

Aus der Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, Infektiologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Mathias Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Funktionelle Charakterisierung der Gene *NPC2* und *ADRBK1* im Pankreaskarzinom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christin Häuser

aus Siegen

Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
18.04.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. M. Buchholz

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. T. Wündisch

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Pankreaskarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik.....	1
1.1.2 Pathologie und Molekularpathologie	3
1.1.3 Relevanz.....	6
1.2 Kandidatengen <i>NPC2</i>.....	6
1.2.1 <i>Screening</i> -Verfahren	6
1.2.2 Charakterisierung	8
1.3 Kandidatengen <i>ADRBK1</i>	9
1.3.1 <i>Screening</i> -Verfahren	9
1.3.2 Charakterisierung	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Material.....	13
2.1 Verbrauchsmaterialien	13
2.2 Geräte.....	14
2.3 Chemikalien	15
2.4 siRNA	16
2.5 Primer für qRT-PCR	16
2.6 Kits	16
2.7 Antikörper.....	17
2.8 Standard.....	18
2.9 Zellkultur	18
2.9.1 Zelllinien	18
2.9.2 Nährmedien und Zusätze	19
3 Methoden	20
3.1 Zellbiologische Methoden	20
3.1.1 Kulturbedingungen	20
3.1.2 Passagierung, Zellzahlbestimmung und Aussaat.....	20
3.1.3 Transiente Transfektion.....	20
3.2 Molekularbiologische Methoden	21
3.2.1 RNA-Isolation	21
3.2.2 Spektrophotometrische Messung der RNA-Konzentration.....	21

3.2.3	cDNA-Synthese	21
3.2.4	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion.....	22
3.3	Funktionelle Assays	23
3.3.1	MTT-Assay	23
3.3.2	BrdU-Assay	24
3.3.3	<i>Time-Lapse</i> -Analyse.....	24
3.4	Proteinanalytische Methoden	25
3.4.1	Proteinisolation aus Zellen	25
3.4.2	Proteinbestimmung nach <i>Bradford</i>	25
3.4.3	SDS-PAGE	26
3.4.4	<i>Western-Blot</i>	27
3.4.5	Ponceau-Färbung.....	28
3.4.6	Immundetektion	28
3.5	Statistische Methoden	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	<i>NPC2</i>.....	30
4.1.1	<i>NPC2</i> wird in pankreatischem Tumorgewebe und Zelllinien überexprimiert 30	
4.1.2	<i>Knockdown</i> -Effizienz von <i>NPC2</i> gemessen in der qRT-PCR.....	31
4.1.3	Transienter <i>Knockdown</i> von <i>NPC2</i> beeinflusst die Zellvitalität und Zellproliferation im Pankreaskarzinom nicht akut.....	32
4.1.4	Transienter <i>Knockdown</i> von <i>NPC2</i> beeinflusst ungerichtete Zellbewegung im Pankreaskarzinom nicht akut	34
4.2	<i>ADRBK1</i>	35
4.2.1	Vorversuche der Arbeitsgruppe zu <i>ADRBK1</i>	35
4.2.2	<i>Knockdown</i> von <i>ADRBK1</i> führt zur Induktion von Apoptose	37
5	Diskussion	41
5.1	<i>NPC2</i>.....	41
5.2	<i>ADRBK1</i>	44
6	Zusammenfassung	50
7	Summary.....	52
8	Literaturverzeichnis	53
9	Anhang.....	61
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	61
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	66

9.3 Tabellenverzeichnis	67
9.4 Verzeichnis akademischer Lehrer	68
9.5 Danksagung.....	69

1 Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Klinik

Als eines der aggressivsten und am schlechtesten behandelbaren Malignome stellt das Pankreaskarzinom die zwölft häufigste Krebsart in Deutschland dar. Im Jahr 2012 bezifferte die WHO seine Inzidenz in Deutschland mit 16 451 Fällen. Davon waren 7 972 Patienten männlich und 8 479 weiblich. Die Inzidenz ist weiterhin steigend. Zusätzlich muss allerdings die extrem hohe Mortalität von 16 188 (7 900 männlich und 8 288 weiblich) beachtet werden. Es ergibt sich somit die Einordnung auf Platz 5 der Rangliste Krebs-assoziiierter Todesfälle (Ferlay et al., 2013). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt voraussichtlich im Jahr 2017 in den USA über alle Stadien gemittelt nur 8 % (R. L. Siegel, Miller, & Jemal, 2017).

Ätiologisch werden in der Literatur einige Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms genannt. So verdoppelt sich zum Beispiel durch Rauchen das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Bosetti et al., 2012). Auch Diabetes mellitus gilt als anerkannter Risikofaktor (Ben et al., 2011). Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass ein Diabetes mellitus umgekehrt auch die Erstmanifestation eines Pankreaskarzinoms darstellen kann. Außerdem geht Adipositas, von der WHO definiert als *Body-Mass-Index* > 30 (BMI), mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko einher (Aune et al., 2012). Ebenso konnte für Patienten mit langjähriger chronischer Pankreatitis (Malka et al., 2002) ein erhöhtes Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden.

Des Weiteren finden sich neben den hereditären Pankreatitiden (Howes et al., 2004) eine Reihe genetischer Syndrome, welche mit einem erhöhten Risiko einhergehen, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken. So konnte unter anderem bei Patienten mit Peutz-Jeghers-Syndrom (Lim et al., 2004), familiärem atypischem multiplem Muttermal- und Melanomsyndrom (FAMMM) (Rulyak, Brentnall, Lynch, & Austin, 2003), familiärem Mamma- und Ovarialkarzinom aufgrund einer Keimbahnmutation in den Genen *breast cancer 1/2, early onset (BRCA1/2)* (Iqbal et al., 2012) oder *partner and localizer of BRCA2 (PALB2)* (Jones et al., 2009), hereditärem nicht-Polyposis-assoziiertem kolorektalem Karzinom (HNPCC) (Kastrinos et al., 2009) und familiärer

adenomatöser Polyposis (FAP) (Giardiello et al., 1993) ein solches erhöhtes Risiko festgestellt werden.

Bei Erkrankung eines erstgradig Verwandten an sporadischem Pankreaskarzinom ist das Risiko für Indexpatienten selbst zu erkranken um das 2-fache erhöht. Dieses Risiko steigt sogar noch an, wenn das Erkrankungsalter des Verwandten unter dem 60. Lebensjahr lag (McWilliams, Rabe, Olsword, De Andrade, & Petersen, 2005). Sobald in einer Familie mindestens zwei oder mehr erstgradig Verwandte an einem Pankreaskarzinom erkranken, spricht man von einem familiären Pankreaskarzinom (FPC). Bei nur zwei Erkrankten in der Familie ist das Risiko für ein weiteres Familienmitglied um das 18-fache erhöht, bei drei und mehr Familienmitgliedern kann es sogar auf das 57-fache ansteigen (Tersmette et al., 2001).

Symptome des Pankreaskarzinoms treten meist erst sehr spät im Krankheitsverlauf auf und sind zudem eher unspezifisch. Dazu können unter anderem Oberbauchschmerz, Rückenschmerz, Gewichtsverlust, Schwäche und Appetitlosigkeit zählen. Außerdem tritt bei Pankreaskopftumoren nicht selten ein Verschlussikterus auf (Porta et al., 2005). Bei etwa 50 % der Patienten zeigen sich zudem Symptome eines Diabetes mellitus (Chari et al., 2005).

Zur Diagnostik des Pankreaskarzinoms stehen die Sonographie, Endosonographie, Multidetektor-Computertomographie (Multidetektor-CT), Magnetresonanztomographie (MRT) mit Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) oder endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) zur Verfügung. Gegebenenfalls kann der Tumormarker *carbohydrate*-Antigen 19-9 (CA 19-9) bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Level dieses Proteins mit einer größeren Tumormast einhergehen. Ansonsten ist seine Bestimmung nur zur Verlaufskontrolle relevant (Nazli, Bozdog, Tansug, Kir, & Kaymak, 2000).

Die Chirurgie ist derzeit das einzige potentiell kurative Verfahren zur Behandlung des Pankreaskarzinoms (Wagner et al., 2004). Präoperativ ist die CT zur Bestimmung des Tumorstadiums immer obligat (Bipat et al., 2005). Eine adjuvante Chemotherapie wird empfohlen nach Resektion ohne Residualtumor (R0) in den Stadien I-III der *Union internationale contre le cancer* (UICC). Zum Einsatz kommt hierbei entweder Gemcitabin (Oettle et al., 2013) oder Fluorouracil (5-FU)/Folinsäure (Neoptolemos et al., 2010) über eine Dauer von sechs Monaten.

Als palliative Chemotherapie kommt neben Gemcitabin (Sultana et al., 2007), gegebenenfalls ergänzt durch den *epidermal growth factor receptor*-Inhibitor (EGFR-

Inhibitor) Erlotinib (Moore et al., 2007), auch eine Kombinationstherapie bestehend aus Folsäure, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin (FOLFIRINOX) in Frage (Conroy et al., 2011). Seit März 2015 ist nun auch Albumin-gebundenes Paclitaxel (nab-Paclitaxel, Handelsname: Abraxane) in Kombination mit Gemcitabin als Erstlinientherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom zugelassen (Von Hoff et al., 2013). Ansonsten erfolgt eine symptomorientierte palliative Therapie im Sinne einer *best supportive care*.

1.1.2 Pathologie und Molekularpathologie

Mit rund 85 % ist das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC) die häufigste Tumorart des exokrinen Pankreas. In Analogie zum Modell der Karzinogenese beim Kolonkarzinom entwickelte man eine Theorie, in welcher sich sogenannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) über verschiedene Stufen zum invasiven PDAC weiterentwickeln. Unterschieden wurden die drei Stufen PanIN-1a/b, PanIN-2 und PanIN-3, bei denen der Dysplasiegrad stetig zunimmt (Hruban, Goggins, Parsons, & Kern, 2000). Neben den PanIN-Läsionen konnten weitere Vorläufer des PDAC identifiziert werden. Als zweithäufigste ist die intraduktale papillär-muzinöse Neoplasie (IPMN) zu nennen, sehr viel seltener tritt die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) auf. Auch aus diesen beiden Entitäten können sich invasive Karzinome entwickeln (Brugge, Lauwers, Sahani, Fernandez-del Castillo, & Warshaw, 2004).

Während der Kanzerogenese treten einige charakteristische somatische Mutationen besonders häufig auf. Unabhängig vom Stadium der PanIN-Läsionen lässt sich so bereits in 90% eine *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*-Mutation (*KRAS*-Mutation) nachweisen (Kanda et al., 2012). Somit handelt es sich beim Pankreaskarzinom um den Tumor mit der höchsten *KRAS*-Mutationsrate. Die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A* (*CDKN2A*), *tumor protein p53* (*TP53*) und *SMAD family member 4* (*SMAD4*) findet hingegen vermehrt erst in PanIN-2 und -3 statt (Hustinx et al., 2005). Alle diese vier Mutationen führen zu bestimmten Eigenschaften der invasiven Pankreaskarzinomzelle und werden im Folgenden näher erläutert.

Eine aktivierende Mutation des Onkogens *KRAS* trägt auf funktioneller Ebene über die Aktivierung des *mitogen activated protein kinase*- und *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*-Signalwegs (MAPK- und PI3K-Signalweg) zu einer vermehrten Zellproliferation und einem gesteigerten Zellüberleben bei (Young, Lou, & McCormick, 2013).

CDKN2A kodiert für zwei Tumorsuppressorproteine: p16^{INK4A} und p14^{ARF} (Bardeesy et al., 2006). Im Pankreaskarzinom kommt es in mehr als 90 % der Fälle auf verschiedenen Wegen zur Inaktivierung dieser Tumorsuppressoren (Hustinx et al., 2005). Das p16^{INK4A}-Protein reguliert den Zellzyklus, genauer gesagt den Übergang von der *gap 1* (G1)- zur Synthese (S)-Phase, indem es den Cyclin D/cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6-Komplex hemmt. Auf diese Weise kommt es wiederum zu einer Abnahme der Phosphorylierung von *retinoblastoma*-Protein (pRB). p14^{ARF} hingegen hemmt die *E3 ubiquitin protein ligase* (MDM2), woraufhin p53 weniger abgebaut wird (Bardeesy et al., 2006).

