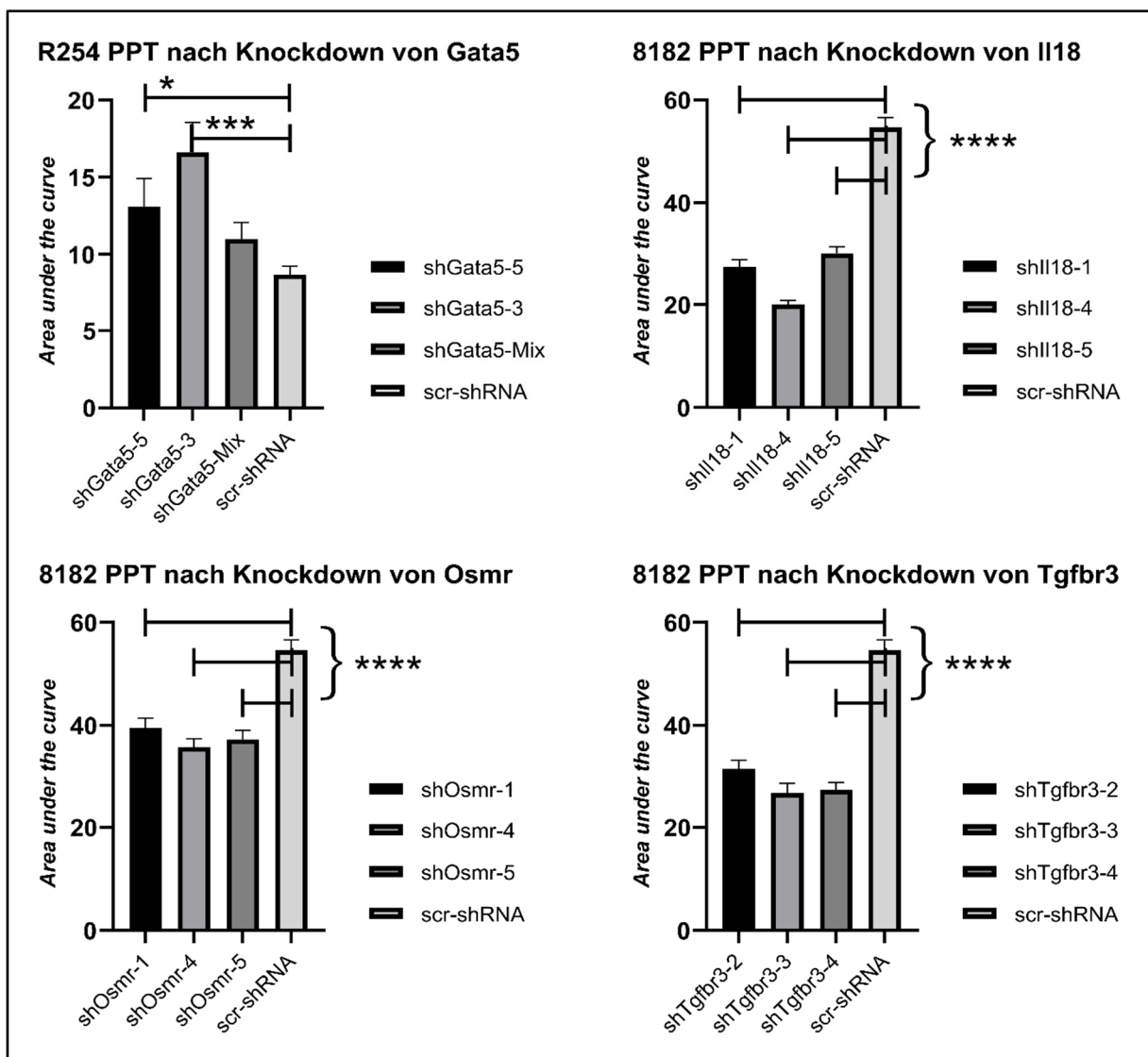


Abbildung 15: Statistische Auswertung des Scratch Assay

Um statistisch signifikante Unterschiede im Scratch Assay zu detektieren, wurde das Integral (*Area under the curve*) der in Abbildung 14 dargestellten Kurven analysiert. Hier zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede sowohl nach Herunterregulation von *Gata5* im Vergleich zur Kontrolle (bei zwei von drei shRNAs) als auch nach Herunterregulation von *Il18*, *Osmr*, und *Tgfr3* (hier bei jeweils allen drei shRNAs). *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. Nach Bonferroni-Korrektur erreichte *shGata5-5* knapp nicht mehr das Signifikanzniveau ($p_{adj}(shGata5-5) = 0,0675$).

einem spezifischen Effekt der Gensuppression auszugehen, hier im Sinne einer Verstärkung der Migrationsfähigkeit durch Herunterregulation von *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3*.

4.7 Koloniebildungsfähigkeit der Tumorzellen nach Herunterregulation von *Gata5*, *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen, also die Fähigkeit aus einzelnen Zellen einen größeren Zellverband zu generieren, ist eine Eigenschaft, die Tumorzellen zur

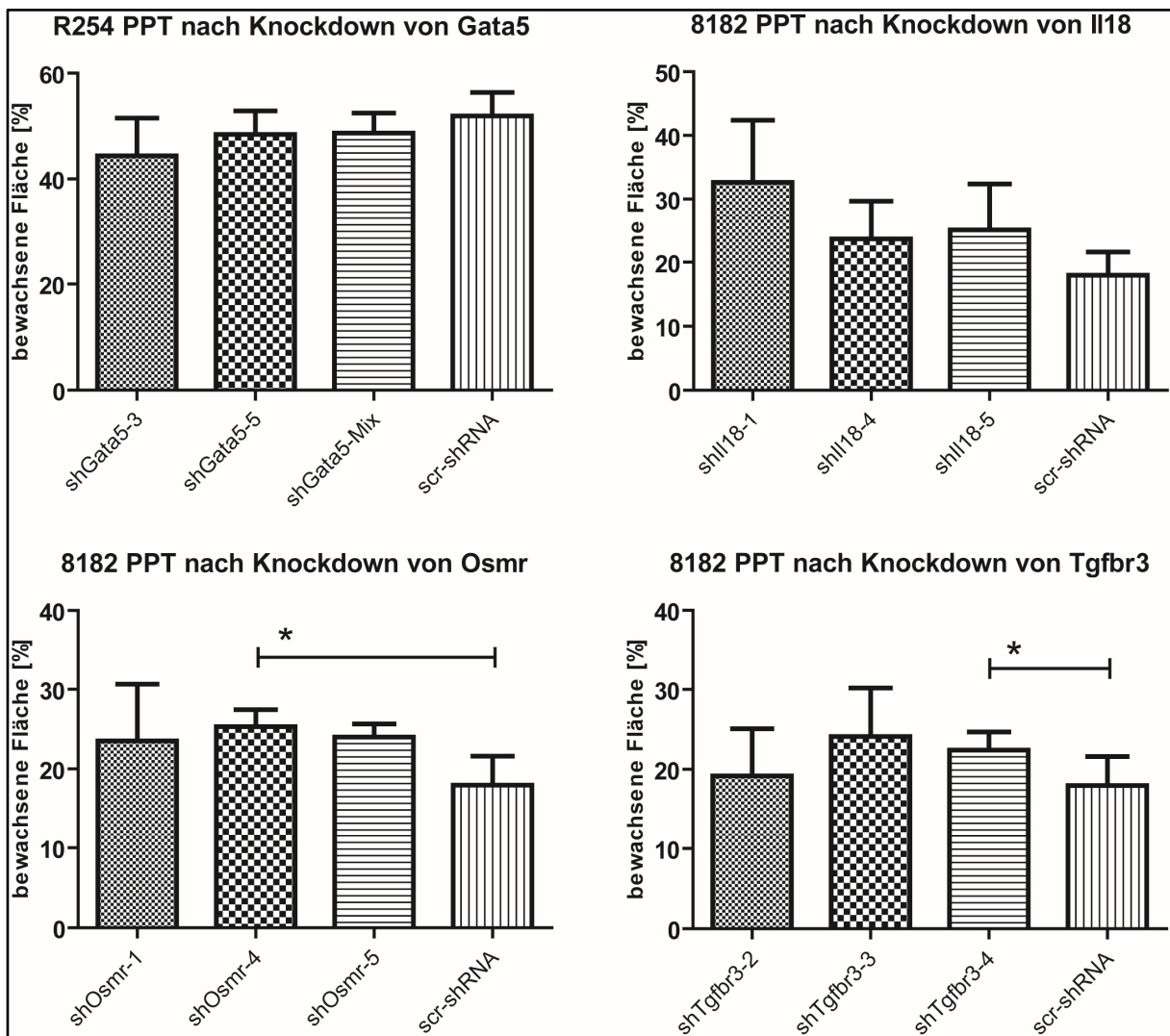


Abbildung 16: Koloniebildung nach Knockdown der Kandidatengene (*Clonogenic Assay*)

Einfluss der Herunterregulation der verschiedenen Kandidatengene auf die Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung. Die Zelllinie 8182 PPT zeigte nach Herunterregulation von *Osmr* (links unten) bzw. *Tgfbr3* (rechts unten) nur bei einzelnen shRNAs (shOsmr-4 bzw. shTgfbr3-4) eine signifikante Verbesserung der Fähigkeit zur Koloniebildung (* $p < 0,05$). Nach Bonferroni-Korrektur erreichte shOsmr-4 weiterhin statistische Signifikanz ($p_{\text{adj}}(\text{shOsmr-4}) = 0,0399$), shTgfbr3-4 hingegen nicht ($p_{\text{adj}}(\text{shTgfbr3-4}) = 0,1275$). Dargestellt ist der zwei Wochen nach Aussaat bewachsene Anteil der Fläche an der Gesamtfläche (ein Loch einer 6-Loch-Platte), jeweils als Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung.

Metastasierung befähigt. Im *Clonogenic Assay* wird diese nachgebildet, indem die Zellen in sehr geringer Menge bzw. Dichte als Einzelzellen ausgesät werden. Zur Koloniebildung fähige Zellen proliferieren dabei dennoch bzw. mehr, was im Verlauf – im Vergleich zu nicht oder weniger fähigen Zellen – zu einer größeren von Zellen bedeckten Fläche führt. In der Zelllinie R254 PPT zeigte sich nach Herunterregulation von *Gata5* tendenziell eine verminderte Koloniebildungsfähigkeit, was aber statistisch nicht signifikant war.

Nach Herunterregulation von *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* in 8182 PPT zeigte sich eine Tendenz zu einer verstärkten Koloniebildungsfähigkeit. Auch hier wurde allerdings das statistische Signifikanzniveau überwiegend nicht erreicht (vgl. Abb. 16). Da nur einzelne shRNAs (shOsmr-4 und shTgfbr3-4, letztere auch nur ohne Bonferroni-Korrektur) zu einer signifikant erhöhten Koloniebildungsfähigkeit führten, sind auch hier – analog zu den Ergebnissen beim *MTT-Assay* (vgl. Abschnitt 4.5) – *off-target*-Effekte möglich, also falsch-positive Phänotypen, die nicht durch den angestrebten Genotyp (i.e. verminderte Expression des Zielgens der shRNA) induziert werden, sondern durch einen unbekanntem, nicht-intendierten Genotyp, der eben nicht durch die verminderte Expression des Zielgens gekennzeichnet ist. Insgesamt lassen sich also keine sicheren, statistisch signifikanten Effekte der Herunterregulation der verschiedenen Kandidatengene auf die Koloniebildungsfähigkeit der Tumorzellen ableiten.

4.8 Verankerungs- und substratunabhängiges Wachstum der Tumorzellen nach Herunterregulation von *Gata5*, *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Zu den Eigenschaften metastasierender Tumorzellen gehört ihre Fähigkeit, auch als primär ortsständige Zellen eine Zeit lang ortsungebunden zu überleben. Dieses verankerungsunabhängige Wachstum bzw. Überleben wird im *Soft Agar Assay* nachempfunden, indem durch Anzucht der Zellen in gelartigem Medium eine Verankerung verhindert wird. Um zu testen, ob die Herunterregulation von *Gata5*, *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* in Tumorzellen einen Einfluss auf diese Eigenschaft hat, wurde mit den mit den unterschiedlichen shRNAs stabil transduzierten Zellen der *Soft Agar Assay* durchgeführt.