In über 83 % der Fälle ist das *TP53*-Gen inaktiviert (Jones et al., 2008). Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressor und fungiert als Transkriptionsfaktor, welcher auf zellulären Stress mit der Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose reagiert. Der Verlust dieses Proteins führt zum Überleben und zur Proliferation von Zellen trotz Desoxyribonukleinsäure-Schäden (DNA-Schäden). Daraus resultiert eine enorme genetische Instabilität (Vogelstein & Kinzler, 2004).

SMAD4 ist in mehr als 50 % der Pankreaskarzinome inaktiviert (Iacobuzio-Donahue et al., 2004). Das Protein SMAD4 spielt eine Rolle im *transforming growth factor beta*-Signalweg (TGF- β -Signalweg) und wirkt somit in der gesunden Zelle wachstumsregulierend. Der Verlust der SMAD4-Funktion führt demnach zur unkontrollierten zellulären Proliferation (P. M. Siegel & Massagué, 2003). Neben diesen für PDAC sehr charakteristischen Mutationen treten unzählige weitere deutlich seltenere Mutationen, zum Beispiel in Bezug auf bestimmte Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, auf.

Obwohl lange davon ausgegangen wurde, dass PDAC von dukталen Zellen des Pankreas abstammen, gaben einige Studien zuletzt Anlass zu Zweifeln an dieser Theorie. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass auch azinäre Zellen das Potential zur Karzinogenese haben. In diesem Kontext spielt die sogenannte azinär-dukta­le Metaplasie (ADM) eine große Rolle. Zunächst wandeln sich azinäre Zellen zu tubulären Komplexen um. Danach entstehen sogenannte atypische flache Läsionen (AFL), welche neben PanIN, IPMN und MCN eine weitere nichtinvasive Vorstufe des PDAC darstellen (Esposito, Konukiewitz, Schlitter, & Klöppel, 2014). Momentan existiert ein Modell der Karzinogenese, welches alle diese Wege berücksichtigt.

Die hohe Chemoresistenz des Pankreaskarzinoms stellt ebenfalls ein wichtiges Charakteristikum dar. Diese basiert vermutlich auf einer Vielzahl unterschiedlicher

Faktoren, ist allerdings bis zum jetzigen Zeitpunkt nur teilweise verstanden. So resultierte zum Beispiel die Therapie mit 5-FU und/oder Gemcitabin in einer gesteigerten Expression von *multidrug resistance-associated proteins* (MRP) in PDAC-Zellen, während *short hairpin* Ribonukleinsäure-vermittelter (shRNA-vermittelter) *Knockdown* des *MRP5*-Gens in PANC-1-Zellen zu einer verbesserten Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit Gemcitabin führte (Hagmann, Jesnowski, & Lühr, 2010).

Eine weitere große Rolle bei der Entstehung von Resistenzmechanismen spielt auch die desmoplastische Stromareaktion. Das sogenannte Stroma beinhaltet sowohl Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) als auch diverse Zellarten, welche die eigentlichen Krebszellen umgeben (Schober et al., 2014). Pankreassternzellen (PSC) stellen zum Beispiel einen wichtigen Zelltyp im Tumorstroma dar, welcher in seiner aktivierten Form einen Großteil der Zytokine und der Bestandteile der ECM produziert. PSC tragen unter anderem zur typischen hypovaskulären und fibrotischen Mikroumgebung in PDAC bei (Neesse et al., 2011). Diese Hypovaskularisation hat zur Folge, dass die Anflutung von Medikamenten im Tumor beeinträchtigt wird und somit die Resistenz gegenüber Gemcitabin ebenfalls ansteigt. Eine verbesserte Anflutung konnte festgestellt werden, nachdem der sogenannte *sonic hedgehog*-Signalweg (SHH-Signalweg) inhibiert wurde, welcher normalerweise die Desmoplasie anregt. Die Depletion des Stromas führte hier wahrscheinlich zu verbesserter Angiogenese (Olive et al., 2009). Auch die Injektion von pegylierter, rekombinanter humaner Hyaluronidase PH20 (PEGPH20) in tumortragende Mäuse des $LSL-Kras^{G12D/+}/LSL-Trp53^{R172H/+}/Pdx-1-Cre$ -Modells (KPC-Modell) führte zur Wiederherstellung der Durchlässigkeit intratumoraler Gefäße und erhöhte deren Durchmesser, da die Hyaluronsäure im Stroma verstärkt abgebaut wurde. Der hohe interstitielle Gewebedruck konnte so auf den normalen Level reduziert werden. Eine Kombination der Therapie mit Gemcitabin verbesserte die Therapie-Effizienz im Vergleich zu Gemcitabin allein nochmals signifikant. Das mediane Überleben wurde hierbei annähernd verdoppelt (Jacobetz et al., 2013).

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein Prozess, welcher in der Entwicklung des menschlichen Körpers bei der Differenzierung von embryonalen Zellen und Gewebe eine Rolle spielt. In Krebszellen hingegen vermittelt EMT die Fähigkeit zu Progression, Invasion und Metastasierung (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Zuletzt konnte zudem gezeigt werden, dass auch die Chemoresistenz im Pankreaskarzinom mit EMT assoziiert ist (Shah et al., 2007).

1.1.3 Relevanz

Aufgrund der ausgesprochen schlechten Diagnostik und Therapie des Pankreaskarzinoms sollten weitere Studien im Hinblick auf die Funktionen der beteiligten Gene durchgeführt werden. Nur so können die Genetik und die Pathomechanismen dieser Erkrankung im Detail aufgeklärt und Marker zur Früh- bzw. Differenzialdiagnose sowie potentielle Ziele für *targeted therapies* gefunden werden. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden daher 2 Kandidatengene, die in verschiedenen Hochdurchsatz-*Screening*-Verfahren identifiziert wurden und eine potentiell onkogene Funktion im Pankreaskarzinom haben, untersucht. Im Folgenden werde ich zunächst auf die durchgeführten *Screening*-Verfahren sowie die beiden Gene im Allgemeinen eingehen.

1.2 Kandidatengen *NPC2*

1.2.1 *Screening*-Verfahren

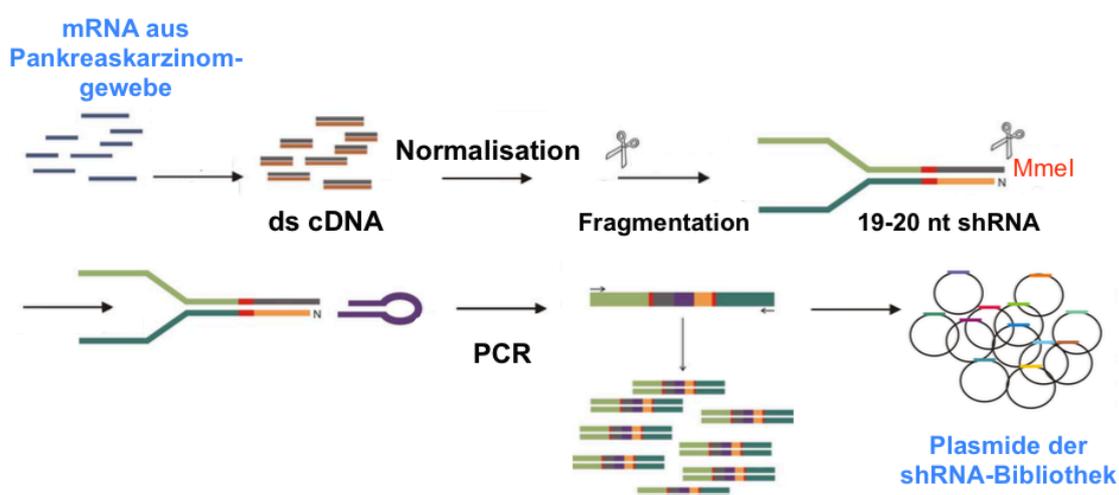


Abbildung 1.1: Herstellung der Transkriptom-basierten shRNA-Bibliothek.

Erläuterung siehe Text; mRNA = messenger RNA, ds cDNA = doppelsträngige komplementäre DNA, nt = Nukleotide, shRNA = short hairpin RNA, MmeI = Restriktionsenzym, PCR = Polymerasekettenreaktion

Im Rahmen des PakaNostra-Projekts hat eine kooperierende Arbeitsgruppe am Naturwissenschaftlich-Mathematischen Institut Reutlingen (NMI) eine Hochdurchsatzanalyse zur Identifizierung von spezifischen Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen im Pankreaskarzinom durchgeführt. Das Verfahren lief Transkriptom-basiert ab, das heißt es wurde keine Vorauswahl der zu untersuchenden

Gene getroffen, sondern Gewebe aus Pankreaskarzinomen wurde direkt dazu verwendet, eine shRNA-Bibliothek zu erstellen. Zunächst erfolgte die Isolation der *messenger* RNA (mRNA) aus den Gewebeproben und das Umschreiben in doppelsträngige komplementäre DNA (ds cDNA). Die cDNA-Fragmente wurden anschließend an einen Adapter ligiert. Es folgte ein Restriktionsverdau durch das Enzym Mmel, um die Fragmente auf eine erwünschte Länge von 19-20 Nukleotiden zu bringen, und die Ligation an eine Haarnadelstruktur, die sogenannte *stem loop*. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die entstandenen Fragmente amplifiziert und schließlich in Plasmide kloniert. Dazu wurden lentivirale Vektoren und die *Gateway*-Klonierungstechnologie genutzt. Die entstandenen Plasmide wurden daraufhin in die beiden Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa2 und PANC-1 transduziert. Auf diese Weise wurden verschiedene shRNAs mit unterschiedlicher *Knockdown*-Effizienz für die einzelnen mRNAs generiert. Das gesamte Verfahren wird auch als *enzymatically generated transcriptome-based* (ENTRACE) shRNA-Bibliothek bezeichnet. Das Prinzip der Herstellung zeigt Abbildung 1.1.

Nach 5-wöchiger Kultivierung der Zellen erfolgte die Auswertung des Screens mit Hilfe des *next generation sequencing* (NGS). Hierbei wurde analysiert, welche shRNA-Konstrukte in welcher Menge von den Zellen exprimiert wurden. Im Vergleich von Zeitpunkt Null und nach 5 Wochen zeigte sich, dass bestimmte Konstrukte depletiert und andere angereichert worden waren. Die depletierten Konstrukte waren dabei mutmaßlich gegen Gene für das zelluläre Überleben gerichtet, das heißt die Zellen konnten nicht überleben, nachdem die shRNA die Expression dieser Gene ausgeschaltet hatte. Die angereicherten Konstrukte hingegen waren gegen Wachstumssuppressoren - potenzielle Tumorsuppressoren - gerichtet. Nach Ausschaltung der Expression dieser Gene besaßen die Zellen einen Überlebensvorteil und konnten vermehrt wachsen. Zur Validierung der Ergebnisse des Screens wurde diese Technologie zur Kontrolle ebenfalls in untransformierten hTERT-HPNE-Zellen durchgeführt.

Das Gen *Niemann-Pick disease, type C2 (NPC2)* konnte hierbei als konsistent depletiert in den Karzinomzelllinien identifiziert werden. Dies spricht für die Annahme, dass *NPC2* ein Onkogen sein könnte, welches wichtige Funktionen im Bezug auf das zelluläre Überleben vermittelt. Solche Onkogene stellen auch immer potentielle Ziele für *targeted therapies* in Krebserkrankungen dar. Deshalb bot es sich an, dieses Gen in funktionellen Analysen weiter zu untersuchen.

1.2.2 Charakterisierung

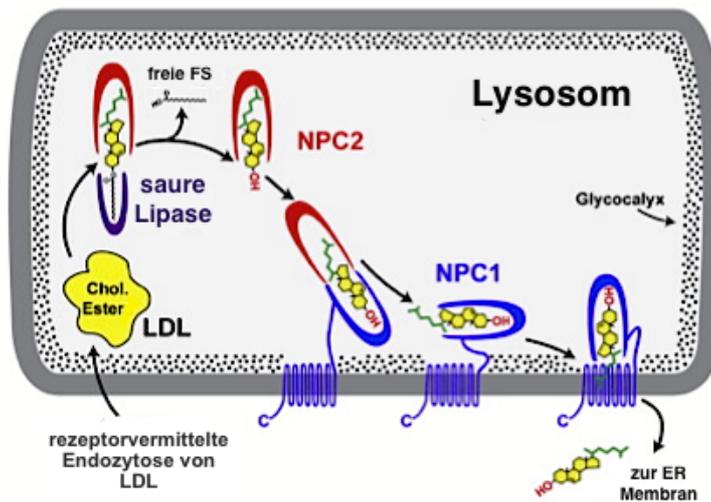


Abbildung 1.2: Modell der physiologischen Funktion von NPC2 in der Zelle.

Erläuterung siehe Text, Abbildung modifiziert nach Kwon et al., 2009; LDL = *low density* Lipoprotein, Chol. = Cholesterin, FS = Fettsäuren, NPC2 = *Niemann-Pick disease, type C2*, NPC1 = *Niemann-Pick disease, type C1*, ER = endoplasmatisches Retikulum

Die beiden Proteine *Niemann-Pick disease, type C1* (NPC1) und NPC2 steuern den Austritt von Cholesterin aus dem späten Endosom/Lysosom. Cholesterinester werden im Lumen des Lysosoms hydrolysiert. Daraufhin kann freigesetztes Cholesterin an NPC2, ein lösliches, luminales, cholesterinbindendes Protein, binden. NPC2 transferiert Cholesterin zu NPC1, einem mehrfach die Membran durchspannenden Protein der Lysosomenmembran. Cholesterin wird von NPC1 in die lysosomale Membran eingebaut und steht anschließend für den weiteren Transport zum Beispiel zum ER und anderen Membranen zur Verfügung (Kwon et al., 2009). Ein Modell zur Funktion von NPC2 in der Zelle ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Ein geringer Anteil des endosomalen Cholesterins wird allein durch NPC2 zur äußeren Endosomenmembran und von dort aus zum Mitochondrium transferiert. Bei diesem Prozess werden die Proteine *StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3* (MLN64) und *voltage-dependent anion channel 1* (VDAC1) benötigt; er läuft jedoch unabhängig von NPC1 ab (Kennedy, Charman, & Karten, 2012).

Zusätzlich zu seiner Funktion beim intrazellulären Cholesterintransport trägt NPC2 zur Cholesterinhomöostase des gesamten Körpers bei. So wird NPC2 in der Leber exprimiert und in die Galle sezerniert (Klein et al., 2006). Das sezernierte NPC2 fungiert als positiver Regulator der biliären Cholesterinsekretion mittels *ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5/8* (ABCG5/8), einem Cholesterin-

Exporterprotein (Yamanashi, Takada, Yoshikado, Shoda, & Suzuki, 2011). Die Expression und Sekretion von NPC2 selbst wird durch *NPC1-like protein 1* (NPC1L1) herunterreguliert, indem es dessen Reifung hemmt und dessen Abbau beschleunigt (Yamanashi, Takada, Shoda, & Suzuki, 2012).

Mutationen dieses Gens sind Ursache für 4 % der Fälle der seltenen lysosomalen Speicherkrankheit Niemann-Pick-Erkrankung Typ C (NP-C). Weitere 95 % der Fälle werden durch eine Mutation im *NPC1*-Gen verursacht. NP-C wird autosomal-rezessiv vererbt und tritt bei etwa einer pro 120 000 Lebendgeburten auf. Die Prozessierung und Verwertung von in die Zelle aufgenommenem Cholesterin ist gestört. Unverestertes Cholesterin akkumuliert intrazellulär und der Sphingolipid-Metabolismus kann nicht richtig ablaufen. Es handelt sich um eine sogenannte neuroviszerale Erkrankung, bei der sowohl neurologische und psychiatrische als auch viszerale Symptome auftreten können. Die Prognose ist sehr schlecht und die Therapie erfolgt meist symptomatisch. (Patterson et al., 2012). Eine funktionelle Rolle im Pankreaskarzinom war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

1.3 Kandidatengen *ADRBK1*

1.3.1 *Screening*-Verfahren

Mit Hilfe von *cDNA-Microarrays* ist es möglich, spezifische Expressionsprofile für das humane Pankreaskarzinom zu erstellen (Crnogorac-Jurcevic et al., 2002; Han et al., 2002; Iacobuzio-Donahue et al., 2003). Auf diese Weise können neue Gene identifiziert werden, welche mit der Erkrankung assoziiert sind, potentielle Onkogene oder Marker darstellen und gegebenenfalls auch therapeutisch oder diagnostisch verwendbar sind. Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, wie man mit Hilfe dieser *Microarrays* beispielsweise einen diagnostischen Score, welcher auf spezifischen Expressionsdaten aus Pankreasbiopsien beruht, erstellen oder die TGF β -vermittelte Regulation verschiedener Gene in Pankreaskarzinomzelllinien aufklären kann (Buchholz et al., 2005; Fensterer et al., 2004).

Ausgehend von zwei Expressionsanalysen unserer Arbeitsgruppe (Gress et al., 1996, 1997) konnten weitere pankreasspezifische *cDNA-Arrays* designt werden. Ergänzend wurde dazu auch *cDNA* von Genen aus relevanten Genfamilien wie zum Beispiel Kinasen, Proteasen und Transkriptionsfaktoren verwendet, sodass ein Kollektiv von etwa 2 000 Genen identifiziert werden konnte. Anschließend wurden die entsprechenden Arrays dazu verwendet, Genexpressionsprofile verschiedener

Pankreasgewebeproben sowie verschiedener funktioneller *in vitro*- und *in vivo*-Modelle des Pankreaskarzinoms zu erstellen. Die bioinformatische Auswertung dieses Kollektivs führte zur Auswahl von 79 Kandidatengen, welche im Pankreaskarzinom dereguliert sind und zusätzlich in mindestens einem der funktionellen Modelle auffällig waren.

Die in unserem Labor etablierte *reverse transfection*-Methode stellt eine Möglichkeit dar, eine objektive Vorauswahl dieser Gene zu treffen, bevor man langwierige funktionelle Einzelgenanalysen beginnt. Dafür wird das leicht modifizierte Protokoll einer Lipid-vermittelten Transfektion in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Es folgt die Phänotypanalyse mittels Antikörperbindung sowie die Fluoreszenzmikroskopie (Ziauddin & Sabatini, 2001). Die Modifizierung beinhaltet die Fluoreszenzmarkierung der Genprodukte selbst statt der *Array*-Positionen, was die anschließende Phänotypen-Analyse der *Microarrays* weiter erleichtert (Conrad et al., 2004). Außerdem wurde die RNAi-Technologie auf die *Microarrays* übertragen (Silva, Mizuno, Brady, Lucito, & Hannon, 2004), sodass nun nicht nur die Überexpression, sondern auch die Repression von Genen und die entsprechende Beeinflussung der Zellfunktion analysiert werden konnten. Die Antikörper waren gegen Cyclin B1, Vimentin, E-Cadherin, *cysteine-aspartic acid protease-3* (Caspase 3) und *marker of proliferation* Ki-67 (Ki-67) gerichtet. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf die Zellfunktion bezüglich Apoptose, Proliferation, Differenzierung und EMT ziehen. Zudem wurden fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsanalysen durchgeführt. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mit dieser Methode die funktionelle Analyse großer Mengen von Genen in einem einzigen parallelisierten Ansatz gelingt.

Die β -adrenerge Rezeptorkinase 1 (*ADRBK1*) war eines der 79 Kandidatengene, welche mit Hilfe der *reverse transfection*-Methode einer funktionellen Analyse unterzogen wurde. Sie gehörte bei diesem *Screening* zur Gruppe der Gene, welche im Pankreaskarzinom überexprimiert werden. Auffällig war hier vor allem, dass nach Überexpression des Gens ein subzellulärer Lokalisationswechsel des Proteins von zytoplasmatisch nach zytoplasmatisch und nukleär beobachtet wurde. Dieser wurde zunächst als Reaktion auf die Kulturbedingungen mit und ohne 10 % fetales Kälberserum (FCS) interpretiert. In weiteren Versuchen mit der Zelllinie PANC-1 zeigte sich jedoch, dass der Lokalisationswechsel zeitabhängig auftrat und das Protein unabhängig von den Kulturbedingungen nach 48 Stunden immer im Kern und im Zytoplasma zu finden war (Buchholz et al., 2015).

1.3.2 Charakterisierung

ADRBK1 gehört zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und ist auch unter dem Namen GRK2 bekannt. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Rezeptordesensibilisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die ausgedehnte oder wiederholte Exposition eines solchen Rezeptors gegenüber hohen Konzentrationen eines Agonisten führt zu seiner Desensibilisierung. Dazu erkennt ADRBK1 zunächst den aktivierten Rezeptor, bindet an ihn und wird dadurch selbst katalytisch aktiviert. Es folgt die Phosphorylierung des Rezeptors, an den nun ein sogenanntes Arrestin-Protein binden kann, welches den Rezeptor daran hindert, weitere G-Proteine zu aktivieren. Somit steht die Signalweiterleitung still. GRKs und Arrestine können auch die Internalisierung der GPCR über *clathrin-coated pits* vermitteln (Premont & Gainetdinov, 2007). Erst wenn einige Zeit keine Stimulation stattfindet, kommt es zur Resensibilisierung. ADRBK1 wurde ursprünglich im Zusammenhang mit β -adrenergen Rezeptoren entdeckt (Benovic, Strasser, Caron, & Lefkowitz, 1986). Heute ist bekannt, dass unzählige andere GPCRs ebenfalls von ihr phosphoryliert und somit abgeschaltet werden. Deshalb werden ihr vielfältige Funktionen zugeschrieben. Sie findet sich ubiquitär in fast allen Geweben, besitzt allerdings unterschiedliche Funktion je nach Gewebe und Rezeptor. Auch GPCR-unabhängige Signale werden durch ADRBK1 vermittelt (Premont & Gainetdinov, 2007). Einige Beispiele GPCR-abhängiger sowie -unabhängiger Signale werden im Folgenden näher erläutert.

Die Relevanz von ADRBK1 für Pathologien am Herz-Kreislaufsystem wurde bereits früh aufgedeckt. Studien an *Knockout*-Mäusen haben gezeigt, dass ADRBK1 eine essentielle Rolle bei der Kardiogenese spielt (Jaber et al., 1996). Aber nicht nur die Entwicklung des Herzens, sondern auch die Pathogenese der Herzinsuffizienz (Ungerer, Böhm, Elce, Erdmann, & Lohse, 1993) und der Hypertension werden durch dieses Protein beeinflusst (Eckhart, Ozaki, Tevaearai, Rockman, & Koch, 2002). Eine Assoziation von ADRBK1 mit dem Immunsystem besteht ebenfalls. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis konnten erniedrigte Level in peripheren Monozyten festgestellt werden. (Lombardi et al., 2001). Auch auf neurologischer und psychiatrischer Ebene findet sich ADRBK1 als Regulator. So könnte die Kinase ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Suo, Wu, Citron, Wong, & Festoff, 2004) und Morbus Parkinson (Bezard et al., 2005), neuroinflammatorischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose (Vroon et al., 2005) und psychiatrischen Erkrankungen wie Depression (Grange-Midroit et al., 2003) spielen. Auch Opioidrezeptoren können durch ADRBK1 desensibilisiert werden. So interagiert

die Kinase zum Beispiel mit μ -Opiodrezeptoren und trägt zur Toleranzentwicklung gegenüber Opioiden bei (Hurlé, 2001).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in Einzelgenanalysen die Ergebnisse der Hochdurchsatz-*Screenings* zu validieren und das onkogene Potenzial von *NPC2* und *ADRBK1* in Pankreaskarzinomzelllinien umfassend zu charakterisieren.

In verschiedenen dieser Zelllinien sollten nach *small interfering RNA*-vermitteltem *Knockdown* (siRNA-vermittelter *Knockdown*) des Kandidatengens *NPC2* die im *Screening* beobachteten Effekte validiert sowie weitere funktionelle Analysen durchgeführt werden. Hierzu wurden Proliferations- (MTT, BrdU-Inkorporation) und Migrationsassays (*Time-Lapse-Analyse*) durchgeführt.

Aufbauend auf diversen Vorversuchen zum Kandidatengen *ADRBK1* (siehe 4.2.1), sollte mittels *Western-Blot*-Analyse herausgefunden werden, auf welchem Weg die gezeigten funktionellen Effekte vermittelt werden und welche Signalkaskaden involviert sind. Alle verwendeten Methoden waren in der Arbeitsgruppe etabliert.