Abbildung 17 zeigt als Maß für das verankerungsfreie Wachstum die Anzahl der (sichtbaren) Kolonien der jeweiligen Zellen (Mittelwert aus jeweils drei Ansätzen). Dabei wurden für die Auswertung die Platten eingescannt und die resultierenden Bilder mit der Software ImageJ (Version 1.52a) ausgewertet. Die unterschiedlichen shRNAs

gegen *Il18* und *Osmr* zeigten hier stark uneinheitliche Effekte. Damit ist nicht von einer Auswirkung der Herunterregulation von *Il18* bzw. *Osmr* auf die Fähigkeit von Tumorzellen zu verankerungsfreiem Wachstum auszugehen. Im Fall von *Gata5* und *Tgfb3* war eine einheitlichere Tendenz zu verzeichnen. Durch die Herunterregulation von *Gata5* in R254 PPT mittels shGata5-5 und shGata5-Mix zeigten sich statistisch

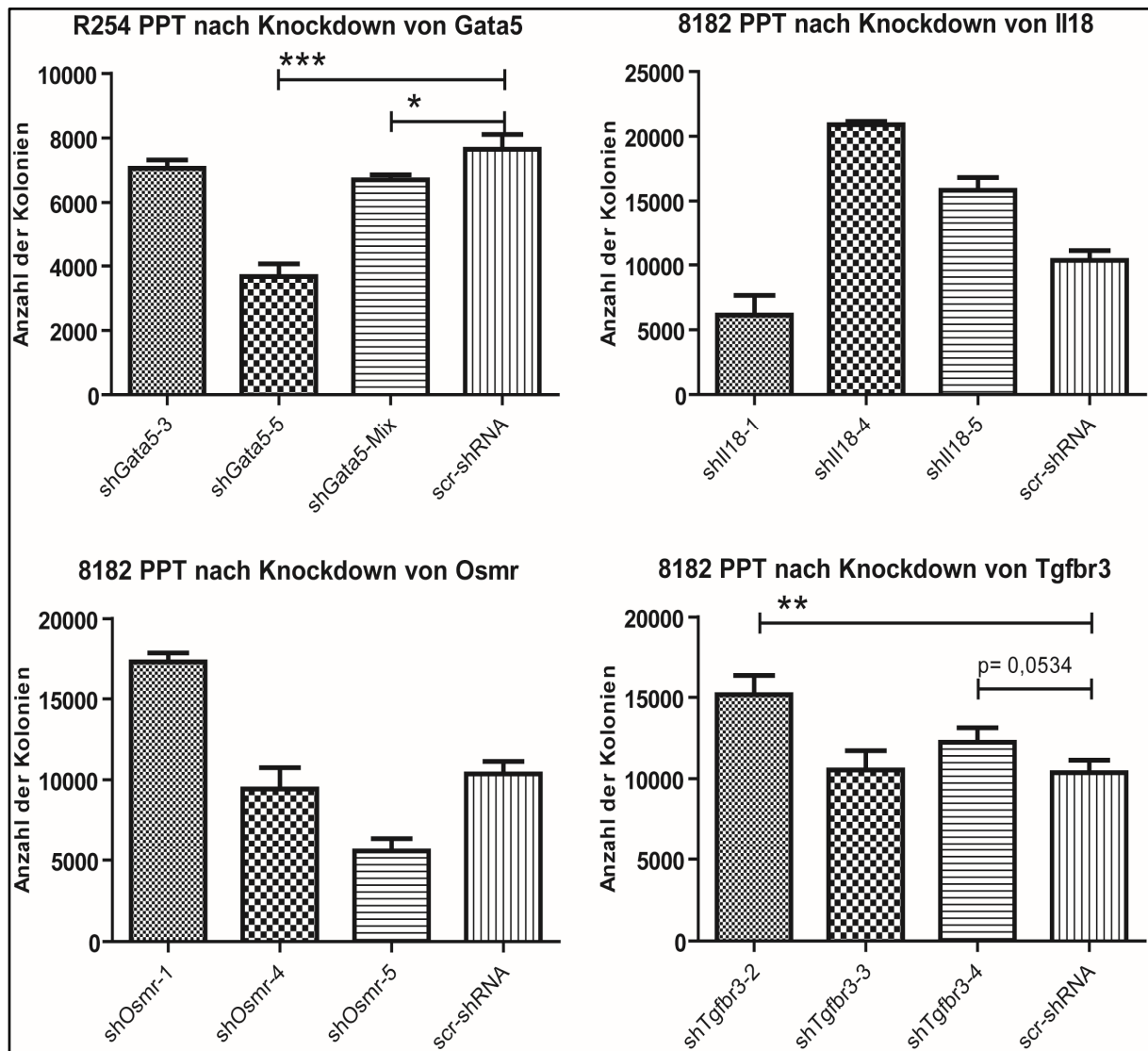


Abbildung 17: Verankerungs- und substratunabhängiges Wachstum nach Knockdown der Kandidatengene (Soft Agar-Assay)

Nach Herunterregulation von *Gata5* mit shGata5-5 und shGata5-Mix in der Zelllinie R254 PPT (links oben) zeigte sich eine signifikant verminderte Fähigkeit zu verankerungs- und substratunabhängigem Wachstum im Vergleich zur Kontrolle (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$), wobei nach Bonferroni-Korrektur shGata5-Mix das statistische Signifikanzniveau verfehlte ($p_{\text{adj}}(\text{shGata5-Mix}) = 0,0819$).

Nach Herunterregulation von *Tgfb3* mit shTgfb3-2 und grenzwertig mit shTgfb3-4 in der Zelllinie 8182 PPT (rechts unten) zeigte sich eine signifikant verminderte Fähigkeit zu verankerungs- und substratunabhängigem Wachstum (** $p < 0,01$). $P_{\text{adj}}(\text{Tgfb3-2}) = 0,0126$.

Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Kolonien (Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Durchgängen).

signifikante Effekte auf das verankerungsunabhängige Wachstum der Zellen, im Sinne eines verminderten Wachstums im Vergleich zu Kontrolle. Aufgrund der Reproduzierbarkeit dieses Effekts durch zwei unterschiedliche shRNAs ist hier auch nicht von einem *off-target*-Effekt, sondern einer echten Auswirkung der verminderten Genexpression auszugehen, wobei nach Bonferroni-Korrektur shGata5-Mix das statistische (knapp) Signifikanzniveau verfehlte ($p_{\text{adj}}(\text{shGata5-Mix}) = 0,0819$). Im Falle der Herunterregulation von *Tgfbr3* in 8182 PPT zeigte sich nur bei einer shRNA (shTgfbr3-2) ein statistisch signifikanter Effekt, sodass hier formal keine Verstärkung des verankerungs- und substratfreien Wachstums durch verminderte Genexpression von *Tgfbr3* anzunehmen ist, sondern erneut ein *off-target*-Effekt möglich ist. Allerdings verfehlte eine zweite shRNA (shTgfbr3-4) mit einem p-Wert von 0,0534 das Signifikanzniveau von $<0,05$ nur knapp (ohne Bonferroni-Korrektur).

4.9 In-vivo Analyse des Tumorwachstums und der Metastasierung nach Herunterregulation von *Gata5*, *IL18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Während in den unterschiedlichen zellbasierten Assays (Abschnitt 4.5 bis 4.8) einzelne Schritte der Metastasierung nachvollzogen und der Einfluss der Herunterregulation der Kandidatengene auf diese Schritte untersucht wurden, wurde mittels eines Allograftmodells der Gesamtprozess des Tumorwachstums und der Metastasierung untersucht. Dazu wurden die mit den verschiedenen shRNAs stabil transduzierten Zellen orthotop in das Pankreas immuninkompetenter SCID-Mäuse implantiert. Im Gegensatz zu den zellbasierten Assays wurden hier pro Kandidatengen jeweils nur die mit einer shRNA-stabil transduzierten Zellen verwendet. Basierend auf der Ausprägung der shRNA-vermittelten Herunterregulation der Kandidatengene wurden die Zellen bzw. die shRNA mit dem stärksten Effekt ausgewählt. Dies waren shGata5-5, shIL18-5, shOsmr-5 und shTgfbr3-2.

Zur Analyse des Wachstum- und Metastasierungsverhaltens wurde die Überlebenszeit nach orthotoper Implantation und die Anzahl makroskopisch sichtbarer Metastasen bei letztllicher Sektion ausgewertet. Zusätzlich erfolgte zwei Wochen nach erfolgter Implantation und bei der Sektion eine Biolumineszenzbildgebung.

4.9.1 Überleben nach orthotoper Implantation von Tumorzellen mit Herunterregulation von *Gata5*, *IL18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Nach erfolgter orthotoper Implantation der unterschiedlich modifizierten Tumorzellen (Knockdown der Kandidatengene) wurden die Tiere täglich hinsichtlich

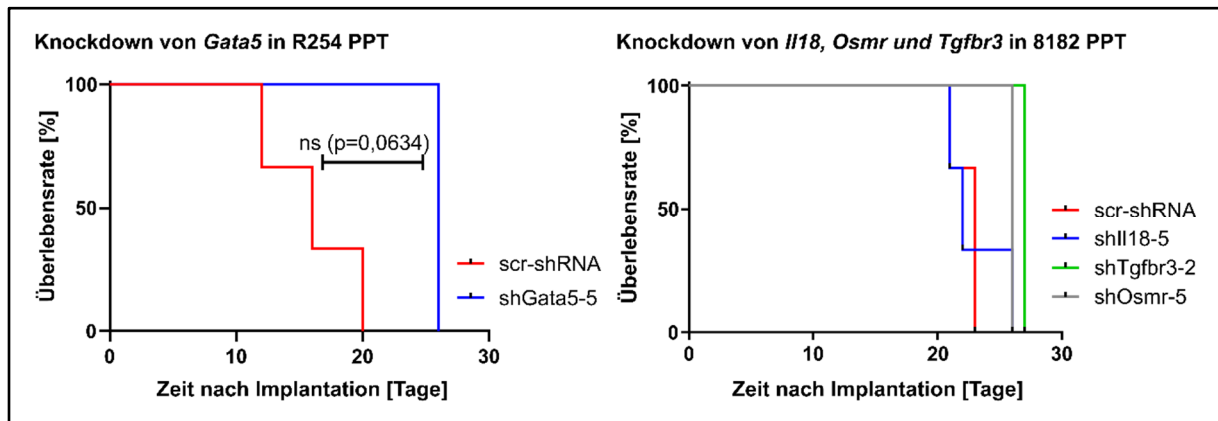


Abbildung 18: Überlebenszeit nach orthotoper Implantation

Überlebenszeit bzw. Überlebensrate nach orthotoper Implantation der Tumorzellen mit Herunterregulation der Kandidatengene im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Kaplan-Meier-Kurven). Die Unterschiede des Überlebens nach Implantation von Tumorzellen mit herunterreguliertem *Gata5* im Vergleich zur Kontrolle waren knapp nicht signifikant (Log-Rank-Test). In der multivariablen Analyse (Cox-Regression) für implantierte 8182 PPT-Zellen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. (pro Gruppe jeweils n=3)

Allgemeinzustand, Gewicht und makroskopisch sichtbarem Tumorwachstum überwacht.

Trotz einer in der Überlebenskurve nachvollziehbaren Tendenz hin zu einem längeren Überleben nach Implantation von Tumorzellen (Zelllinie R254 PPT) mit herunterreguliertem *Gata5* im Vergleich zur Kontrolle, war dies statistisch knapp nicht signifikant (Log-Rank-Test, siehe Abbildung 18 links).