Aus den Analysen zu beiden Genen erwartete man wesentliche Erkenntnisse über ihre Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps von Pankreaskarzinomzellen sowie mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuartiger diagnostischer und therapeutischer Strategien beim Pankreaskarzinom.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: verwendete Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	Braun (Melsungen)
Blotting-Papier MN 218 B	Macherey-Nagel (Düren)
Cellstar® Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Combitips advanced® (Eppendorf Biopur®) 2,5 ml/5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Combitips advanced® 5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Glasware	Schott (Mainz)
Kosmetiktücher	Igefa (Ahrensfelde)
Latexhandschuhe	VWR (Radnor, USA)
MicroAmp® Fast Optical Reaktionsplatte 96-Loch	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Mikrotestplatte 96-Loch	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrocellulose-Membran	GE Health Care (Chalfont St Giles, UK)
Parafilm	Bemis (Neenah, USA)
Pipettenspitzen Diamond D10/D200/D1000	Gilson (Middleton, USA)
Polystyrolröhrchen 12 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Präzisionswischtücher Kimtech	Kimberly-Clark (Irving, USA)
Reagiergefäße aus Polypropylen 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Schraubröhre aus Polypropylen 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
serologische Pipette 2 ml/10 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
serologische Pipette 5 ml/25 ml/50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Terralin® Liquid	Schülke (Norderstedt)
ViewPlate F TC Mikroplatte 96-Loch (für BrdU-Assay)	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Zellkulturflasche T-75	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten 6-Loch/12-Loch	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten 96-Loch	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturschale 60 mm/100 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

2.2 Geräte

Tabelle 2.2: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real-Time PCR-System	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Cell Observer® Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Centro LB 960 Mikroplatten-Luminometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
ChemoCam	Intas (Göttingen)
Dri-Block® DB-2A	Techne (Stone, UK)
DX65 Autoklav	Systec (Linden)
EasyPhor PAGE Mini vertikale Elektrophoresekammer und Zubehör	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf)
Einkanalpipette PIPETMAN Classic™ (100-1000 µl)	Gilson (Middleton, USA)
Einkanalpipetten Eppendorf Reference® (0,5-10 µl) und Eppendorf Research® (10-100 µl)	Eppendorf (Hamburg)
EL20 Education Line pH-Meter	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Feinwaage Mettler AE163	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
HERAfreeze™ HFU T-Series Tiefkühlgerät	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
Kippschüttler PMR-30	Grant-bio (Shepreth, UK)
Kippschüttler SSL4	Stuart (Stone, UK)
Magnetrührer MR2002	Heidolph Instruments (Schwabach)
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica (Wetzlar)
Mini Trans-Blot® Cell Blotting-Kammer	Biorad (Hercules, USA)
Multipette® Plus	Eppendorf (Hamburg)
Multiskan™ FC Mikroplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
peqPOWER E300	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
PIPETBOY acu	Integra Biosciences (Zizers, CH)
Schüttler KS250 B	IKA Labortechnik (Staufen)
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
Sprout® Minizentrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments (Schwabach)
Zentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 8	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ 3SR+	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)
Zentrifuge Heraeus™ Pico™ 17	Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, USA)

2.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: verwendete Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Amersham™ Enhanced Chemoluminescence (Plus) Western Blotting Detection Reagent (ECL)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Coomassie Plus™ Protein Assay-Reagenz	Thermo Scientific (Langenselbold)
Desoxy-Nucleotidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas (St. Leon-Roth)
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin (87 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kälberserumalbumin (BSA)	SIGMA (Deisenhofen)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Milchpulver	SIGMA (Deisenhofen)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	SIGMA (Deisenhofen)
Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$)	SIGMA (Deisenhofen)
Natriumvanadat (NaVO_3)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natronlauge	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA (Deisenhofen)
Ponceau-S	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ProteaseArrest™	G-Biosciences (Maryland Heights, USA)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
siLentFect™	BioRad (Hercules, USA)
SYBR® green	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Thiaxyloyl-Blau	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris Base	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris HCl	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.4 siRNA

Tabelle 2.4: siRNA zur transienten Transfektion

siRNA ID#	Name	Sequenz	Zielgen	Hersteller
s20759	N1	CGAAUAUCCCUCUAUAAAAtt	NPC2	Ambion® (Carlsbad, USA)
s20760	N2	GCCUGAUGGUUGUAAGAGUtt		
s20761	N3	GAGUUUAUAAAGGAAGUGAAtt		
140032	B3	CCUAGACACUCCCUACAAUtt	BCKDK	
s1127	A1	GGAAGAAUGUGGAGCUCAAtt	ADRBK1	
s1128	A2	GGGAGAUCUUCGACUCAUAtt		
s1129	A3	ACAUCGAAGAGAUUUGUCAtt		

2.5 Primer für qRT-PCR

Tabelle 2.5: Primer für qRT-PCR

Name	Sequenz	Hersteller
BCKDK_forward	5'-TGGTTCGTGTCCCAGTCTCTTAC-3'	Biomers (Ulm)
BCKDK_reverse	5'-ATCCCACTCCCACCAAATCA-3'	
NPC2_forward	5'-ATCCGCGATGCGTTTTCC-3'	
NPC2_reverse	5'-ATCCACAGAACCGCAGTCCTT-3'	
RPLP0_forward	5'-AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT-3'	
RPLP0_reverse	5'-TGGGCAAGAACACCATGATG-3'	

2.6 Kits

Tabelle 2.6: verwendete Kits

Name	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminiscent) Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Omniscript RT Kit	Qiagen (Hilden)
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab Biotechnologies GmbH (Erlangen)

2.7 Antikörper

Tabelle 2.7: Primäre Antikörper für *Western-Blot*

Name	Größe	Herkunft	Verdünnung	Kat.-Nr.	Hersteller
anti-c-myc (9E10)	67 kDa	Maus	1:250	sc-40	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
anti-Caspase 3	17/19/ 35 kDa	Kaninchen	1:1 000	9662	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-Cleaved Caspase 3 (D175)	17/ 19 kDa	Kaninchen	1:1 000	9661	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-Cyclin A (H-432)	54 kDa	Kaninchen	1:1 000	sc-751	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin D1	33 kDa	Kaninchen	1:500	ab-16663	abcam (Cambridge, UK)
anti-GRK2 (3F8)	80 kDa	Maus	1:1 000	MA5-15840	Thermo Scientific (Dreieich)
anti-p21 Waf1/Cip1 (12D1)	21 kDa	Kaninchen	1:1 000	2974	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-p27 (C-19)	27 kDa	Kaninchen	1:500	sc-528	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
anti-PARP	24/89/ 116 kDa	Kaninchen	1:1 000	9542	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-pRB (S807/811)	110 kDa	Kaninchen	1:1 000	9308	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-β-Aktin	42 kDa	Maus	1:40 000	A3854	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Tabelle 2.8: Sekundäre Antikörper für *Western-Blot*

Name	Größe	Herkunft	Verdünnung	Kat.-Nr.	Hersteller
anti-Kaninchen HRP-gekoppelt		Ziege	1:10 000	7074	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-Maus HRP-gekoppelt		Pferd	1:10 000	7076	Cell Signaling (Danvers, USA)

Alle Verdünnungen der Antikörper wurden in 5 % Magermilch in TBST (siehe Tabelle 2.8) angesetzt.

2.8 Standard

Tabelle 2.9: verwendeter Standard

Name	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Thermo Scientific (Dreieich)

2.9 Zellkultur

2.9.1 Zelllinien

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen.

PaTu-8988t: Diese Zelllinie wurde aus Lebermetastasen eines humanen pankreatischen Adenokarzinoms isoliert. Bei Injektion von Zellen in Nacktmäuse werden Tumoren mit tubulären Strukturen induziert, deren Zellen eine deutliche Polarisierung aufweisen. Mit rund 110-120 Chromosomen pro Metaphaseplatte sind die Zellen polyploid. Es findet sich keine Metastasierung im Xenograft (Elsässer, Lehr, Agricola, & Kern, 1992).

S2-007 und S2-028: Diese Zellen wurden ebenfalls aus Lebermetastasen eines humanen Pankreaskarzinoms isoliert. Nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse bilden sich hier ebenso Tumoren in Form eines mittelgradig differenzierten tubulären Adenokarzinoms. Elektronenmikroskopisch zeigt sich ein charakteristisches pankreatisches Drüsenepithel. Zudem produzieren die Zellen die beiden Tumormarker

karzinoembryonales Antigen (CEA) und CA 19-9. Im Xenograft metastasieren die Tumoren in die regionalen Lymphknoten (Iwamura, Katsuki, & Ide, 1987).

IMIM-PC2: Diese Zellen wurden aus einem humanen duktalem Pankreaskarzinom isoliert und wachsen in einer polarisierten Einzelzellschicht. Sie produzieren Cytokeratin, ein Polypeptid typisch für einfache Epithelien, sowie MUC1 (Mucin 1, cell surface associated) (Vilá et al., 1995).

BxPC3: Auch hierbei handelt es sich um eine humane pankreatische Tumorzelllinie, welche aus dem Biopsat eines histologisch gesicherten Adenokarzinoms des Pankreaskörpers isoliert wurde. BxPC3-Zellen vermitteln bewiesenermaßen Kanzerogenität in Nacktmäusen. Die Tumoren der Xenografts entsprechen histopathologisch dem Ursprungstumor. Es findet sich zudem eine Expression von CEA, humanem Pankreaskarzinom-assoziiertem Antigen und humanem Pankreas-spezifischem Antigen (Tan et al., 1986). Das Gen *KRAS* ist im Gegensatz zu vielen anderen Pankreaskarzinomzellen nicht mutiert und liegt somit als Wildtyp vor (Deer et al., 2010).

2.9.2 Nährmedien und Zusätze

Tabelle 2.10: Nährmedien und Zusätze

Reagenz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco® (Carlsbad, USA)
fetales Kälberserum	Gibco® (Carlsbad, USA)
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® (Carlsbad, USA)
RPMI-1640	Gibco® (Carlsbad, USA)
Trypsin	Gibco® (Carlsbad, USA)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Die Zelllinien PaTu-8988t, S2-007, S2-028 sowie IMIM-PC2 wurden in DMEM kultiviert, die Zelllinie BxPC3 hingegen in RPMI-1640. Das Medium wurde jeweils mit 10 % FCS versetzt.

3.1.2 Passagierung, Zellzahlbestimmung und Aussaat

Bei einer Konfluenz von rund 80 % wurden die Zellen geteilt. Dazu wurde zunächst das Medium aus der Flasche entfernt und die Zellen mit etwa 8 ml PBS gewaschen. Danach gab man 2,5 ml Trypsin zum Ablösen der Zellen hinzu und inkubierte diese etwa 3 Minuten bei 37 °C. Je nach Verdopplungsgeschwindigkeit wurde nun ein Teil der Suspension in eine neue Flasche mit Vollmedium überführt und somit eine Verdünnung von 1:3 bis 1:10 erzielt.

Die Anzahl der Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach der Trypsinierung und anschließender Resuspension der zu zählenden Zellen wurden etwa 10 µl dieser Zellsuspension in die Kammer pipettiert. Die Zellzahl in den vier Eckquadraten wurde ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Multiplikation mit dem Faktor 1×10^4 ergab dann die Zellzahl pro Milliliter. Bei bekannter Zellkonzentration war so die Aussaat einer bestimmten Zellzahl möglich.

3.1.3 Transiente Transfektion

Die zu transfizierenden Zellen wurden zunächst je nach Zelllinie und durchgeführtem Experiment in unterschiedlicher Dichte auf den entsprechenden Platten ausgesät. Zur transienten Transfektion mit den drei jeweiligen siRNAs gegen die Kandidatengene *NPC2* und *ADRBK1* und mit einer *non silencing*-Kontrolle wurde SiLentFect™ verwendet.

Der folgende Ansatz entsprach der Menge für eine Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte: Zunächst wurden 3 µl siLentFect™ zu 150 µl FCS-freiem DMEM gegeben. Zu weiteren 150 µl FCS-freiem DMEM fügte man 4 µl siRNA bzw. *non silencing*-Kontrolle hinzu. Beide Ansätze wurden anschließend zusammenpipettiert und

für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Den gesamten Ansatz gab man schließlich auf die zuvor ausgesäten Zellen, welche in 1,7 ml Medium resuspendiert worden waren. Die Ausgangskonzentration der siRNA betrug 20 µM, die Endkonzentration nach Zugabe des Ansatzes zu den Zellen somit 40 nM.

Ein Mediumwechsel war notwendig, da die Transfektionskomplexe zelltoxisch sind. Dieser erfolgte abhängig von der Zelllinie nach 8 bis 24 Stunden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA wurden mindestens die transfizierten Zellen einer 12-Loch-Zellkulturplatte benötigt. Sie erfolgte mit dem *peqGOLD Total RNA Kit*. Zunächst entfernte man das Medium von den Zellen und fügte den Lysepuffer hinzu. Das Lysat wurde in die *DNA Removing Column* überführt. Diese befand sich auf einem Reagiergefäß und wurde eine Minute lang bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der anschließend im Reagiergefäß befindliche Durchfluss wurde nun 1:1 mit 70 %igem Ethanol versetzt und in eine weitere Säule, die *PerfectBind RNA Column*, überführt. Es folgte eine Zentrifugierung für eine Minute bei 10 000 rpm. Der Durchfluss wurde auch hier in einem Reagiergefäß aufgefangen, diesmal allerdings verworfen. Daran anschließend wurde mit zwei verschiedenen Puffern gewaschen und jeweils 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Auch hier wurde der Durchfluss verworfen. Die RNA befand sich nun in der Säule. Nach Zugabe von RNase-freiem Wasser wurde nochmals 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die somit eluierte RNA wurde in einem Reagiergefäß aufgefangen und konnte bei -80 °C aufbewahrt werden.

3.2.2 Spektrophotometrische Messung der RNA-Konzentration

Die spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte im RNA-Messprogramm des Nanodrop ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurde 1 µl der extrahierten RNA verwendet. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde primär mit dem Quotienten der Wellenlängen 260 nm/280 nm und sekundär mit dem Quotienten 260 nm/230 nm bestimmt.

3.2.3 cDNA-Synthese

Nach erfolgter RNA-Konzentrationsbestimmung wurde diese mit dem *Omniscript® Reverse Transcription Kit* in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde etwa 0,5 bis 1 µg RNA

verwendet und auf 10,5 µl mit Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 9,5 µl *Mastermix* pro Probe hinzupipettiert, sodass sich eine Gesamtmenge von 20 µl ergab.

Tabelle 3.1: Mastermix zur cDNA-Synthese

Reagenz	Menge
Desoxyribonukleosidtriphosphate (5 mM/dNTP)	2 µl
10x Puffer	2 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl
Wasser	4,5 µl
Oligo Desoxythymidin (Oligo dT) (100 µM)	0,5 µl

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

3.2.4 Quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion

Die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) baut auf dem Prinzip der üblichen PCR auf. Zusätzlich erfolgt jedoch eine Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen des Substrats SYBR® Green. Dieser Farbstoff ist ein Interkalator und lagert sich somit in die DNA ein. Die Menge an PCR-Produkten ist direkt proportional zum detektierten Fluoreszenzsignal.

Tabelle 3.2: Mastermix zur qRT-PCR

Reagenz	Menge
SYBR® Green	10 µl
Primer forward (10 µM)	0,2 µl
Primer reverse (10 µM)	0,2 µl
Wasser	8,6 µl

Für die qRT-PCR wurden 5 ng cDNA eingesetzt. Die *Primer*-Sequenzen sind zunächst mit der Software *PrimerExpress*® erstellt worden. Anschließend wurden je 19 µl des angesetzten *Mastermix* in eine entsprechende Vertiefung einer *ViewPlate* F TC 96-Loch-Mikroplatte gegeben. Es erfolgte immer eine Doppelbestimmung sowohl des zu untersuchenden Gens als auch des damit verglichenen Referenzgens *ribosomal protein, large, P0 (RPLP0)*. Nach der Versiegelung der Platte mit einer speziellen Folie und kurzer Zentrifugierung konnte die PCR am 7500 *Fast Real-Time* PCR-System durchgeführt werden.

Tabelle 3.3: Phasen der qRT-PCR

Funktion	Temperatur	Zeit in Minuten	Zyklen
-	50.0 °C	02:00	1
Aktivierung der Polymerase	95.0 °C	10:00	1
Denaturierung	95.0 °C	00:15	40
Annealing und Extension	60.0 °C	01:00	

Die anschließende Auswertung erfolgte nach der sogenannten $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Zur Analyse der Spezifität der amplifizierten DNA wurden zusätzlich Schmelzkurven erstellt.

3.3 Funktionelle Assays

3.3.1 MTT-Assay

Im MTT-Assay lässt sich die Zellvitalität überprüfen. Als Grundlage dient hierzu die intrazelluläre Umsetzung des wasserlöslichen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, auch bekannt als Thiazolyl-Blau) in das wasserunlösliche Formazan.

Zur Durchführung dieses Assays wurden die Zellen zunächst in einer 12-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und transfiziert. Das MTT-Reagenz bestand aus 5 mg des Farbstoffes Thiazolyl-Blau, welcher in 1 ml PBS gelöst wurde. Dieses wurde im Verhältnis 1:13 mit FCS-freiem DMEM versetzt und nach 72 Stunden auf die Zellen gegeben (750 μ l pro Vertiefung). Es folgte eine 90-minütige Inkubation bei 37 °C. In dieser Zeit nahmen die Zellen große Teile des Farbstoffes auf und setzten ihn um. Nun wurde das Reagenz abgesaugt und durch 300 μ l Solubilisierungs-Lösung je Vertiefung ersetzt. Die Platte wurde für etwa 5 Minuten auf einen Schüttler gestellt, um das entstandene Formazan besser zu lösen.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der MTT-Solubilisierungs-Lösung

Reagenz	Menge
Isopropanol	80 ml
Triton-X 100	10 ml
HCl (1 M)	10 ml

Zur Vorbereitung der photometrischen Auswertung gab man 150 µl PBS sowie 50 µl der Solubilisierungs-Lösung mit dem darin gelöstem Farbstoff in je eine entsprechende Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte. Die Messung der Farbstoffmenge erfolgte am *Multiskan*[™] FC Mikroplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm.

3.3.2 BrdU-Assay

Der BrdU-Assay dient der Evaluation der Zellproliferation. Es wurde das *Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminiscent) Kit* verwendet. Zunächst wurden die Zellen in einer speziellen 96-Loch-Platte ausgesät und transfiziert. Je Probe wurden dafür 6 Vertiefungen benötigt, davon 4 als eigentliche Probe und 2 zur Hintergrundmessung. Nach 48 Stunden wurden 100 µl der BrdU-Lösung (im Verhältnis 1:1 000 mit DMEM verdünnt) in die Vertiefungen zur Probenmessung gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 4 Stunden. 10 Minuten bevor diese Zeit abgelaufen war, gab man dieselbe Menge der Lösung in die Vertiefungen zur Hintergrundmessung. Das Reagenz Bromodesoxyuridin (BrdU) konnte währenddessen von der Zelle aufgenommen werden. In seiner phosphorylierten Form wurde es in die neu synthetisierte DNA eingebaut.

Zur anschließenden Auswertung erfolgte eine Fixierung der Zellen und partielle Denaturierung der DNA, eine Markierung mit einem Peroxidase-gebundenen Antikörper, Waschschriffe und die Zugabe eines chemolumineszenten Substrats (Luminol). Die Chemolumineszenz kommt erst durch eine Reaktion der Peroxidase mit dem Luminol zustande und wurde schließlich am Luminometer Centro LB 960 detektiert.

3.3.3 Time-Lapse-Analyse

Diese Methode eignet sich besonders zur Analyse der ungerichteten Zellbewegung. Die Transfektion der Zellen findet hierfür in 6-Loch-Zellkulturplatten statt. Am 2. Tag wurden die Zellen auf eine kollagenisierte Platte umgesetzt und abends die *Time-Lapse-Analyse* (TLA) am *Cell Observer*[®] Fluoreszenzmikroskop gestartet. Während eines Beobachtungszeitraumes von 20 Stunden wurde alle 10 Minuten ein Bild aufgenommen. Zusammengefügt ergab die Gesamtzahl der Bilder ein Video. Mit Hilfe des Einzelzelltrackings kann dann zunächst die Migrationsrate einer einzelnen Zelle als sogenanntes *mean displacement* gemessen werden. Nimmt man anschließend den Durchschnittswert für alle Zellen, so kann daraus das migratorische Potential der gesamten Zellpopulation als *average mean displacement* (AMD) berechnet werden

(Huth 2010). Zur Auswertung diente die Software *Time Lapse Analyzer* (Huth et al., 2011).

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Proteinisolation aus Zellen

Die Zellen wurden zur Proteinisolation in einer mindestens 60 mm Zellkulturschale ausgesät und anschließend 48 Stunden kultiviert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen nun noch im Medium vom Boden der Schale abgelöst, in ein 15 ml-Polypropylengefäß überführt und zentrifugiert. Nach Entfernen des Mediums wurde das daraus entstandene Pellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS ebenfalls abpipettiert. Nun konnten, je nach Größe der Pellets, zwischen 150 und 250 µl einer Mischung aus PBS, ProteaseArrest™ und Phosphoprotease-Inhibitoren hinzugegeben werden. Im Anschluss erfolgte die Homogenisierung der Zellen mit Hilfe einer Ultraschallsonde.

Tabelle 3.5: Ansatz zur Proteinisolation inklusive Phosphoprotease-Inhibitoren

Reagenz	Menge
EDTA (0,5 M)	1 µl
NaVO ₃ (100 mM)	20 µl
PMSF (100 mM)	10 µl
Na ₄ P ₂ O ₇ x 10H ₂ O (100 mM)	25 µl
NaF (1 M)	50 µl
ProteaseArrest™ 100x	10 µl
PBS	884 µl

3.4.2 Proteinbestimmung nach *Bradford*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der *Bradford*-Methode. Dafür wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte je 1-2 µl der jeweiligen Probe zu 150 µl Coomassie Plus™ *Protein Assay*-Reagenz gegeben. Zusätzlich erstellte man in Doppelbestimmung eine Kalibrierkurve mit BSA in festgelegten Konzentrationen (z. B. 2 µg, 4 µg, 6 µg und 8 µg). Die zwei Vertiefungen in der oberen linken Ecke mussten dabei zwecks Leerwertbestimmung nur mit Coomassie-Lösung gefüllt werden. Die photometrische Messung fand am Multiskan™ FC Mikroplatten-Photometer bei einer

Wellenlänge von 595 nm statt. Anhand der Kalibrierungskurve und der gemessenen Absorption konnte schließlich die Proteinkonzentration errechnet werden.

3.4.3 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) diente der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem angelegten elektrischen Feld. Zur Vorbereitung der Proteinprobe wurden 50 µl von dieser zunächst mit 7 µl DTT und 16 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Das Erhitzen führte zur Denaturierung der Proteinstruktur und das DTT brach zusätzlich etwaige Disulfidbrücken auf. SDS, ein anionisches Tensid, sollte an die Proteine binden, sodass deren Eigenladung maskiert wurde und sie für die Elektrophorese einheitlich negativ geladen waren.

Vor Beginn der Durchführung wurden alle benötigten Puffer in ausreichender Menge angesetzt.

Tabelle 3.6: Puffer für die SDS-PAGE

Trenngelpuffer		Sammelgelpuffer	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
Tris Base 1,5 M	36,34 g/200 ml	Tris Base 1,5 M	12,11 g/200 ml
SDS 0,4 %	4 ml, 20 %	SDS 0,4 %	4 ml, 20 %
pH 8,8 einstellen		pH 6,8 einstellen	
10x Laufpuffer		4x SDS Probenpuffer	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
Tris Base 250 mM	30,3 g/1 l	Tris HCl 253 mM	2 g
Glycin 1,92 M	144 g/1 l	Bromphenolblau	25 mg
SDS 1 %	10 g/1 l	H ₂ O	25 ml
„fertige“ Sammelgellösung		mit Glycerol auf 45 ml auffüllen	
Reagenz	Menge	pH 6,8 einstellen	
Sammelgelpuffer	25 ml	SDS 20 %	5 ml
H ₂ O	59 ml		
Acrylamidlösung	16 ml		
bei 4 °C aufbewahren			

Als nächstes wurden die Gele für die Elektrophorese gegossen. Je nachdem, welche Proteingröße man später detektieren wollte, entschied man sich für ein höher- oder niedrigerprozentiges Gel (10 % bei Proteinen > 100 kDa, 12 % bei Proteinen zwischen

30 und 100 kDa, 15 % bei Proteinen < 30 kDa). Die Gele wurden zwischen zwei in die Elektrophoresekammer eingespannte saubere Glasplatten gegossen. Zunächst wurde das Stopgel gegossen. Dazu wurde pro Gel 250 µl der Trenngellösung ohne APS und TEMED verwendet. Dieser Lösung fügte man je 2,5 µl APS und TEMED zur Polymerisation hinzu und pipettierte diese Stopgellösung zwischen die Glasplatten. Nach der Polymerisation konnte nun das Trenngel bis etwa 5 mm unterhalb der Probenaschen gegossen werden. Sofort danach füllte man mit Sammelgel bis zum oberen Rand der Glasplatten auf. Abschließend steckte man den Kamm für die Geltaschen luftblasenfrei hinein.