In der multivariablen Analyse für die Zelllinie 8182 PPT für den Vergleich der Überlebenszeit nach Implantation der Kontrollzellen bzw. der Zellen nach jeweiliger Herunterregulation des Kandidatengens (*Il18*, *Tgfbr3*, *Osmr*) fand sich in keiner der Gruppen eine statistisch signifikant längere oder kürzere Überlebenszeit im Vergleich zu den anderen (Cox-Regression, siehe Abbildung 18 rechts). Im jeweiligen

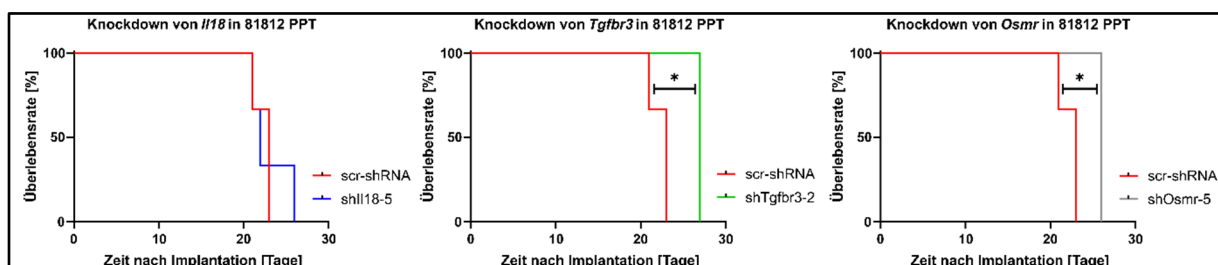


Abbildung 19: Überlebenskurven nach orthotoper Implantation (Einzelanalyse)

Überlebenszeit bzw. Überlebensrate nach orthotoper Implantation von 8182 PPT mit Herunterregulation der Kandidatengene jeweils im Einzelvergleich zur Kontrolle. In der Einzelanalyse (Log-Rank-Test) war die Überlebenszeit der Mäuse nach orthotoper Implantation von 8182 PPT-Zellen mit Knockdown von *Tgfbr3* (mittig) und *Osmr* (rechts) jeweils signifikant verlängert im Vergleich zur Kontrollgruppe (p=0,03)

Einzelvergleich (Log-Rank-Test, siehe Abbildung 19) fand sich für die Zelllinie 8182 PPT eine signifikant verlängerte Überlebenszeit nach orthotoper Implantation für Zellen mit herunterreguliertem *Osmr* und *Tgfbr*, nicht jedoch *Il18*.

4.9.2 Metastasierungsstärke nach orthotoper Implantation von Tumorzellen mit Herunterregulation von *Gata5*, *IL18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Im Rahmen der Sektion wurden folgende Organe entnommen und makroskopisch bezüglich der Anzahl sichtbarer Metastasen ausgewertet: Lunge, Leber, Magen/Darm, Peritoneum. Es erfolgte hier im Rahmen dieser Arbeit eine rein quantitative Gesamtauswertung (Abb. 20). Weder Tumoren der Zelllinie R254 PPT nach Herunterregulation von *Gata5* noch Tumoren der Zelllinie 8182 PPT nach Herunterregulation von *Il18*, *Tgfbr* und *Osmr* zeigten statistisch signifikante Unterschiede in der Gesamtanzahl der makroskopisch sichtbaren Metastasen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

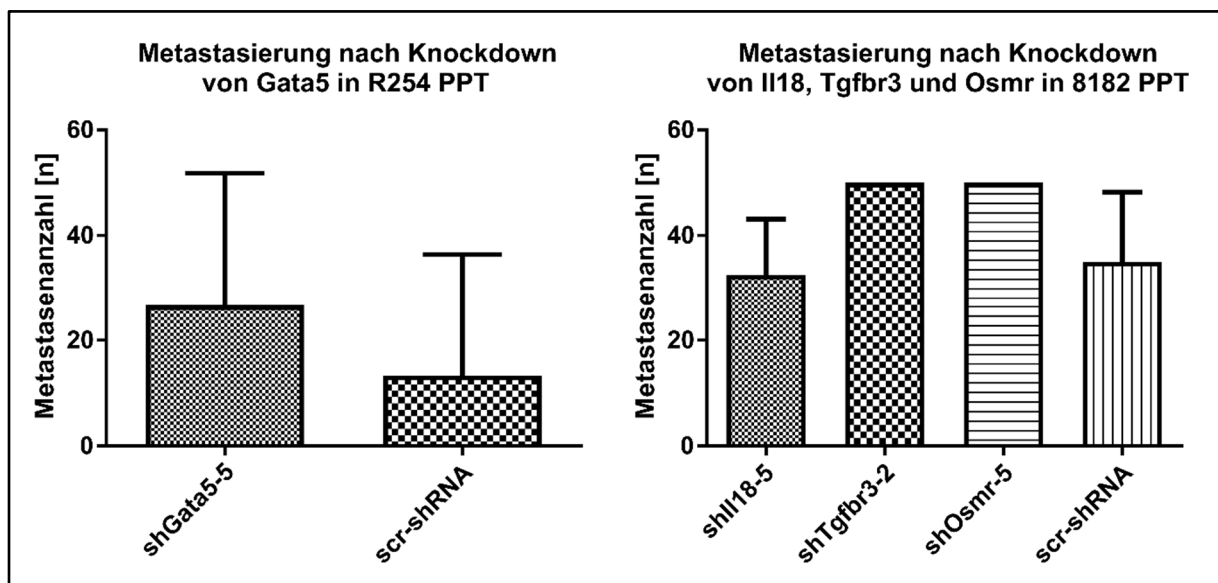


Abbildung 20: Metastasierung nach Knockdown der Kandidatengene

Anzahl der bei Sektion makroskopisch sichtbaren Metastasen nach orthotoper Implantation von R254 PPT (links) bzw. 8182 PPT (rechts) mit Knockdown der Kandidatengene. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung (n=3). Signifikante Unterschiede zeigten sich nicht.

4.9.3 Biolumineszenzbildgebung nach orthotoper Implantation von Tumorzellen mit Herunterregulation von *Gata5*, *IL18*, *Osmr* und *Tgfbr3*

Zwei Wochen nach erfolgter orthotoper Implantation erfolgte eine erste Biolumineszenzbildgebung in vivo. Dies war ein Zeitpunkt, zu dem bei allen Mäusen bereits ein Tumor sicht- und/oder tastbar war. Abbildung 21 zeigt den Vergleich der

Mäuse, denen R254 PPT-Zellen mit herunterreguliertem *Gata5* implantiert worden waren, mit Mäusen, denen nicht-modifizierte (bzw. mit *scrambled* shRNA transduzierte) R254 PPT-Zellen implantiert worden waren. Weder makroskopisch noch im Rahmen der Biolumineszenzbildgebung waren hier klare Unterschiede zwischen beiden Gruppen festzustellen. Im weiteren Verlauf nach Implantation zeigte sich jedoch die Fortführung einer Tendenz, die bereits durch das sehr frühe Versterben einer R254 PPT-scr-shRNA-Maus (12 Tage nach Implantation) angedeutet worden war, nämlich eines verstärkten und schnelleren Tumorwachstums in den Kontrollen im Vergleich zu den Tumoren mit herunterreguliertem *Gata5* (siehe Abbildung 22).

Auch bei den Mäusen, denen Zellen der Zelllinie 8182 PPT mit Herunterregulation jeweils eines der Kandidatengene *I118*, *Tgfbf3* und *Osmr* implantiert worden waren, zeigten sich zwei Wochen nach Implantation keine eindeutigen, weder makroskopisch noch mit der Biolumineszenzbildgebung detektierbaren Unterschiede hinsichtlich der

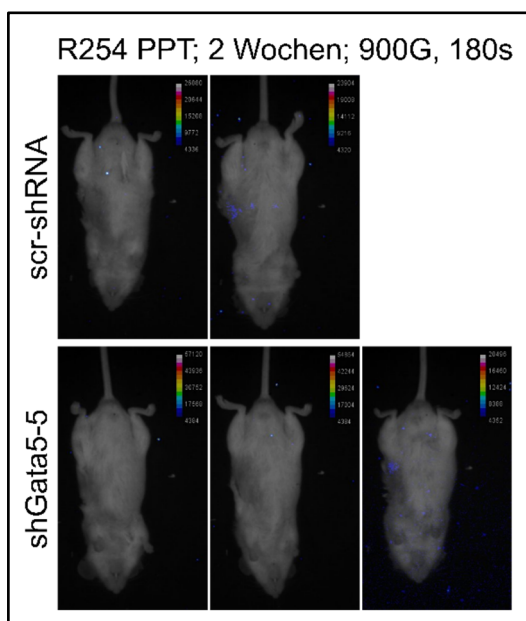


Abbildung 21: Biolumineszenzbildgebung nach Knockdown von *Gata5*

Die erste Biolumineszenzmessung 2 Wochen nach orthotoper Implantation von R254-PPT-Zellen mit (unten) und ohne (oben) Knockdown von *Gata5* wies in allen Mäusen allenfalls kleine Tumoren nach. Unterschiede zwischen den Tumoren mit und ohne *Gata5*-Knockdown konnten nicht detektiert werden.

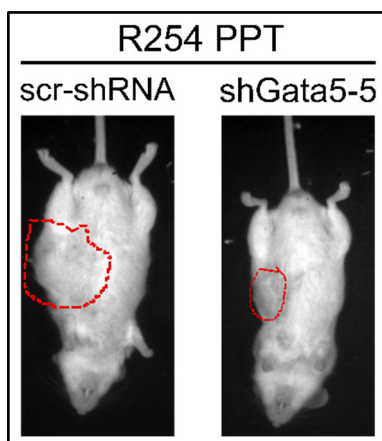


Abbildung 22: Tumorgöße zum Zeitpunkt der Sektion (Hellfeldbilder)

Beispielhaft dargestellt ist hier der makroskopisch sichtbare bzw. tastbare Tumor (rote Linie als grober Umriss) einer Maus, der die Kontrollzellen (scr-shRNA, links) implantiert worden waren, im Vergleich zu einer Maus, der die Zellen mit herunterreguliertem *Gata5* (shGata5-5) implantiert worden waren. Obwohl zu einem späteren Zeitpunkt nach Implantation (nach 26 versus nach 20 Tagen) war die Tumoren aus Kontrollzellen deutlich größer bzw. wuchsen schneller als Tumoren mit verminderter *Gata5*-Expression.

Größe des Primärtumors. Weder zu diesem Zeitpunkt (zwei Wochen nach Implantation) noch zum Zeitpunkt der Sektion konnten Metastasen mittels der Biolumineszenzbildgebung *in vivo* detektiert werden. Bezüglich des frühen Zeitpunkts bleibt offen, ob zu diesem Zeitpunkt tatsächlich noch keine Metastasen vorhanden waren oder ob eventuell vorhandene Metastasen zu klein waren, und damit ein zu schwaches, nicht detektierbares Biolumineszenzsignal lieferten (siehe Abbildung 23). Zum Zeitpunkt der Sektion vermochte die Biolumineszenzbildgebung unmittelbar vor Tötung der Tiere nicht, spezifische Metastasen *in vivo* nachzuweisen, vor allem aufgrund von Überstrahlung durch den Primärtumor. Die Bildgebung der explantierten Organe unmittelbar im Anschluss daran und auch die makroskopische Auszählung wiesen jedoch einen – zum Teil – hohen Metastasierungsstatus nach (vgl. auch Abbildung 20: makroskopisch sichtbare Metastasen).

Obwohl sich bezüglich der rein quantitativen Auswertung der makroskopisch sichtbaren Metastasen insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten (vgl. Abbildung 20), fand sich in der Biolumineszenzbildgebung der explantierten Organe sich eine ausgeprägte pulmonale Metastasierung durch Zellen mit herunterreguliertem *Tgfb β 3*, was so bei keiner der anderen Gruppen zu sehen war (siehe Abbildung 24).

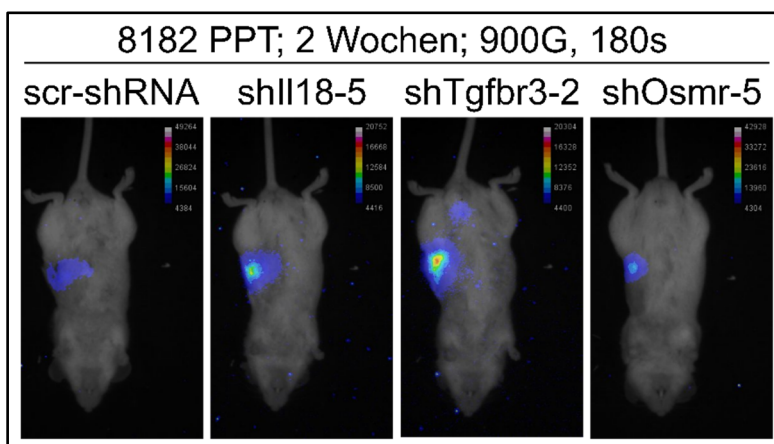


Abbildung 23: Biolumineszenzbildgebung zwei Wochen nach Implantation

Beispielhaft dargestellt ist jeweils ein Tier nach Implantation der Zellen mit Herunterregulation der unterschiedlichen Kandidatengene bzw. der Kontrollzellen. Eindeutige Unterschiede in der Primärtumorgröße fanden sich nicht. Metastasen waren *in vivo* nicht zu detektieren.