Tabelle 3.7: Ansatz für 2 Gele

Trenngel				Sammelgel	
Reagenz	Menge			Reagenz	Menge
	10 %	12 %	15 %	„Fertige“ Sammelgellösung	4 ml
H ₂ O	4,4 ml	3,6 ml	2,4 ml		
Trenngelpuffer	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml		
Acrylamidlösung	4,0 ml	4,8 ml	6,0 ml		
Glycerol 87 %	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml		
erst kurz vor dem Gießen hinzufügen				erst kurz vor dem Gießen hinzufügen	
APS 10 %	20 µl	20 µl	20 µl	APS 10 %	10 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	TEMED	10 µl

Nach etwa 1 Stunde war das komplette Gel polymerisiert und der Kamm konnte wieder entfernt werden. Die Elektrophoresekammer wurde jetzt mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben und ein entsprechender Proteinstandard wurden in die Geltaschen geladen und die SDS-PAGE gestartet. Bis zur Grenze zwischen Sammel- und Trenngel wurden konstant 120 V eingestellt. Danach konnte auf bis zu 200 V erhöht werden.

3.4.4 Western-Blot

Vor Beginn der Durchführung erfolgte auch hier der Ansatz aller benötigten Puffer in ausreichender Menge.

Tabelle 3.8: Puffer für *Western-Blot*

Blotting-Puffer		10x Tris buffered Saline (TBS)		1x TBS Tween 20 (TBST)	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
10x Laufpuffer ohne SDS	100 ml	Tris Base	24,2 g	10x TBS	100 ml
Methanol	200 ml	NaCl	80 g	H ₂ O	900 ml
H ₂ O	700 ml	H ₂ O	ca. 985 ml	Tween 20	1 ml
		HCl 37 %	ca. 15 ml		
		pH 7,6 einstellen			

Der Aufbau erfolgte im sogenannten *Blotting*-Rahmen, welcher in einer Schale mit *Blotting*-Puffer lag. Die Anordnung von Anode zu Kathode sah wie folgt aus: Schwamm, Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, Schwamm. Der fertige Rahmen wurde in eine ebenfalls mit diesem Puffer gefüllte *Blotting*-Kammer gestellt. Danach wurde auch hier ein elektrisches Feld angelegt. Die Stromstärke betrug konstant 300 mA, allerdings stand dieses Feld senkrecht zum Polyacrylamidgel. Auf diese Weise konnten die Proteine auf die Membran übertragen werden. Die für diesen Proteintransfer benötigte Zeit hing von der Größe der zu untersuchenden Proteine ab und betrug etwa 30 Minuten für kleine Proteine und bis zu 90 Minuten für größere Proteine.

3.4.5 Ponceau-Färbung

Mit der Färbung der Membran durch Ponceau S konnte die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft werden. Gleichzeitig sah man, ob die Geltaschen gleichmäßig beladen waren. Dafür wurde die Membran für 5 Minuten in ein Behältnis mit diesem Farbstoff gelegt und auf einem Schüttler platziert. Destilliertes Wasser entfärbte die Membran anschließend wieder bis zum gewünschten Aussehen. Die so präparierte Membran konnte nun zur Archivierung eingescannt werden. Anschließend entfärbte man die Membran wieder komplett mit TBST.

3.4.6 Immundetektion

Zunächst erfolgte die Blockade der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen auf den transferierten Proteinen. Dies geschah durch die Zugabe von 2 g Magermilchpulver, welche in 40 ml TBST gelöst wurden, sodass ein 5 %iger *Blocking*-Puffer entstand. Darin wurde die Membran etwa 2 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert.

Über Nacht wurde ein erster Antikörper auf die Membran gegeben und bei 4 °C ebenfalls auf einem Kippschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde vier Mal je 10 Minuten mit TBST gewaschen. Auf diese Weise konnte sowohl nicht als auch schwächer oder unspezifisch gebundener Antikörper entfernt werden. Danach wurde der zweite *horseradish*-Peroxidase-gekoppelte (HRP-gekoppelt) Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet spezifisch an den *fragment crystallizable*-Teil (F_c-Teil) des Erstantikörpers. Nach einer einstündigen Inkubation in *Blocking*-Puffer bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler und erneutem viermaligem Waschen mit TBST gab man das ECL-Reagenz auf die Membran. Die Peroxidase reagierte mit diesem Reagenz, was zur Folge hatte, dass die Membran nun Licht emittierte. Dieses Licht konnte mit Hilfe der *ChemoCam* detektiert werden. Mit dieser wurden zur Archivierung zusätzlich Fotografien der Membran erstellt.

Um nochmals zu kontrollieren, ob die Beladung der Geltaschen gleichmäßig erfolgte, wurde ein β -Aktin-Antikörper auf die Nitrocellulosemembran gegeben und das Ganze bei 4 °C für 2 Stunden auf einem Kippschüttler inkubiert. Dieser Aktin-Antikörper war bereits HRP-gekoppelt und somit fiel die Zugabe eines Zweitantikörpers weg. Es wurde hier also nur vier Mal mit TBST gewaschen und anschließend mit ECL entwickelt.

3.5 Statistische Methoden

Allen Ergebnissen lagen mindestens n=3 unabhängige, reproduzierbare Versuche zugrunde. Zusätzlich wurde sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung bezogen auf eine Kontroll-siRNA berechnet. Es wurde ein einseitiger *student's* t-Test durchgeführt, bei dem ein $p < 0,05$ als signifikant (*), $p < 0,01$ als sehr signifikant (**) und $p < 0,001$ als hoch signifikant (***) galt. Zur Auswertung wurde das Programm Microsoft Excel verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 NPC2

4.1.1 NPC2 wird in pankreatischem Tumorgewebe und Zelllinien überexprimiert

Die Genexpression von *NPC2* in pankreatischen Gewebeproben wurde zunächst mittels qRT-PCR quantifiziert. Dazu wurde isolierte mRNA aus diesen Proben verwendet. Im Gewebe aus Pankreaskarzinomen zeigte sich jeweils im Vergleich zu Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis und Patienten mit gesundem Spendergewebe eine hoch signifikante Überexpression von *NPC2* ($p < 0,001$). Kein signifikanter Unterschied in der Genexpression zeigte sich hingegen im Vergleich von chronischer Pankreatitis zu gesundem Spendergewebe ($p = 0,215$). Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse.

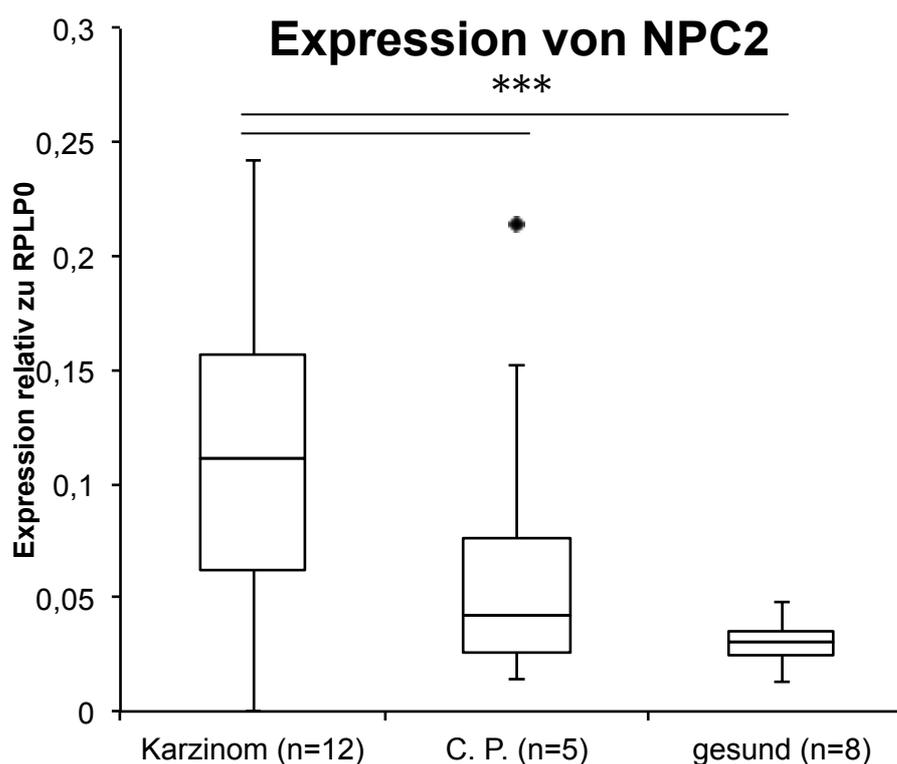


Abbildung 4.1: Expression von *NPC2* in Proben aus pankreatischem Gewebe.

Dieser *Box-and-Whisker-Plot* zeigt die Expression von *NPC2* auf mRNA-Level in n=25 Proben pankreatischen Gewebes. Gemessen wurden die dargestellten Werte mittels qRT-PCR und normalisiert wurde auf die Expression von *RPLP0*. Dargestellt sind der Median, die 0,25- und 0,75-Quantilen (*Box*)

sowie die Werte innerhalb des 1,5 fachen Interquartilsabstands (*Whisker*). Ausreißer werden als Rauten ober- und unterhalb der *Whisker* dargestellt. Das Gen wurde im Gewebe aus Pankreaskarzinomen jeweils im Vergleich zu Gewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis und Patienten mit gesundem Spendergewebe hoch signifikant überexprimiert ($p < 0,001$). Karzinom = Pankreaskarzinom, C. P. = chronische Pankreatitis, gesund = gesundes Spendergewebe; n = Probenanzahl, *** = $p < 0,001$.

Auch eine Expressionsanalyse in den gängigsten Pankreaskarzinomzelllinien wurde durchgeführt. Die Ergebnisse der qRT-PCR sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Im Vergleich standen sich hierbei transformierte pankreatische Krebszellen mit der nicht-transformierten *human pancreatic duct epithelial*-Zelllinie (HPDE) und der nicht-pankreatischen *human embryonic kidney*-Zelllinie (HEK-293) gegenüber. Die höchste relative Expression von *NPC2* fand sich in IMIM-PC2, eine mittlere Expression in PaTu-8988t und BxPC3, die niedrigste in S2-007. Die Auswahl fiel somit auf diese vier Zelllinien als repräsentative Stichprobe.

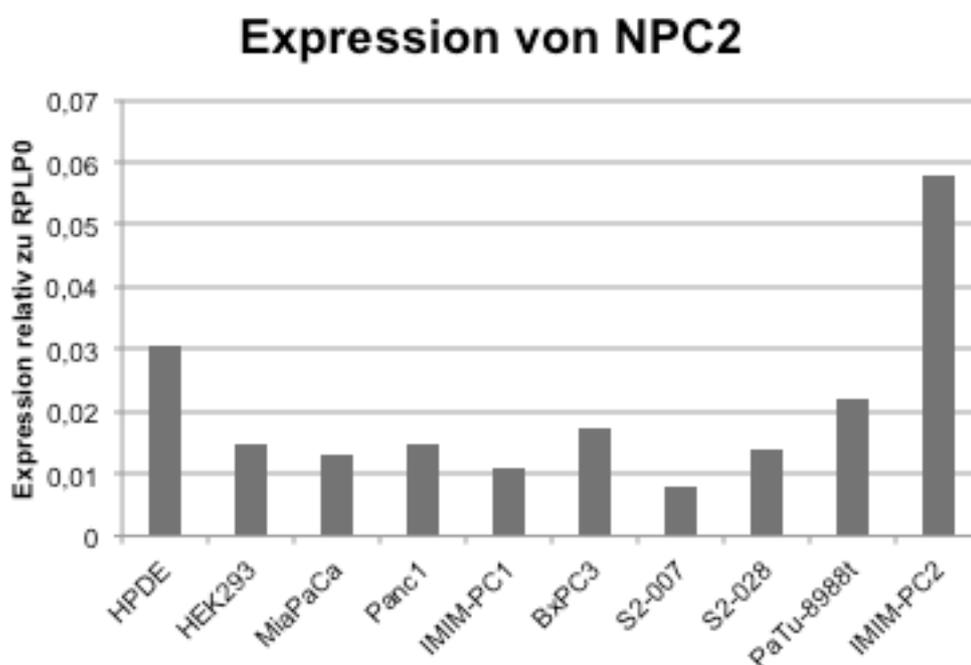


Abbildung 4.2: Expression von *NPC2* in verschiedenen Zelllinien.

Die Expression von *NPC2* auf mRNA-Level in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien wurde mittels qRT-PCR ermittelt und auf *RPLP0* normalisiert. Zum Vergleich wurde zudem die Expression in der nicht-transformierten Zelllinie HPDE und der nicht-pankreatischen, nicht-transformierten Zelllinie HEK-293 bestimmt und hier aufgetragen.

4.1.2 *Knockdown*-Effizienz von *NPC2* gemessen in der qRT-PCR

Die *Knockdown*-Effizienz wurde regelmäßig auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR kontrolliert und war konstant nachweisbar. Abbildung 4.3 zeigt n=3 dieser Versuche je verwendeter Zelllinie. Es zeigte sich außerdem in allen Zelllinien außer IMIM-PC2,

dass durch den Prozess der Transfektion allein (*non-silencing*-Kontrolle) die Expression von *NPC2* hochreguliert wurde. Ein solcher Effekt allein durch den Stress der Transfektion kann möglicherweise schon als Hinweis auf eine Bedeutung des Gens für das Zellüberleben (onkogenes Potential) gedeutet werden.

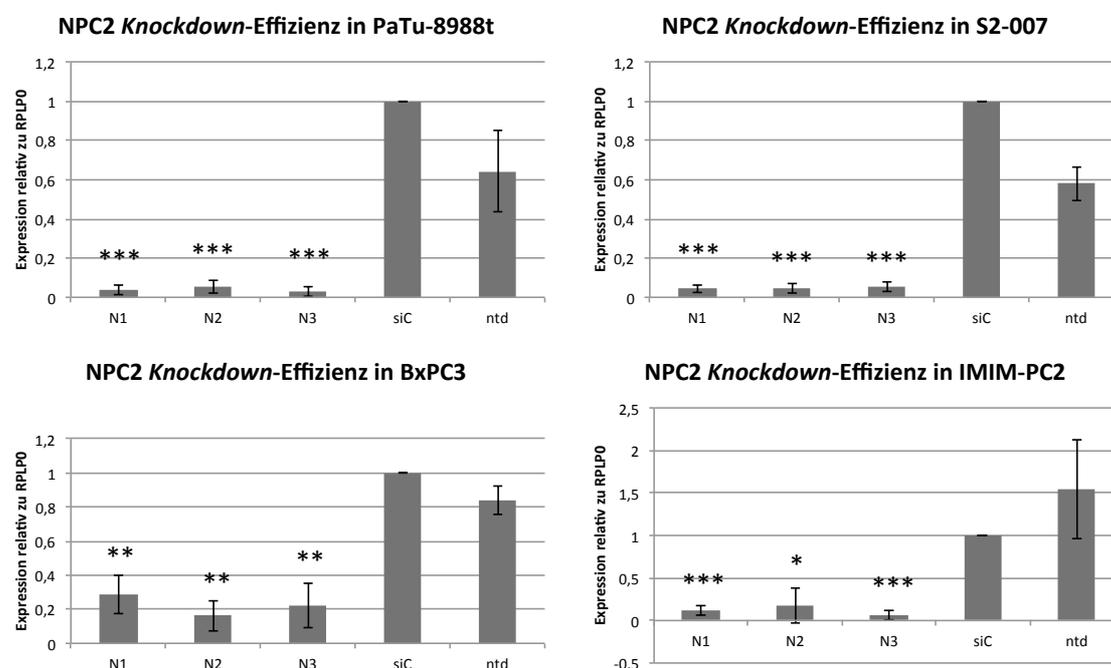


Abbildung 4.3: Effizienz des transienten *Knockdown* von *NPC2* auf mRNA-Ebene.

Mittels qRT-PCR wurde die *Knockdown*-Effizienz regelmäßig kontrolliert. Normalisiert wurde dabei zunächst auf die Expressionslevel des Referenzgens *RPLP0* und anschließend auf die *non-silencing*-Kontrolle. Im Diagramm dargestellt werden n=3 Versuche pro Zelllinie. N1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *NPC2*; siK = *non-silencing*-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.1.3 Transienter *Knockdown* von *NPC2* beeinflusst die Zellvitalität und Zellproliferation im Pankreaskarzinom nicht akut

Nach Feststellung der Überexpression von *NPC2* in pankreatischen Gewebeproben sowie verschiedenen Zelllinien sollte in den folgenden Versuchen die funktionelle Relevanz dieser *NPC2*-Expression in Pankreaskarzinomzellen ermittelt werden. Hierzu wurde zunächst die Zellvitalität mit Hilfe von MTT-Assays 72 Stunden nach der Transfektion analysiert. Mindestens drei voneinander unabhängige Versuche wurden je Zelllinie durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine Transfektion mit siRNA gegen *branched chain ketoacid dehydrogenase kinase (BCKDK)* vorgenommen. Bislang unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass der *Knockdown* dieses Gens in den von mir verwendeten Zelllinien sehr effizient war. Zudem konnte nach Repression von *BCKDK* jeweils ein Rückgang der Zellvitalität sowie der

Zellproliferation beobachtet werden. Normalisiert wurde auf die *non silencing*-Kontrolle (siK).

In den Zelllinien PaTu-8988t, S2-007 und IMIM-PC2 zeigte sich keine Verminderung der Zellvitalität als Reaktion auf den transienten *Knockdown* von *NPC2*. Lediglich in der Zelllinie BxPC3 kam es zur Abnahme der Vitalität um etwa 20 % in den mit siRNA N2 und etwa 30 % in den mit siRNA N3 transfizierten Zellen verglichen mit der *non silencing*-Kontrolle. Diese Ergebnisse waren mit $p < 0,01$ hoch signifikant. Die Ergebnisse der MTT-Assays aller untersuchten Zelllinien im Detail zeigt Abbildung 4.4.

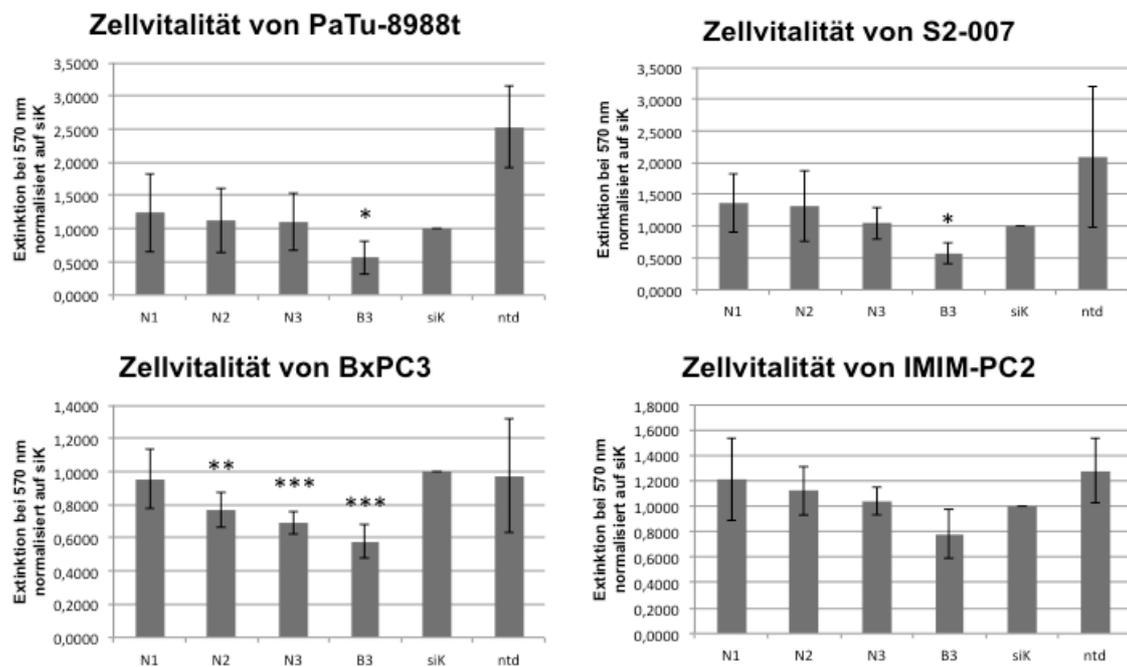


Abbildung 4.4: Zellvitalität nach Repression von *NPC2*.

Es wurden je Zelllinie $n=3$ MTT-Assays durchgeführt und auf die *non-silencing*-Kontrolle normalisiert. Lediglich bei der Zelllinie BxPC3 kam es zur Abnahme der Zellvitalität, in den mit N2 transfizierten Zellen um etwa 20 % und in den mit N3 transfizierten Zellen um etwa 30 %. Diese Ergebnisse waren jeweils mit $p < 0,01$ hoch signifikant. N1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *NPC2*; B3 = siRNA gegen *BCKDK* (Positivkontrolle); siK = *non-silencing*-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung der Überexpression von *NPC2* in pankreatischem Gewebe wurde des Weiteren die Zellproliferation mit Hilfe von BrdU-Assays 48 Stunden nach der Transfektion analysiert. Es wurden je Zelllinie mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Als Positivkontrolle diente auch hier die Transfektion mit siRNA gegen *BCKDK*. Normalisiert wurde auf die *non-silencing*-Kontrolle. In den Zelllinien PaTu-8988t, S2-007, IMIM-PC2 und BxPC3 zeigte sich keine Verminderung in der Zellproliferation als Reaktion auf den transienten

Knockdown von *NPC2*. Die Ergebnisse der BrdU-Assays aller untersuchten Zelllinien im Detail zeigt Abbildung 4.5.

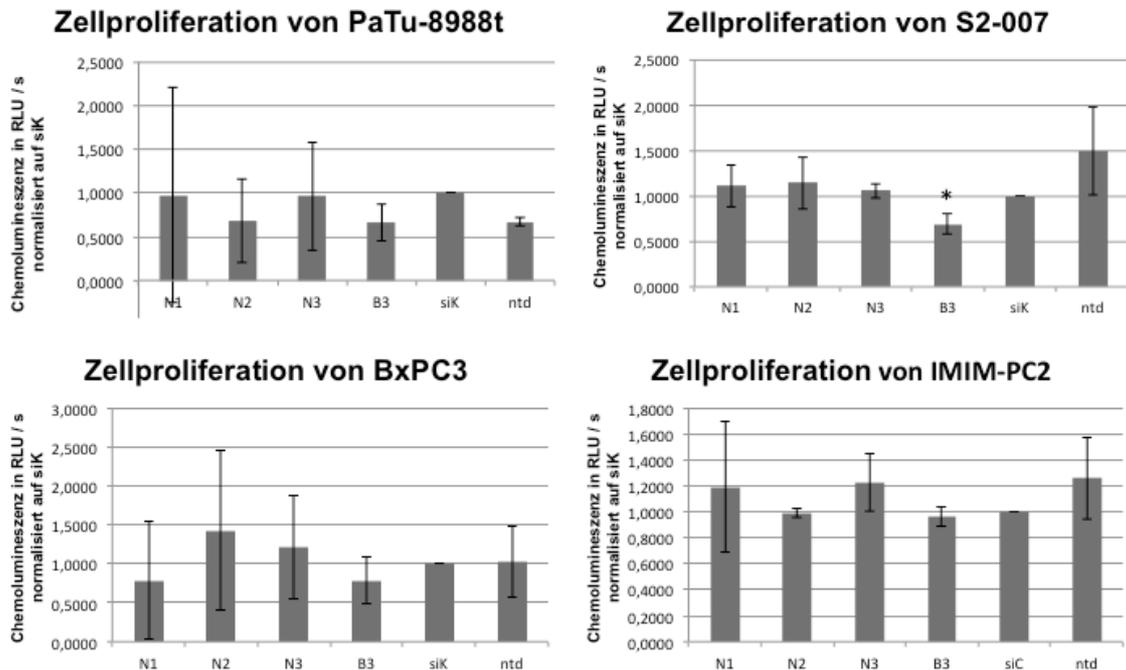


Abbildung 4.5: Zellproliferation nach Repression von *NPC2*.