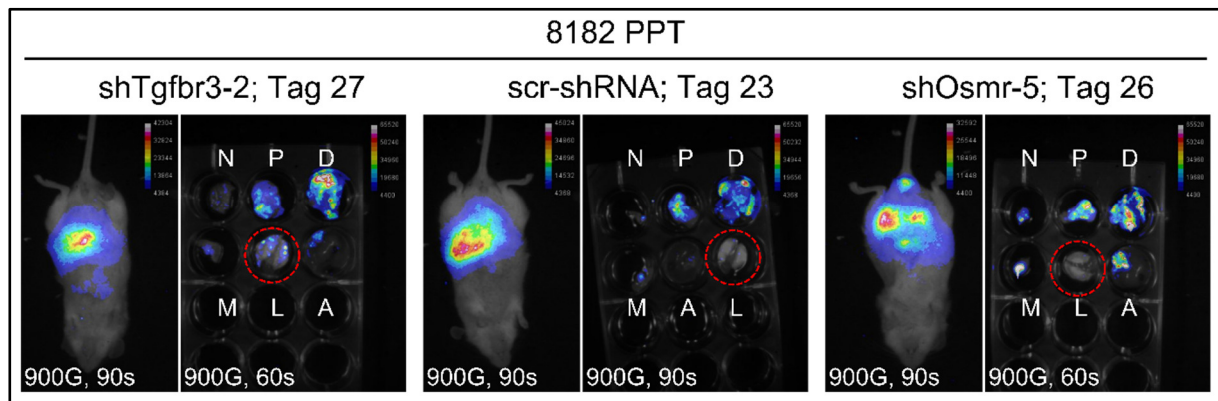


Abbildung 24: Biolumineszenzbildgebung in vivo und ex vivo bei Sektion nach Knockdown von *Tgfr3* und *Osmr*

Bei vergleichbarer Primärtumorgröße fand sich nach orthotoper Implantation von 8182 PPT-Zellen mit *Tgfr3*-Knockdown (links) eine ausgeprägte pulmonale Metastasierung (roter Kreis). Dies war in keiner der anderen Gruppen vorhanden (exemplarisch dargestellt ist eine Kontrollmaus, der 8182 PPT-Zellen ohne Knockdown implantiert worden waren (mittig), und eine Maus, der 8182 PPT-Zellen mit Knockdown von *Osmr* implantiert worden waren (rechts).

Entnommene Organe waren Lunge (L), Magen (M), Darm+Leber (D), Pankreas (i.e. Primärtumor; P), Nieren (N), sowie Aszites (A).

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Kandidatengene der Metastasierung im Pankreaskarzinom funktionell zu validieren. Dies erfolgte durch shRNA-vermittelte Herunterregulation der Kandidatengene und anschließende Untersuchung der Effekte auf in vitro nachgebildete Einzelschritte der Metastasierung sowie auf den Gesamtprozess von Tumorwachstum und Metastasierung in einem in vivo-Implantationsmodell. Verwandt wurden in allen Untersuchungen zwei verschiedene Zelllinien von primären Pankreastumoren von Mäusen eines endogenen Pankreaskarzinom-Mausmodells. Dieser Arbeit vorangegangen und ihre Grundlage bildend, war dabei zum einen die Analyse des Metastasierungsverhaltens sowohl des ursprünglichen Primärtumors als auch der daraus etablierten Zelllinien, zum anderen Genexpressionsanalysen verschieden stark metastasierender muriner Pankreaskarzinomzelllinien. Hier hatte die eine Zelllinie (R254 PPT) eine starke Metastasierung, die andere Zelllinie (8182 PPT) eine schwache Metastasierung gezeigt. In den Genexpressionsanalysen war *Gata5* eines der Gene, deren Expression eine positive Korrelation mit Metastasierung gezeigt hatte. *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* gehörten dagegen zur Gruppe der Gene, deren Expression mit einer fehlenden bis schwachen Metastasierung assoziiert war. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte für diese Arbeit der Knockdown von *Gata5* in der stark metastasierenden Zelllinie R 254 PPT und der Knockdown von *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* in der schwach metastasierenden Zelllinie 8182 PPT. Arbeitshypothese war also, dass der Knockdown von *Gata5* zu einer verminderten Metastasierungsfähigkeit führt, der Knockdown von *Il18*, *Osmr* und *Tgfbr3* dagegen zu einer vermehrten Metastasierungsfähigkeit.

Tabelle 30 zeigt in einer synoptischen Form die Ergebnisse bzw. Effekte des Knockdowns der verschiedenen Kandidatengene (vgl. auch Abschnitt 4.5 bis 4.9).

Der Knockdown von *Gata5* führte in vitro (tendenziell) zu einer verminderten Migrationsfähigkeit sowie zu einer verringerten Fähigkeit zu verankerungs- und substratunabhängigem Wachstum. In vivo zeigte sich im Implantationsmodell eine (statistisch knapp nicht signifikante) Tendenz zu verlängertem Überleben bei Knockdown von *Gata5* sowie sehr große Tumoren in den Kontrollen im Vergleich zu den Tumoren mit Knockdown von *Gata5*.

Tabelle 28: Synopsis der Ergebnisse

Modell	Untersuchter Mechanismus	Effekt des Knockdowns des Kandidatengens			
		Gata5	Il18	Osmr	Tgfb3
In vitro	Proliferation	negativ	negativ*	negativ*	negativ
	Migration	positiv ^{BK} : ▼	positiv: ▲	positiv: ▲	positiv: ▲
	Koloniebildung	negativ	negativ	negativ*	negativ*
	Verankerungsfreies Wachstum	positiv ^{BK} : ▼	negativ	negativ	negativ**
In vivo*	Überleben	negativ**	negativ	positiv: ▲	positiv: ▲
	Metastasierung	negativ	negativ	negativ	negativ
	BLI	rasches und starkes Tumorwachstum in der Kontrolle	negativ	negativ	starke pulmonale Metastasierung

negativ: kein signifikanter Effekt des jeweiligen Knockdowns auf den untersuchten Mechanismus.
 positiv: statistisch signifikanter Effekt des jeweiligen Knockdowns auf den untersuchten Mechanismus in mindestens zwei shRNAs (in vitro). ▼: Verminderung/Hemmung. ▲: Verstärkung. *: statistisch signifikanter Effekt nur in einer shRNA, nicht reproduzierbar in zweiter shRNA (in vitro) bzw. nur in einer shRNA untersucht (in vivo), damit a.e. *off-target*-Effekt. **: Signifikanzniveau knapp verfehlt. ^{BK}: nach Bonferroni-Korrektur nur noch in einer shRNA statistisch signifikanter Effekt, allerdings verfehlte die adjustierten p-Werte nur knapp das Signifikanzniveau, damit aber *off-target*-Effekt möglich.

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse also die Hypothese einer verminderten Metastasierungsfähigkeit nach Knockdown von *Gata5*. Damit widersprechen diese Daten den von Peters et al. beschriebenen Effekten einer Hypermethylierung der *Gata5* CpG-Insel beim Nierenzellkarzinom, die statistisch unter anderem mit einer stärkeren Metastasierung assoziiert war (Peters et al. 2012). Auch die Arbeiten von Hellebrekers für das kolorektale Karzinom hatten auf einen gegenteiligen, nämlich tumor- bzw. metastasierungssuppressiven Effekt von *Gata5* hingedeutet (Hellebrekers et al. 2009). Eine neuere Arbeit von Roe et al. hatte jedoch – in umgekehrter Weise, nämlich mittels Effektanalyse einer *Gata5*-Überexpression – gezeigt, dass in murinen

Pankreaskarzinomzellen (einer *Kras*^{+/*LSL-G12D*}; *Trp53*^{+/*LSL-R172H*}; *Pdx1-Cre* – Maus) eine Überexpression von *Gata5* zu verstärkter Invasivität, Koloniebildung und pulmonaler Metastasierung führte (Roe et al. 2017). Somit ergibt sich die Frage, ob die Einschätzung von *Gata5* als Tumorsuppressor oder aber als protumorigener bzw. metastasierungsfördernder Faktor abhängig ist von der Tumorentität. Anhand unserer Daten sowie der von Roe et al. wäre – zumindest für das Pankreaskarzinom – eine weitere Evaluation der Hemmung von *Gata5* als mögliches Therapiekonzept naheliegend.

Der Knockdown von *Il18* zeigte insgesamt kaum eindeutige Effekte oder signifikante Ergebnisse, vielmehr waren durch die unterschiedlichen shRNAs teils uneinheitliche Ergebnisse zu verzeichnen, ein Befund, der mit einem klaren, auf der verminderten Genexpression von *Il18* basierenden Mechanismus auf molekularer Ebene nicht gut zu erklären ist. Vielmehr sind hier von *Il18* vollkommen unabhängige *off-target*-Effekte zu diskutieren, welche sich – zumindest der im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen – nicht genauer eingrenzen lassen.

Der Knockdown von sowohl *Osmr* als auch *Tgfbr3* führte zu einer verstärkten Migrationsfähigkeit der Zellen. Bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit zeigte in beiden Fällen jeweils nur eine shRNA statistisch signifikante Ergebnisse, damit sind diese Effekte – zumindest anhand der hier vorgestellten Daten – nicht sicher auf tatsächliche Resultate des jeweiligen Knockdowns zurückzuführen, sondern stets auch mit einem möglichen *off-target*-Effekt zu erklären. Bei nur knapp verfehltem Signifikanzniveau der zweiten shRNA gegen *Tgfbr3* in der Analyse des verankerungs- und substratunabhängigen Wachstums sind hier eine Tendenz zu einer Verbesserung des verankerungsfreien Wachstums durch Knockdown von *Tgfbr3* zumindest vorstellbar, und damit weitere Untersuchungen sinnvoll erscheinend.

Den oben genannten in vitro-Ergebnissen eher widersprechend zeigte sich im in vivo-Modell ein gering verlängertes Überleben nach Knockdown von *Osmr* und *Tgfbr3*, das aber jeweils nur in der Einzelanalyse statistische Signifikanz erreichte. Wiederum besser passend zu den in vitro-Daten fiel im Fall von *Tgfbr3* eine ausgeprägte, und insbesondere nur hier auftretende, pulmonale Metastasierung auf. Letztlich muss aber bei allen in vivo-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die alternative Möglichkeit eines *off-target*-Effekts diskutiert werden, da für alle Kandidatengene in vivo mit nur jeweils einer shRNA transduzierte Zellen eingesetzt wurden.

Zusammengefasst lassen sich jedoch die signifikanten Ergebnisse des Knockdowns von *Osmr* und *Tgfbr3* in Einklang bringen mit der Hypothese, dass eine Herunterregulation dieser Gene zu einer verstärkten Metastasierungsfähigkeit führt. Zu dieser Hypothese würde die ausgeprägte pulmonale Metastasierung nach Knockdown von *Tgfbr3* zumindest passen, auch wenn dieser Befund die Hypothese formal nicht statistisch untermauern kann.

Damit passen diese Ergebnisse zu den Methylierungsuntersuchungen von unter anderem Kim et al. und Deng et al., die unter anderem im kolorektalen, Magen- und Pankreaskarzinom eine Hypermethylierung und damit Stilllegung von *OSMR* beschrieben hatten (Deng et al. 2009; Kim et al. 2009), in anderen Karzinomen, wie Leber-, Mamma- und Nierenzellkarzinom, war dagegen keine erhöhte Methylierungsrate zu beobachten (Deng et al. 2009), ein Befund der auch hier – ähnlich zu *Gata5* – einen tumorentitätsspezifischen Effekt bzw. Mechanismus nahelegt. Dazu passt der von Savarese et al. postulierte autokrine Signalweg über OSM und seine Rezeptoren zur Auto-Induktion beim Ovarialkarzinom (Savarese et al. 2002) als auch die Überexpression beim Zervixkarzinom (Ng et al. 2007). Auch für das Mammakarzinom existieren Daten, die – im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen für das Pankreaskarzinom – eine Funktion von OSM (als Ligand von OSMR) als protumorigener bzw. metastasierungsfördernder Faktor stützen (Tawara et al. 2018). Die unterschiedlichen Effekte bzw. Expressionsmuster von OSM/OSMR allein auf unterschiedliche Tumorentitäten zurückzuführen, gelingt allerdings auch nicht, denn auch für das Magenkarzinom beschrieben Yu et al. einen protumorigenen Effekt. Herunterregulation bzw. Stilllegung der *OSMR*-Expression führte hier zu einer verminderten Zellproliferation, -migration, -invasivität und EMT (Yu et al. 2019). Insgesamt scheinen die Rolle von *Osmr* in der Tumorigenese und Metastasierung noch nicht eindeutig geklärt und weitere differenziertere Untersuchungen nötig zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass der Knockdown von *Tgfbr3* zu einer Verstärkung der Metastasierungsfähigkeit beim Pankreaskarzinom führt, passen zu den Daten von Gordon et al.: Diese konnten zeigen, dass der shRNA-vermittelte Verlust von *TGFBR3* in der humanen PDAC-Zelllinie PANC-1 zu einer Erhöhung der Motilität und Invasivität führte. In darüberhinausgehenden Untersuchungen konnte - obwohl Invasivität und Motilität neben einer veränderten Zellmorphologie und Verlust der Zell-Zell-Verbindungen ebenfalls mit EMT assoziierte Vorgänge sind – die Herunterregulation von *TGFBR3* alleine jedoch keine EMT

induzieren. Sowohl in der immunhistochemischen Analyse als auch in der Genexpressionsanalyse mehrerer humaner Pankreaskarzinomproben konnte ebenfalls eine Verminderung von TGFBR3 detektiert werden (Gordon et al. 2008), ein Befund, der sich auch für andere Tumorentitäten fand (Dong et al. 2007; Finger et al. 2008). Mit dieser Korrelation zwischen humanen und murinen Daten erscheint die weitere und noch exaktere funktionelle Validierung von *Tgfbr3*, insbesondere auch in vivo sinnvoll; nicht nur, da die in vivo-Ergebnisse dieser Arbeit uneindeutiger waren als die in vitro-Analysen und aufgrund der Evaluation nur einer shRNA auch gänzlich von *Tgfbr3*-unabhängige Mechanismen (*off-target*-Effekte) denkbar sind, sondern auch, da Gordon et al. TGFBR3, auch in seiner löslichen Form, mit ihren Ergebnissen als mögliches therapeutisches Werkzeug vorschlugen (Gordon et al. 2008). Als erster, an diese Arbeit anschließender Schritt scheint deshalb die in vivo-Evaluation weiterer (in vitro Effekte zeigender) shRNAs naheliegend.

Zweites Ziel dieser Arbeit war die Generierung der sogenannten LSL-*Tgfb1*-Maus. Durch Einbringen der *Tgfb1*-cDNA-Sequenz in das Mausgenom mit vorgeschalteter LoxP-Stop-Lox-Kassette wird eine zeit- und ortsspezifische Überexpression von *Tgfb1* und damit die Untersuchung des *Tgfb*-Signalwegs ermöglicht. Dabei besteht natürlich keine Beschränkung auf das Pankreaskarzinom, da in Kombination mit den entsprechenden Mausmodellen letztlich eine Analyse in den unterschiedlichsten Krankheitsentitäten möglich ist. Die Ort- und Zeitspezifität wird dadurch erreicht, dass es nur dort und dann zu einer *Tgfb1*-Überexpression kommt, wo bzw. wenn die Cre-Rekombinase die vorgeschaltete, von zwei LoxP-Stellen flankierte Stopkassette entfernt (Sauer und Henderson 1988). Damit muss also letztlich die Cre-Rekombinase zeit- und ortsspezifisch exprimiert werden, was über spezifische Promotoren erreicht wird. Zur pankreasspezifischen Expression der Cre-Rekombinase (und hier damit pankreasspezifischen Überexpression von *Tgfb1*) werden überwiegend der *Pdx1*-sowie der *Ptf1a*-Promotor genutzt. Für eine zeitspezifische Expression wird die Cre-Rekombinase an einen modifizierten Östrogenrezeptor gekoppelt (Cre-ER^T). Dieser modifizierte Rezeptor wird durch Tamoxifen, aber nicht durch Östrogen aktiviert. Die Gabe von Tamoxifen zu einem spezifischen Zeitpunkt führt dann zur Expression der Cre-Rekombinase und damit zur einer Expression der *Tgfb1*-Kassette zu dem gewählten Zeitpunkt (Metzger und Chambon 2001). Mit seiner dualen, im Verlauf der Kanzerogenese wechselnden Rolle von Tumorsuppressor zu protumorigenem Faktor

ist *Tgfb1* ein höchst interessanter Kandidat insbesondere für die zeitspezifische Überexpression innerhalb des Prozesses der Tumorigenese und Metastasierung. Den gegenteiligen Weg zur Untersuchung des Signalwegs ermöglichten Chytil et al. durch Generierung einer konditionalen *Tgfb2*-Knockout-Maus (*Tgfb2^{flox/flox}*) (Chytil et al. 2002). Ijichi et al. kreuzten diese konditionale *Tgfb2*-Knockout-Maus mit dem endogenen *Kras^{G12D}*-Expressionsmodell und generierten so Mäuse des Genotyps *Ptf1a^{cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *Tgfb2^{flox/flox}*, die also pankreasspezifisch einerseits onkogenes *Kras* exprimierten, andererseits *Tgfb2* entbehrten. Diese Mäuse entwickelten aggressive Pankreaskarzinome und zeigten ein massiv reduziertes Überleben von im Median nur 59 Tagen. Der alleinige Knockout von *Tgfb2* (ohne die Expression onkongenen *Kras*) führte zu keiner Beeinträchtigung der Pankreasentwicklung und nicht zur Bildung von Pankreaskarzinomen. Auffällig war bei den *Ptf1a^{cre/+}*, *LSL-Kras^{G12D/+}*, *Tgfb2^{flox/flox}*-Mäusen das Fehlen einer nachweisbaren Metastasierung im Alter von 7-10 Wochen, also dem Zeitpunkt, an dem ein Großteil der Mäuse getötet wurde. Die wenigen Mäuse, die länger überlebten, zeigten allerdings eine ausgeprägte Metastasierung, so dass die Autoren davon ausgingen, dass die Tumoren durchaus ein hohes Metastasierungspotential besaßen, aber als Primärtumor bereits so massiv wuchsen, dass dieses Potential nicht mehr zum Tragen kam. Mäuse, die ein Wildtyp-Allel von *Tgfb2* behielten (*Ptf1a^{cre/+}*; *LSL-Kras^{G12D/+}*; *Tgfb2^{flox/+}*) entwickelten ebenfalls, aber im Vergleich zu den Tieren mit komplettem Knockout deutlich langsamer Pankreaskarzinome (Ijichi et al. 2006). Aus der Schlussfolgerung, dass das Level des *Tgfb*-Signalweges eine Determinante der Karzinogenese im Pankreas ist, ergibt sich die – mithilfe der im Rahmen dieser Arbeit generierten *LSL-Tgfb1*-Maus möglicherweise zu beantwortende – Frage, ob mittels Überexpression von *Tgfb1* eine Verhinderung oder zumindest Verlangsamung der Tumorigenese (im frühen Stadium) zu erreichen ist. Diese Hypothese unterstützen auch die Daten der klinischen Assoziationsstudie von Glazer et al.. In deren Untersuchung humaner PDAC-Proben war eine Überexpression von *TGFB1* mit längerem Überleben assoziiert (Glazer et al. 2017). Allerdings wurden hier nur Pankreaskarzinome im frühen Stadium (Stadium I und II) untersucht, so dass durchaus denkbar ist, dass zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorigenese bzw. in einem späteren Tumorstadium eine gegenteilige Assoziation vorliegt, die wiederum passen würde zum beschriebenen Rollenwechsel des *Tgfb*-Signalwegs. Friess et al. hatten bereits 1993 die gegenteilige Assoziation aller drei *TGFB*-Isoformen zusammen, aber

auch einzeln, mit verkürztem Überleben beschrieben; hatten in ihrer Analyse aber auch Pankreaskarzinome aller Stadien (Stadium I bis IV) untersucht, wobei sich zumindest für TGFB2 eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Tumorstadium ergab (Friess et al. 1993). Als möglichen erklärenden molekularen Mechanismus für diese paradoxe bzw. duale Rolle des Tgfb-Signalwegs postulierten Zhang et al. die – neben den Smad2/3-vermittelten, wachstumshemmenden Effekten – nachgewiesenen Angiogenese-induzierenden Effekte (Zhang et al. 2015).

Auf den – zumindest in späteren Stadien – nachgewiesenen protumorigenen Effekten von Tgfb basieren Versuche einer zielgerichteten Therapie mittels Inhibition des Tgfb-Signalweges. Sowohl ein löslicher Tgfr2-Rezeptor (Rowland-Goldsmith et al. 2002) als auch der Tgfr1/2-Inhibitor LY2109761 (Melisi et al. 2008) zeigten eine metastasierungshemmenden Effekt in Xenograft-Studien. Der Idee, dass ein therapeutisches Fenster existiert, in dem eine Inhibition des Tgfb-Signalweges einen positiven Effekt hat, widersprechen die Daten von Hezel et al.. In einem endogenen PDAC-Mausmodell (*Ptf1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{L/+}*) hatte die Blockade des Tgfb-Signalweges (mittels spezifischer Antikörper gegen Integrin β 6 und Tgfb1-3) keinen positiven, sondern sogar einen nachteiligen, die Tumorphase beschleunigenden Effekt, und zwar sowohl im frühen (PanIN-), als auch im späten (PDAC-) Stadium (Hezel et al. 2012). Trotz dieser sehr kritischen Sicht einer therapeutischen Inhibition des Tgfb-Signalweges schaffte es der Tgfr1-Inhibitor Galunisertib, nach vielversprechenden präklinischen Daten, bis in zahlreiche klinische Studien, unter anderem auch für das Pankreaskarzinom (Akinleye et al. 2015; Herberich et al. 2015). Galunisertib, in Kombination mit Gemcitabin, führte in der kürzlich veröffentlichten zweigeteilten (Phase 1b plus Phase 2) Studie tatsächlich zu einer Verbesserung des Überlebens im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabin bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreaskarzinom (Melisi et al. 2018).

Insgesamt schafft die im Rahmen dieser Arbeit generierte LSL-Tgfb1-Maus die Möglichkeit einer genaueren Analyse und damit besseren Verständnisses der Rolle des Tgfb-Signalweges im (unter anderem) Pankreaskarzinom.

6 Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom stellt weiterhin eine der Krebserkrankungen mit der schlechtesten Prognose dar. Dies ist vor allem bedingt durch die späte, erst im fortgeschrittenen, häufig bereits metastasierten Stadium stattfindende Diagnosestellung. Zur Vertiefung des Verständnisses des Metastasierungsprozesses sowie zur Evaluation möglicher therapeutischer Angriffspunkte beim metastasierten duktalem Pankreaskarzinom wurden in dieser Arbeit verschiedene Kandidatengene der Metastasierung funktionell validiert. Dazu erfolgte die shRNA-vermittelte Herunterregulation ausgewählter Kandidatengene und die anschließende funktionelle Validierung der einzelnen Metastasierungsschritte mittels verschiedener zellbasierter Assays *in vitro*. Zudem erfolgte die Evaluierung des Gesamtprozesses der Metastasierung mittels eines orthotopen Implantationsmodells *in vivo*. Die Herunterregulation von *Gata5* führte zu einer Verringerung der Migrationsfähigkeit sowie der Fähigkeit zu verankerungs- und substratunabhängigem Wachstum. Die Herunterregulation von *Osmr* und *Tgfbr3* hatten tendenziell einen gegenteiligen, also protumorigenen bzw. pro-metastatischen Effekt. Zusammenfassend scheinen anhand dieser Daten sowohl *Gata5*, als auch *Osmr* und *Tgfbr* mögliche therapeutische Angriffspunkte beim metastasiertem Pankreaskarzinom, im Sinne einer therapeutischen Suppression/Inhibition bei *Gata5* bzw. therapeutischen Überexpression von *Osmr* und *Tgfbr3*, zu bieten. Kritisch zu sehen sind allerdings die teils widersprüchlichen Ergebnisse, sowohl innerhalb dieser Arbeit als auch in der Literatur. Zudem wurden für *Osmr* und *Tgfbr3* im Rahmen dieser Arbeit nur gegenteilige Effekte gezeigt. Ob also eine Überexpression oder Zufuhr von exogenem *Osmr* und *Tgfbr3* einen positiven, nämlich anti-metastatischen Effekt hat, wurde direkt noch nicht gezeigt.

Um in Zukunft die Rolle des Tgfb-Signalwegs in der Karzinogenese des duktalem Pankreaskarzinoms zu evaluieren, wurde, als ein zweiter Teil dieser Arbeit, die sogenannte LSL-Tgfb1-Maus generiert. In dem für diese Arbeit generierten genetischen Konstrukt ist der Tgfb1-Kassette eine von zwei LoxP-Seiten flankierte Stop-Kassette vorgeschaltet (LSL). Damit wird durch Kombination mit einer gewebe- oder auch zeitspezifisch exprimierten Cre-Rekombinase eine gewebe- oder zeitspezifische Überexpression von *Tgfb1* erreicht. Durch homologe Rekombination wurde das genetische Konstrukt in den murinen Rosa26-Locus integriert, die

Transfektion der murinen embryonalen Stammzellen erfolgte mittels Elektroporation. Anschließend wurde mittels Geneticin-Selektion Zellen mit erfolgreicher Integration selektioniert und die komplette Integration durch verschiedene PCRs verifiziert. Die anschließende Blastozysteninjektion und Generierung chimärer Mäuse wurde von der Firma Polygene AG (Schweiz) durchgeführt. Mit den ersten Nachkommen der Chimären erfolgte die Etablierung einer PCR zum Nachweis des LSL-Tgfb1-Knockins. In Zukunft soll diese neu generierte Mauslinie dazu dienen die Rolle des Tgfb-Signalwegs in der Tumorigenese und insbesondere der Metastasierung des duktales Pankreaskarzinoms genauer zu untersuchen, und diesen als möglichen therapeutischen Angriffspunkt zu evaluieren.

7 Literaturverzeichnis

- Aguirre, AJ; Bardeesy, N; Sinha, M; Lopez, L; Tuveson, DA; Horner, J; Redston, MS; Depinho, RA (2003): Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* 17 (24), S. 3112–3126. DOI: 10.1101/gad.1158703.
- Akinleye, A; Iragavarapu, C; Furqan, M; Cang, S; Liu, D (2015): Novel agents for advanced pancreatic cancer. *Oncotarget* 6 (37), S. 39521–39537. DOI: 10.18632/oncotarget.3999.
- Akiyama, Y; Watkins, N; Suzuki, H; Jair, K-W; van Engeland, M; Esteller, M; Sakai, H; Ren, C-Y; Yuasa, Y; Herman, JG; Baylin, SB (2003): GATA-4 and GATA-5 Transcription Factor Genes and Potential Downstream Antitumor Target Genes Are Epigenetically Silenced in Colorectal and Gastric Cancer. *Mol. Cell. Biol.* 23 (23), S. 8429–8439. DOI: 10.1128/MCB.23.23.8429-8439.2003.
- Bardeesy, N; Aguirre, AJ; Chu, GC; Cheng, K-H; Lopez, LV; Hezel, AF; Feng, B; Brennan, C; Weissleder, R; Mahmood, U; Hanahan, D; Redston, MS; Chin, L; Depinho, RA (2006): Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (15), S. 5947–5952. DOI: 10.1073/pnas.0601273103.
- Basso, D; Bozzato, D; Padoan, A; Moz, S; Zambon, C-F; Fogar, P; Greco, E; Scorzeto, M; Simonato, F; Navaglia, F; Fassan, M; Pelloso, M; Dupont, S; Pedrazzoli, S; Fassina, A; Plebani, M (2014): Inflammation and pancreatic cancer: molecular and functional interactions between S100A8, S100A9, NT-S100A8 and TGFβ1. *Cell Commun Signal* 12, S. 20. DOI: 10.1186/1478-811X-12-20.
- Bellone, G; Smirne, C; Mauri, FA; Tonel, E; Carbone, A; Buffolino, A; Dughera, L; Robecchi, A; Pirisi, M; Emanuelli, G (2006): Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol. Immunother.* 55 (6), S. 684–698. DOI: 10.1007/s00262-005-0047-0.
- Carbone, A; Vizio, B; Novarino, A; Mauri, FA; Geuna, M; Robino, C; Brondino, G; Prati, A; Giacobino, A; Campra, D; Chiarle, R; Fronda, GR; Ciuffreda, L; Bellone, G (2009): IL-18 paradox in pancreatic carcinoma: elevated serum levels of free IL-18 are correlated with poor survival. *J Immunother* 32 (9), S. 920–931. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181b29168.
- Chinwalla, AT; Cook, LL; Delehaunty, KD; Fewell, GA; Fulton, LA; Fulton, RS; Graves, TA; Hillier, LW; Mardis, ER; McPherson, JD; Miner, TL; Nash, WE; Nelson, JO; Nhan, MN; Pepin, KH; Pohl, CS; Ponce, TC; Schultz, B; Thompson, J; Trevaskis, E; Waterston, RH; Wendl, MC; Wilson, RK; Yang, S-P; An, P; Berry, E; Birren, B; Bloom, T; Brown, DG; Butler, J; Daly, M; David, R; Deri, J; Dodge, S; Foley, K; Gage, D; Gnerre, S; Holzer, T; Jaffe, DB; Kamal, M; Karlsson, EK; Kells, C; Kirby, A; Kulbokas, EJ; Lander, ES; Landers, T; Leger, JP; Levine, R; Lindblad-Toh, K; Mauceli, E; Mayer, JH; McCarthy, M; Meldrim, J; Mesirov, JP; Nicol, R; Nusbaum, C; Seaman, S; Sharpe, T; Sheridan, A; Singer, JB; Santos, R; Spencer, B; Stange-Thomann, N; Vinson, JP; Wade, CM; Wierzbowski, J; Wyman, D; Zody, MC; Birney, E; Goldman, N; Kasprzyk, A; Mongin, E; Rust, AG; Slater, G; Stabenau, A; Ureta-Vidal, A; Whelan, S; Ainscough, R; Attwood, J; Bailey, J; Barlow, K; Beck, S; Burton, J; Clamp, M; Clee, C; Coulson, A; Cuff, J; Curwen, V; Cutts, T; Davies, J; Eyraas, E; Grafham, D; Gregory, S; Hubbard, T; Hunt, A; Jones, M; Joy, A; Leonard, S; Lloyd,

- C; Matthews, L; McLaren, S; McLay, K; Meredith, B; Mullikin, JC; Ning, Z; Oliver, K; Overton-Larty, E; Plumb, R; Potter, S; Quail, M; Rogers, J; Scott, C; Searle, S; Shownkeen, R; Sims, S; Wall, M; West, AP; Willey, D; Williams, S; Abril, JF; Guigó, R; Parra, G; Agarwal, P; Agarwala, R; Church, DM; Hlavina, W; Maglott, DR; Sapojnikov, V; Alexandersson, M; Pachter, L; Antonarakis, SE; Dermitzakis, ET; Reymond, A; Ucla, C; Baertsch, R; Diekhans, M; Furey, TS; Hinrichs, A; Hsu, F; Karolchik, D; Kent, WJ; Roskin, KM; Schwartz, MS; Sugnet, C; Weber, RJ; Bork, P; Letunic, I; Suyama, M; Torrents, D; Zdobnov, EM; Botcherby, M; Brown, SD; Campbell, RD; Jackson, I; Bray, N; Couronne, O; Dubchak, I; Poliakov, A; Rubin, EM; Brent, MR; Flicek, P; Keibler, E; Korf, I; Batalov, S; Bult, C; Frankel, WN; Carninci, P; Hayashizaki, Y; Kawai, J; Okazaki, Y; Cawley, S; Kulp, D; Wheeler, R; Chiaromonte, F; Collins, FS; Felsenfeld, A; Guyer, M; Peterson, J; Wetterstrand, K; Copley, RR; Mott, R; Dewey, C; Dickens, NJ; Emes, RD; Goodstadt, L; Ponting, CP; Winter, E; Dunn, DM; Niederhausern, AC von; Weiss, RB; Eddy, SR; Johnson, LS; Jones, TA; Elnitski, L; Kolbe, DL; Eswara, P; Miller, W; O'Connor, MJ; Schwartz, S; Gibbs, RA; Muzny, DM; Glusman, G; Smit, A; Green, ED; Hardison, RC; Yang, S; Haussler, D; Hua, A; Roe, BA; Kucherlapati, RS; Montgomery, KT; Li, J; Li, M; Lucas, S; Ma, B; McCombie, WR; Morgan, M; Pevzner, P; Tesler, G; Schultz, J; Smith, DR; Tromp, J; Worley, KC; Mouse Genome Sequencing Consortium; Genome Sequencing Center.; Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research.; European Bioinformatics Institute.; Wellcome Trust Sanger Institute; Research Group in Biomedical Informatics; Bioinformatics; National Center for Biotechnology Information; Department of Mathematics; Division of Medical Genetics; Center for Biomolecular Science and Engineering; EMBL; UK MRC Mouse Sequencing Consortium; Lawrence Berkeley National Laboratory; Department of Computer Science; School of Computer Science; The Jackson Laboratory; Laboratory for Genome Exploration; Affymetrix Inc.; Departments of Statistics and Health Evaluation Sciences; National Human Genome Research Institute; Wellcome Trust Centre for Human Genetics; Department of Electrical Engineering; Department of Human Anatomy and Genetics; Department of Human Genetics; Howard Hughes Medical Institute and Department of Genetics; Departments of Biochemistry and Molecular Biology and Computer Science and Engineering; Department of Computer Science and Engineering; Baylor College of Medicine; The Institute for Systems Biology; Department of Biochemistry and Molecular Biology; Howard Hughes Medical Institute; Department of Chemistry and Biochemistry; Departments of Genetics and Medicine and Harvard-Partners Center for Genetics and Genomics; Department of Statistics; US DOE Joint Genome Institute; Cold Spring Harbor Laboratory; Wellcome Trust; Max Planck Institute for Molecular Genetics; Genome Therapeutics Corporation; Bioinformatics Solutions Inc.; Department of Molecular and Human Genetics; Department of Biology; Members of the Mouse Genome Analysis Group (2002): Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420 (6915), S. 520–562. DOI: 10.1038/nature01262.
- Chung, CT; Niemela S.L.; Miller R.H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (86), S. 2172–2175.
- Chytil, A; Magnuson, MA; Wright, CVE; Moses, HL (2002): Conditional inactivation of the TGF-beta type II receptor using Cre:Lox. *Genesis* 32 (2), S. 73–75.
- Conroy, T; Desseigne, F; Ychou Marc; Bouché Olivier; Guimbaud Rosine; Bécouarn Yves; Adenis Antoine; Raoul Jean-Luc; Gourgou-Bourgade Sophie; de la Fouchardière Christelle; Bennouna Jaafar; Bachet Jean-Baptiste; Khemissa-Akouz

- Faiza; Péré-Vergé Denis; Delbaldo Catherine; Assenat Eric; Chauffert Bruno; Michel Pierre; Montoto-Grillot Christine; Ducreux Michel (2011): FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *New Engl J Med*, S. 1817–1825.
- Coughlin, CM; Salhany, KE; Wysocka, M; Aruga, E; Kurzawa, H; Chang, AE; Hunter, CA; Fox, JC; Trinchieri, G; Lee, WM (1998): Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 101 (6), S. 1441–1452. DOI: 10.1172/JCI1555.
- Cross, SS; Hamdy, FC; Deloulme, JC; Rehman, I (2005): Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. *Histopathology* 46 (3), S. 256–269. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2005.02097.x.
- Cubilla, AL; Fitzgerald, PJ (1976): Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer. *Cancer Res.* 36 (7 Part 2), S. 2690.
- David, CJ; Huang, Y-H; Chen, M; Su, J; Zou, Y; Bardeesy, N; Iacobuzio-Donahue, CA; Massagué, J (2016): TGF- β Tumor Suppression through a Lethal EMT. *Cell* 164 (5), S. 1015–1030. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.009.
- Deng, G; Kakar, S; Okudiara, K; Choi, E; Sleisenger, MH; Kim, YS (2009): Unique methylation pattern of oncostatin m receptor gene in cancers of colorectum and other digestive organs. *Clin. Cancer Res.* 15 (5), S. 1519–1526. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1778.
- Dinarello, CA (1999): IL-18: A TH1 -inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103 (1), S. 11–24. DOI: 10.1016/S0091-6749(99)70518-X.
- Dong, M; How, T; Kirkbride, KC; Gordon, KJ; Lee, JD; Hempel, N; Kelly, P; Moeller, BJ; Marks, JR; Blobe, GC (2007): The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 117 (1), S. 206–217. DOI: 10.1172/JCI29293.
- Ellenrieder, V; Alber, B; Lacher, U; Hendler, SF; Menke, A; Boeck, W; Wagner, M; Wilda, M; Friess, H; Büchler, M; Adler, G; Gress, TM (2000): Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int. J. Cancer* 85 (1), S. 14–20. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000101)85:1<14::AID-IJC3>3.0.CO;2-O.
- Ellenrieder, V; Hendler, SF; Boeck, W; Seufferlein, T; Menke, A; Ruhland, C; Adler, G; Gress, TM (2001a): Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res.* 61 (10), S. 4222–4228.
- Ellenrieder, V; Hendler, SF; Ruhland, C; Boeck, W; Adler, G; Gress, TM (2001b): TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int. J. Cancer* 93 (2), S. 204–211. DOI: 10.1002/ijc.1330.
- El-Rifai, W'e; Moskaluk, CA; Abdrabbo, MK; Harper, J; Yoshida, C; Riggins, GJ; Frierson, HF; Powell, SM (2002): Gastric Cancers Overexpress S100A Calcium-binding Proteins. *Cancer Res.* 62 (23), S. 6823.
- Finger, EC; Turley, RS; Dong, M; How, T; Fields, TA; Blobe, GC (2008): TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29 (3), S. 528–535. DOI: 10.1093/carcin/bgm289.

- Friess, H; Yamanaka, Y; Büchler, M; Ebert, M; Beger, HG; Gold, LI; Korc, M (1993): Enhanced expression of transforming growth factor β isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 105 (6), S. 1846–1856.
- Fu, B; Luo, M; Lakkur, S; Lucito, R; Iacobuzio-Donahue, CA (2008): Frequent genomic copy number gain and overexpression of GATA-6 in pancreatic carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 7 (10), S. 1593–1601. DOI: 10.4161/cbt.7.10.6565.
- Gatza, CE; Oh, SY; Blobel, GC (2010): Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. *Cell. Signal.* 22 (8), S. 1163–1174. DOI: 10.1016/j.cellsig.2010.01.016.
- Glaß, M; Möller, B; Zirkel, A; Wächter, K; Hüttelmaier, S; Posch, S (2011): Scratch Assay Analysis with Topology-Preserving Level Sets and Texture Measures. In: Jordi Vitrià, João Miguel Sanches und Mario Hernández (Hg.): Pattern recognition and image analysis. 5th Iberian conference, IbPRIA 2011, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, June 8 - 10, 2011 ; proceedings, Bd. 6669. Berlin: Springer (Lecture Notes in Computer Science, 6669), S. 100–108.
- Glaß, M; Möller, B; Zirkel, A; Wächter, K; Hüttelmaier, S; Posch, S (2012): Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. *Pattern Recognit.* 45 (9), S. 3154–3165. DOI: 10.1016/j.patcog.2012.03.001.
- Glazer, ES; Welsh, E; Pimiento, JM; Teer, JK; Malafa, MP (2017): TGF β 1 overexpression is associated with improved survival and low tumor cell proliferation in patients with early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 8 (1), S. 999–1006. DOI: 10.18632/oncotarget.13533.
- Gordon, KJ; Dong, M; Chislock, EM; Fields, TA; Blobel, GC (2008): Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression. *Carcinogenesis* 29 (2), S. 252–262. DOI: 10.1093/carcin/bgm249.
- Gordon, KJ; Kirkbride, KC; How, T; Blobel, GC (2009): Bone morphogenetic proteins induce pancreatic cancer cell invasiveness through a Smad1-dependent mechanism that involves matrix metalloproteinase-2. *Carcinogenesis* 30 (2), S. 238–248. DOI: 10.1093/carcin/bgn274.
- Guo, X; Zheng, L; Jiang, J; Zhao, Y; Wang, X; Shen, M; Zhu, F; Tian, R; Shi, C; Xu, M; Li, X; Peng, F; Zhang, H; Feng, Y; Xie, Y; Xu, X; Jia, W; He, R; Xie, C; Hu, J; Ye, D; Wang, M; Qin, R (2016): Blocking NF- κ B Is Essential for the Immunotherapeutic Effect of Recombinant IL18 in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 22 (23), S. 5939–5950. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1144.
- Hahn, SA; Schutte, M; Hoque, ATMS; Moskaluk, CA; da Costa, LT; Rozenblum, E; Weinstein, CL; Fischer, A; Yeo, CJ; Hruban, RH; Kern, SE (1996): DPC4, A Candidate Tumor Suppressor Gene at Human Chromosome 18q21.1. *Science* 271 (5247), S. 350–353. DOI: 10.1126/science.271.5247.350.
- Hellebrekers, Debby M E I; Lentjes, Marjolein H F M; van den Bosch, Sandra M; Melotte, V; Wouters, Kim A D; Daenen, Kathleen L J; Smits, KM; Akiyama, Y; Yuasa, Y; Sanduleanu, S; Khalid-de Bakker, Carolina A J; Jonkers, D; Weijenberg, MP; Louwagie, J; van Criekinge, W; Carvalho, B; Meijer, GA; Baylin, SB; Herman, JG; de Bruïne, Adriaan P; van Engeland, M (2009): GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 15 (12), S. 3990–3997. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0055.

- Herbertz, S; Sawyer, JS; Stauber, AJ; Gueorguieva, I; Driscoll, KE; Estrem, ST; Cleverly, AL; Desai, D; Guba, SC; Benhadji, KA; Slapak, CA; Lahn, MM (2015): Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des Devel Ther* 9, S. 4479–4499. DOI: 10.2147/DDDT.S86621.
- Hermanns, HM (2015): Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 26 (5), S. 545–558. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.006.
- Hezel, AF; Deshpande, V; Zimmerman, SM; Contino, G; Alagesan, B; O'Dell, MR; Rivera, LB; Harper, J; Lonning, S; Brekken, RA; Bardeesy, N (2012): TGF- β and $\alpha v\beta 6$ integrin act in a common pathway to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Res.* 72 (18), S. 4840–4845. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0634.
- Hezel, AF; Kimmelman, AC; Stanger, BZ; Bardeesy, N; Depinho, RA (2006): Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & development* 20 (10), S. 1218–1249. DOI: 10.1101/gad.1415606.
- Hidalgo, M (2010): Pancreatic cancer. *New Engl J Med* 362 (17), S. 1605–1617. DOI: 10.1056/NEJMra0901557.
- Hingorani, SR; Petricoin, EF; Maitra, A; Rajapakse, V; King, C; Jacobetz, MA; Ross, S; Conrads, TP; Veenstra, TD; Hitt, BA; Kawaguchi, Y; Johann, D; Liotta, LA; Crawford, HC; Putt, ME; Jacks, T; Wright, CVE; Hruban, RH; Lowy, AM; Tuveson, DA (2003): Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4 (6), S. 437–450. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00309-X.
- Hingorani, SR; Wang, L; Multani, AS; Combs, C; Deramandt, TB; Hruban, RH; Rustgi, AK; Chang, S; Tuveson, DA (2005): Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7 (5), S. 469–483. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.04.023.
- Hruban, RH; Goggins, M; Parsons, J; Kern, SE (2000): Progression Model for pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* (Vol. 6), S. 2969–2972.
- Ichikawa, M; Williams, R; Wang, L; Vogl, T; Srikrishna, G (2011): S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res* 9 (2), S. 133–148. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0394.
- Ijichi, H (2011): Genetically-engineered mouse models for pancreatic cancer: Advances and current limitations. *World J Clin Oncol* 2 (5), S. 195–202. DOI: 10.5306/wjco.v2.i5.195.
- Ijichi, H; Chytil, A; Gorska, AE; Aakre, ME; Fujitani, Y; Fujitani, S; Wright, CVE; Moses, HL (2006): Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes & development* 20 (22), S. 3147–3160. DOI: 10.1101/gad.1475506.
- Jonson, T; Albrechtsson, E; Axelson, J; Heidenblad, M; Gorunova, L; Johansson, B; Höglund, M (2001): Altered expression of TGFB receptors and mitogenic effects of TGFB in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* 19 (1), S. 71–81.
- Junk, DJ; Bryson, BL; Smigiel, JM; Parameswaran, N; Bartel, CA; Jackson, MW (2017): Oncostatin M promotes cancer cell plasticity through cooperative STAT3-SMAD3 signaling. *Oncogene* 36 (28), S. 4001–4013. DOI: 10.1038/onc.2017.33.

- Juuti, A; Lundin, J; Nordling, S; Louhimo, J; Haglund, C (2006): Epithelial MMP-2 expression correlates with worse prognosis in pancreatic cancer. *Oncology* 71 (1-2), S. 61–68. DOI: 10.1159/000100988.
- Kim, J; Kim, C; Kim, TS; Bang, SI; Yang, Y; Park, H; Cho, D (2006a): IL-18 enhances thrombospondin-1 production in human gastric cancer via JNK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344 (4), S. 1284–1289. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.016.
- Kim, K-E; Song, H; Kim, TS; Yoon, D; Kim, C-w; Bang, SI; Hur, DY; Park, H; Cho, D-H (2006b): Interleukin-18 is a critical factor for vascular endothelial growth factor-enhanced migration in human gastric cancer cell lines. *Oncogene* 26, 1468 EP -. DOI: 10.1038/sj.onc.1209926.
- Kim, MS; Louwagie, J; Carvalho, B; Terhaar Sive Droste, JS; Park, HL; Chae, YK; Yamashita, K; Liu, J; Ostrow, KL; Ling, S; Guerrero-Preston, R; Demokan, S; Yalniz, Z; Dalay, N; Meijer, GA; van Criekinge, W; Sidransky, D (2009): Promoter DNA methylation of oncostatin m receptor-beta as a novel diagnostic and therapeutic marker in colon cancer. *PLoS ONE* 4 (8), e6555. DOI: 10.1371/journal.pone.0006555.
- Leivonen, S-K; Kähäri, V-M (2007): Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. *Int. J. Cancer* 121 (10), S. 2119–2124. DOI: 10.1002/ijc.23113.
- Levy, AT; Cioce, V; Sobel, ME; Garbisa, S; Grigioni, WF; Liotta, LA; Stetler-Stevenson, WG (1991): Increased Expression of the MR 72,000 Type IV Collagenase in Human Colonic Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 51 (1), S. 439.
- Lian, H; Jin, N; Li, X; Mi, Z; Zhang, J; Sun, L; Li, X; Zheng, H; Li, P (2007): Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin. *Cancer Immunol. Immunother.* 56 (2), S. 181–192. DOI: 10.1007/s00262-006-0178-y.
- Massagué, J (1998): TGF- β Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* (67), S. 753–791.
- Massagué, J (2008): TGFbeta in Cancer. *Cell* 134 (2), S. 215–230. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.001.
- Melisi, D; Garcia-Carbonero, R; Macarulla, T; Pezet, D; Deplanque, G; Fuchs, M; Trojan, J; Oettle, H; Kozloff, M; Cleverly, A; Smith, C; Estrem, ST; Gueorguieva, I; Lahn, MMF; Blunt, A; Benhadji, KA; Tabernero, J (2018): Galunisertib plus gemcitabine vs. gemcitabine for first-line treatment of patients with unresectable pancreatic cancer. *Br. J. Canc.* 119 (10), S. 1208–1214. DOI: 10.1038/s41416-018-0246-z.
- Melisi, D; Ishiyama, S; Scwabas, GM; Fleming, JB; Xia, Q; Tortora, G; Abbruzzese, JL; Chiao, PJ (2008): LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer Ther* 7 (4), S. 829–840. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0337.
- Metzger, D; Chambon, P (2001): Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* 24 (1), S. 71–80. DOI: 10.1006/meth.2001.1159.
- Monteagudo, C; Merino, MJ; San-Juan, J; Liotta, LA; Stetler-Stevenson, WG (1990): Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign, and malignant breast tissue. *Am. J. Pathol.* 136 (3), S. 585–592.
- Mosley, B; Imus, C de; Friend, D; Boiani, N; Thoma, B; Park, LS; Cosman, D (1996): Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative

- signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem* 271 (51), S. 32635–32643. DOI: 10.1074/jbc.271.51.32635.
- Mosmann, T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Ng, G; Winder, D; Muralidhar, B; Gooding, E; Roberts, I; Pett, M; Mukherjee, G; Huang, J; Coleman, N (2007): Gain and overexpression of the oncostatin M receptor occur frequently in cervical squamous cell carcinoma and are associated with adverse clinical outcome. *J Pathol* 212 (3), S. 325–334. DOI: 10.1002/path.2184.
- Peters, I; Eggers, H; Atschekzei, F; Hennenlotter, J; Waalkes, S; Tränkenschuh, W; Grosshennig, A; Merseburger, AS; Stenzl, A; Kuczyk, MA; Serth, J (2012): GATA5 CpG island methylation in renal cell cancer: a potential biomarker for metastasis and disease progression. *BJU Int.* 110 (2 Pt 2), E144-52. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10862.x.
- Rafehi, H; Orłowski, C; Georgiadis, GT; Ververis, K; El-Osta, A; Karagiannis, TC (2011): Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp* (49). DOI: 10.3791/2573.
- Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hg.) (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin.
- Roe, J-S; Hwang, C-I; Somerville, TDD; Milazzo, JP; Lee, EJ; Da Silva, B; Maiorino, L; Tiriác, H; Young, CM; Miyabayashi, K (2017): Enhancer reprogramming promotes pancreatic cancer metastasis. *Cell* 170 (5), S. 875–888.
- Rowland-Goldsmith, MA; Maruyama, H; Matsuda, K; Idezawa, T; Ralli, M; Ralli, S; Korc, M (2002): Soluble type II transforming growth factor-beta receptor attenuates expression of metastasis-associated genes and suppresses pancreatic cancer cell metastasis. *Mol Cancer Ther* 1 (3), S. 161–167.
- Rozenblum, E; Schutte, M; Goggins, M; Hahn, SA; Panzer, S; Zahurak, M; Goodman, SN; Sohn, TA; Hruban, RH; Yeo, CJ; Kern, SE (1997): Tumor-suppressive Pathways in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* 57 (9), S. 1731.
- Sauer, B; Henderson, N (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (14), S. 5166–5170. DOI: 10.1073/pnas.85.14.5166.
- Savarese, TM; Campbell, CL; McQuain, C; Mitchell, K; Guardiani, R; Quesenberry, PJ; Nelson, BE (2002): Coexpression of oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine* 17 (6), S. 324–334. DOI: 10.1006/cyto.2002.1022.
- Seth, A; Kitching, R; Landberg, G; Xu, J; Zubovits, J; Burger, AM (2003): Gene expression profiling of ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors. *Anticancer Res* 23 (3A), S. 2043–2051.
- Shen, J; Person, MD; Zhu, J; Abbruzzese, JL; Li, D (2004): Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res.* 64 (24), S. 9018–9026. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3262.
- Shuman Moss, Laurie A; Jensen-Taubman, S; Stetler-Stevenson, WG (2012): Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis. *Am. J. Pathol.* 181 (6), S. 1895–1899. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.044.

- Shureiqi, I; Zuo, X; Broaddus, R; Wu, Y; Guan, B; Morris, JS; Lippman, SM (2007): The transcription factor GATA-6 is overexpressed in vivo and contributes to silencing 15-LOX-1 in vitro in human colon cancer. *FASEB J* 21 (3), S. 743–753. DOI: 10.1096/fj.06-6830com.
- Siegel, R; Ma, J; Zou, Z; Jemal, A (2014): Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64 (1), S. 9–29. DOI: 10.3322/caac.21208.
- Smigiel, JM; Parameswaran, N; Jackson, MW (2017): Potent EMT and CSC Phenotypes Are Induced By Oncostatin-M in Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Res* 15 (4), S. 478–488. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0337.
- Song, L; Wang, P; Tian, Y; de Chang; Li, K; Fan, Y; Shen, J; Du, H; Mi, R; Bian, X; Tang, X (2015): Lung metastasis of pancreatic carcinoma is regulated by TGF β signaling. *Tumour Biol* 36 (4), S. 2271–2276. DOI: 10.1007/s13277-014-2834-8.
- Tawara, K; Bolin, C; Koncinsky, J; Kadaba, S; Covert, H; Sutherland, C; Bond, L; Kronz, J; Garbow, JR; Jorcyk, CL (2018): OSM potentiates preinvasation events, increases CTC counts, and promotes breast cancer metastasis to the lung. *Breast Cancer Res* 20 (1), S. 53. DOI: 10.1186/s13058-018-0971-5.
- Thomas, KR; Capecchi, MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51 (3), S. 503–512. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90646-5.
- van Deursen, Jan; Hofker, Martern H. (2003): Transgenic mouse. Methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in molecular biology, 209). Online verfügbar unter <http://lib.mylibrary.com/detail.asp?id=84223>.
- Vidal-Vanaclocha, F; Fantuzzi, G; Mendoza, L; Fuentes, AM; Anasagasti, MJ; Martín, J; Carrascal, T; Walsh, P; Reznikov, LL; Kim, SH; Novick, D; Rubinstein, M; Dinarello, CA (2000): IL-18 regulates IL-1 β -dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2), S. 734–739. DOI: 10.1073/pnas.97.2.734.
- Vincent, A; Herman, J; Schulick, R; Hruban, RH; Goggins, M (2011): Pancreatic cancer. *Lancet* 378 (9791), S. 607–620. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- Weigelt, B; Glas, AM; Wessels, Lodewyk F. A., Witteveen, Anke T.; Peterse, JL; van't Veer, Laura J. (2003): Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (vol. 100, no. 26), zuletzt geprüft am 20.11.2014.
- Yachida, S; Jones, S; Bozic, I; Antal, T; Leary, R; Fu, B; Kamiyama, M; Hruban, RH; Eshleman, JR; Nowak, MA; Velculescu, VE; Kinzler, KW; Vogelstein, B; Iacobuzio-Donahue, CA (2010): Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* 467 (7319), S. 1114–1117. DOI: 10.1038/nature09515.
- Yu, Z; Li, Z; Wang, C; Pan, T; Chang, X; Wang, X; Zhou, Q; Wu, X; Li, J; Zhang, J; Liu, B; Zhu, Z; Su, L (2019): Oncostatin M receptor, positively regulated by SP1, promotes gastric cancer growth and metastasis upon treatment with Oncostatin M. *Gastric Cancer*. DOI: 10.1007/s10120-019-00934-y.
- Zaki, MH; Vogel, P; Body-Malapel, M; Lamkanfi, M; Kanneganti, T-D (2010): IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *J Immunol* 185 (8), S. 4912–4920. DOI: 10.4049/jimmunol.1002046.
- Zhang, H; Liu, C; Kong, Y; Huang, H; Wang, C; Zhang, H (2015): TGF β signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Tumor Biol.* 36 (3), S. 1613–1618. DOI: 10.1007/s13277-014-2757-4.

Zheng, R; Blobel, GA (2010): GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes Cancer* 1 (12), S. 1178–1188. DOI: 10.1177/1947601911404223.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Histologisch-genetisches Progressionsmodell des duktales Adenokarzinoms im Pankreas (aus Hruban et al. 2000)	2
Abbildung 2: Modelle der Metastasierung (aus Weigelt et al. 2005)	3
Abbildung 3: LSL-Tgfb1 im Rosa26-Locus	29
Abbildung 4: 1. Klonierungsschritt	43
Abbildung 5: 2. Klonierungsschritt	44
Abbildung 6: 3. Klonierungsschritt	44
Abbildung 7: 4. Klonierungsschritt	45
Abbildung 8: Modifizierter Rosa26-Locus	48
Abbildung 9: Rosa26-PCR der Chimären-Nachkommen	48
Abbildung 10: Erste Genotypisierungs-PCR	49
Abbildung 11: Zweite Genotypisierungs-PCR	49
Abbildung 12: Knockdown-Effizienz	52
Abbildung 13: Zellviabilität nach Knockdown der Kandidatengene (<i>MTT-Assay</i>)	54
Abbildung 14: Migrationsverhalten nach Knockdown der Kandidatengene (<i>Scratch Assay</i>)	55
Abbildung 15: Statistische Auswertung des Scratch Assay	56
Abbildung 16: Koloniebildung nach Knockdown der Kandidatengene (<i>Clonogenic Assay</i>)	57
Abbildung 17: Verankerungs- und substratunabhängiges Wachstum nach Knockdown der Kandidatengene (<i>Soft Agar Assay</i>)	59
Abbildung 18: Überlebenszeit nach orthotoper Implantation	61
Abbildung 19: Überlebenskurven nach orthotoper Implantation (Einzelanalyse)	61
Abbildung 20: Metastasierung nach Knockdown der Kandidatengene	62
Abbildung 21: Biolumineszenzbildgebung nach Knockdown von <i>Gata5</i>	63
Abbildung 22: Tumorgöße zum Zeitpunkt der Sektion (Hellfeldbilder)	63
Abbildung 23: Biolumineszenzbildgebung zwei Wochen nach Implantation	64
Abbildung 24: Biolumineszenzbildgebung in vivo und ex vivo bei Sektion nach Knockdown von Tgfb3 und Osmr	65

8.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien	12
Tabelle 2: kommerziell erhältliche Kits	14
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 4: Geräte und Instrumente	16
Tabelle 5: Lösungen und Puffer	17
Tabelle 6: shRNA-Sequenzen	18
Tabelle 7: Primer und Proben für die RT-PCR	19
Tabelle 8: PCR-Primer zur Überprüfung der Klonierungsschritte und der ES-Klone	20
Tabelle 9: Reaktionsansatz für Verdau mit Restriktionsendonukleasen	23
Tabelle 10: Reaktionsansatz zur Herstellung glatter Enden	23
Tabelle 11: Reaktionsansatz für Dephosphorylierung	24
Tabelle 12: Reaktionsansatz für Ligation	24
Tabelle 13: Reaktionsansatz für Screening-PCR	28
Tabelle 14: Reaktionsbedingungen für Screening-PCR	28
Tabelle 15: Allgemeiner Reaktionsansatz für die PCRs zur Überprüfung der ES-Klone	29
Tabelle 16: Reaktionsbedingungen für PCRs zur Überprüfung der ES-Klone	30

Tabelle 17: Reaktionsansatz für Mykoplasmen-PCR	30
Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für Mykoplasmen-PCR	31
Tabelle 19: Allgemeiner Ansatz für Genotypisierungs-PCRs	32
Tabelle 20: Allgemeine Reaktionsbedingungen der Genotypisierungs-PCRs	32
Tabelle 21: Mischungsverhältnis zur Herstellung des Soft-Agars für die Bodenschicht	39
Tabelle 22: Mischungsverhältnis des zellhaltigen Soft-Agars	39
Tabelle 23: Reaktionsansatz für RT-PCR	40
Tabelle 24: Reaktionsbedingungen für RT-PCR	40
Tabelle 25: Reaktionsansatz für qPCR	41
Tabelle 26: Konzentrationen der qPCR-Standardkurven	42
Tabelle 27: Ausgewählte shRNAs	53
Tabelle 28: Synopsis der Ergebnisse	67

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich während und bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Roland Schmid, der mir die Möglichkeit gab, an der II. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar zu promovieren.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Saur, für die Möglichkeit bei ihm bzw. in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Er hat mich mit seiner Begeisterung für die Grundlagenforschung sehr beeindruckt und geprägt. Ich danke ihm für die herausragende Betreuung, seine wissenschaftlichen Anregungen, seine Diskussions- und Erklärungsbereitschaft und sein Vertrauen in diese Arbeit und mich.

Weiterhin danke ich im Besonderen Frau Dr. Barbara Seidler und Herrn Dr. Stefan Eser für all ihre Unterstützung, Erklärungen und Hilfe beim Erlernen und Durchführen verschiedenster Arbeitstechniken, ihre Diskussionsbereitschaft sowie ihre Ideen und Anregungen.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Saur-Arbeitsgruppe bedanken für die gute Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen während meiner Doktorarbeit; einen besonderen Dank möchte ich hier an Herrn Christian Veltkamp und Frau Magdalena Zukowska richten.

Einen großen Dank richte ich außerdem an die Deutsche Krebshilfe e.V., die diese Arbeit bzw. mich mit einem Stipendium des Mildred Scheel-Doktorandenprogramms unterstützt hat.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinem Freundeskreis für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihren moralischen Beistand bei der Anfertigung und Fertigstellung meiner Doktorarbeit.