Es wurden je Zelllinie $n=3$ BrdU-Assays durchgeführt und auf die *non-silencing*-Kontrolle normalisiert. Keine der untersuchten Zelllinien zeigte eine Verminderung in der Zellproliferation als Reaktion auf den transienten *Knockdown* von *NPC2*. N1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *NPC2*; B3 = siRNA gegen *BCKDK*; siK = *non-silencing*-Kontrolle; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.1.4 Transienter *Knockdown* von *NPC2* beeinflusst ungerichtete Zellbewegung im Pankreaskarzinom nicht akut

Zur weiteren Aufklärung der funktionellen Relevanz von *NPC2* im Pankreaskarzinom wurde zudem die ungerichtete Zellbewegung für die Zelllinie S2-007 untersucht. Drei voneinander unabhängige *Time-Lapse*-Analysen wurden durchgeführt und anschließend die unter dem Mikroskop aufgenommenen Videos mit Hilfe der Software *Time Lapse Analyzer* (Huth et al., 2011) ausgewertet. Es konnte jedoch keine Beeinträchtigung der ungerichteten Zellbewegung nach transientem *Knockdown* von *NPC2* detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Analyse im Detail finden sich in Abbildung 4.6.

ungerichtete Zellbewegung in S2-007

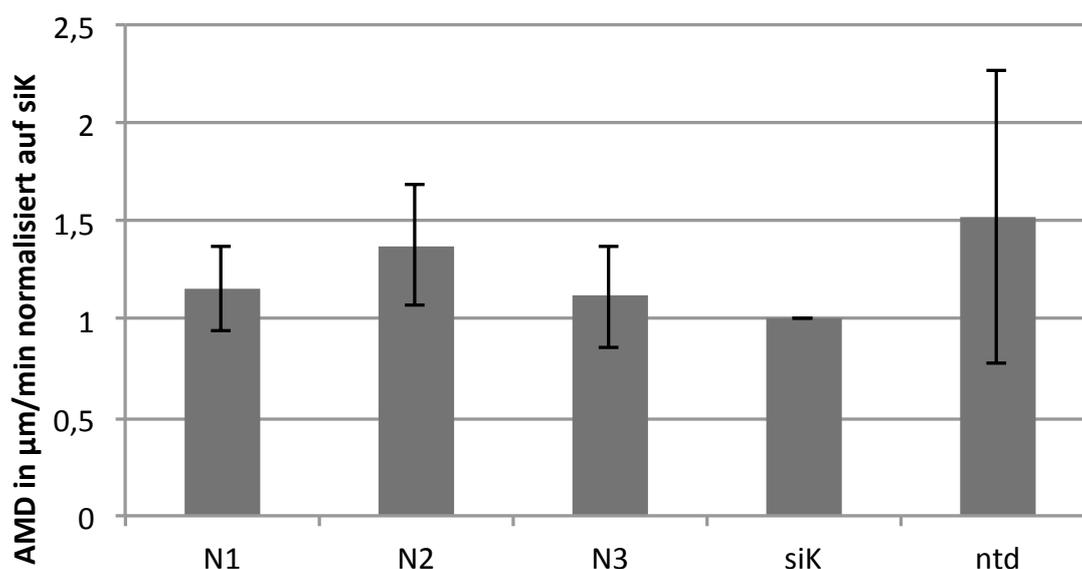


Abbildung 4.6: Ungerichtete Zellbewegung nach Repression von NPC2.

Es wurden $n=3$ *Time-Lapse*-Analysen durchgeführt, auf die *non-silencing*-Kontrolle normalisiert und die Mittelwerte im Diagramm dargestellt. In der untersuchten Zelllinie S2-007 zeigte sich keine Beeinträchtigung der ungerichteten Zellbewegung als Reaktion auf den transienten *Knockdown* von NPC2. N1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen NPC2; siK = *non-silencing*-Kontrolle.

Die Ergebnisse des Screenings gaben zunächst Anlass zur Annahme, dass NPC2 ein zelluläres Überlebensgen oder vielleicht sogar Onkogen darstellt und es konnte zudem gezeigt werden, dass das Kandidatengen in pankreatischem Gewebe sowie einigen Zelllinien deutlich überexprimiert wird. Dennoch waren abschließend trotz der guten Ausgangslage in transienten *Knockdown*-Ansätzen keine akuten zellautonomen Effekte der NPC2-Repression in Pankreaskarzinomzelllinien nachweisbar. Aus zeitlichen Gründen wurde das Kandidatengen im Rahmen dieser Arbeit deshalb für zusätzliche Analysen nicht weiter verfolgt.

4.2 ADRBK1

4.2.1 Vorversuche der Arbeitsgruppe zu ADRBK1

Parallel zu den Versuchen zur NPC2-Repression wurde begonnen ein weiteres Kandidatengen zu untersuchen. Hierbei handelte es sich um das Gen ADRBK1. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe konnte für dieses bereits gezeigt werden, dass es sowohl in Gewebe aus Pankreaskarzinomen als auch in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien überexprimiert wird. Rekombinante Überexpression in

Zelllinien ohne endogene Expression beschleunigte das Zellwachstum, während RNAi-vermittelter *Knockdown* endogener *ADRBK1*-Expression zu einer signifikanten Abnahme der Zellvitalität und Zellproliferation führte (siehe auch Abbildung 4.7, Buchholz et al., 2015). Unklar war jedoch, über welche molekularen Mechanismen und/oder Signalwege diese Wachstumsinhibition vermittelt wird. In *Western-Blot*-Analysen sollten daher einige zentrale Regulationsmechanismen auf eine mögliche Beteiligung hin untersucht werden.

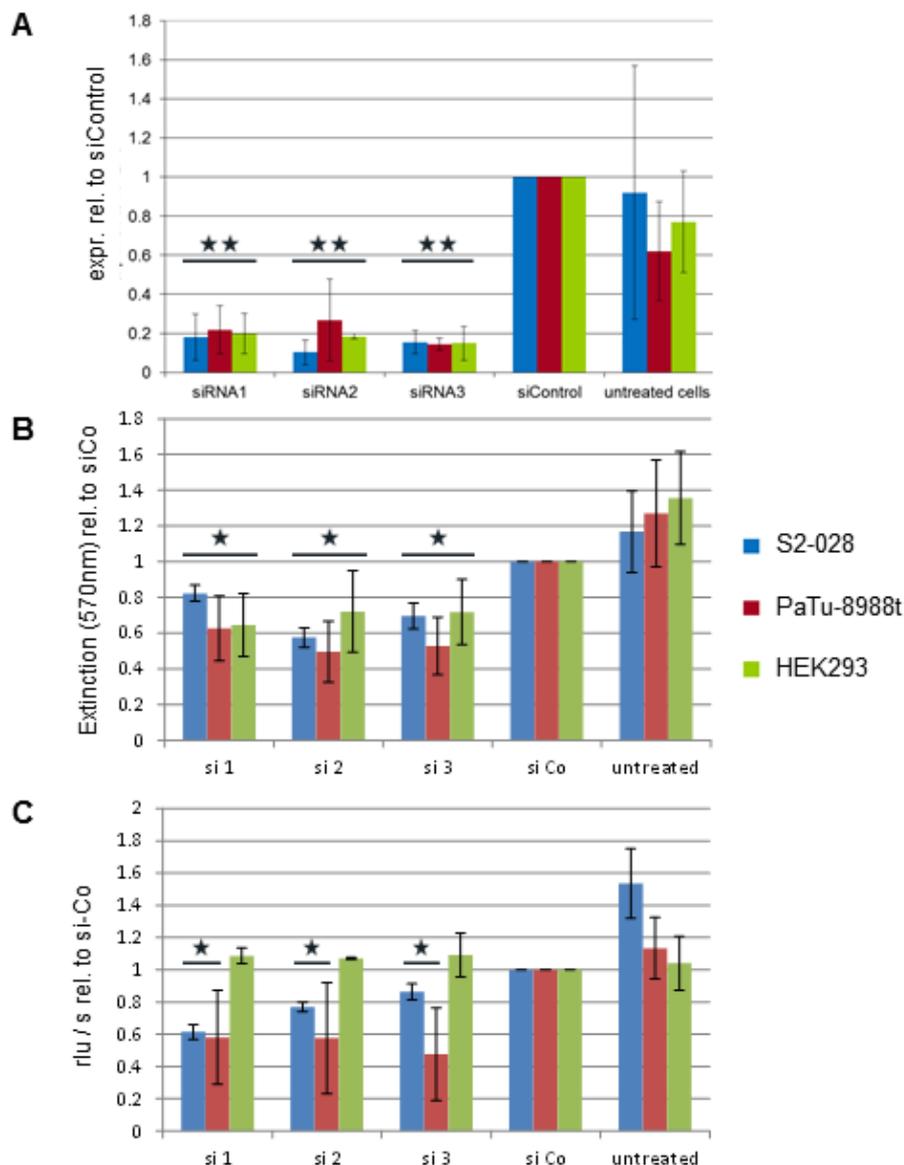


Abbildung 4.7: Knockdown der *ADRBK1*-Expression führt zur signifikanten Abnahme der Zellvitalität und Zellproliferation.

A: Mittels qRT-PCR wurde die *Knockdown*-Effizienz regelmäßig kontrolliert. Normalisiert wurde dabei zunächst auf die Expressionslevel des Referenzgens *RPLP0* und anschließend auf die *non-silencing*-Kontrolle. Im Diagramm dargestellt werden n=3 Versuche pro Zelllinie. B: Es wurden je Zelllinie n=3 MTT-

Assays durchgeführt und auf die *non-silencing*-Kontrolle normalisiert. Die Abnahme der Zellvitalität war in allen untersuchten Zelllinien mit $p < 0,05$ signifikant. C: Es wurden je Zelllinie $n=3$ BrdU-Assays durchgeführt und auf die *non-silencing*-Kontrolle normalisiert. Die Abnahme der Zellproliferation war in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (S2-028, PaTu-8988t) mit $p < 0,05$ signifikant, während untransformierte HEK293-Zellen keine Proliferationsminderung zeigten. si1/2/3 bzw. siRNA 1/2/3= verschiedene siRNAs gegen *ADRBK1*; siCo/siControl = *non-silencing*-Kontrolle * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ (modifiziert nach Buchholz et al., 2015)

4.2.2 Knockdown von *ADRBK1* führt zur Induktion von Apoptose

Um festzustellen, auf welchem Weg die oben beschriebenen Effekte vermittelt wurden, wurden in den beiden Zelllinien S2-028 und PaTu-8988t *Western-Blot*-Analysen durchgeführt. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob die Repression von *ADRBK1* einen Effekt auf verschiedene Signalkaskaden und darin involvierte Proteine hatte. Die verwendeten Proteinextrakte wurden 72 Stunden nach Transfektion aus den Zellen gewonnen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Je Zelllinie und untersuchtem Protein wurden mindestens drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die *Knockdown*-Effizienz wurde regelmäßig auf Proteinebene kontrolliert und war konstant in vergleichbarer Stärke nachweisbar (siehe Abbildung 4.8).

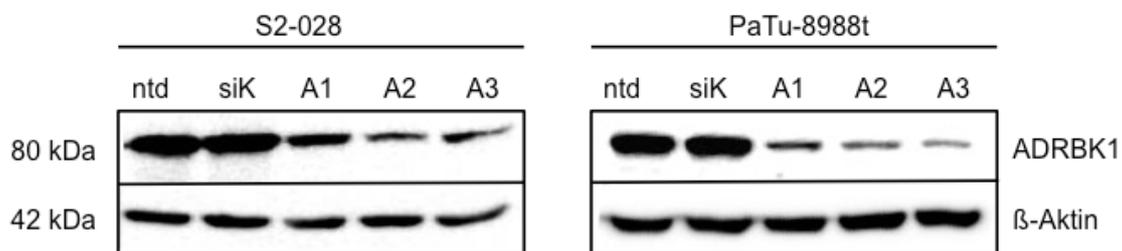


Abbildung 4.8: Effizienz des transienten *Knockdown* von *ADRBK1* auf Proteinebene.

Exemplarische Darstellung der *Knockdown*-Effizienz auf Proteinlevel im *Western-Blot* in den Zelllinien S2-028 und PaTu-8988t. Die Proteinisolation erfolgte 48 h nach der Transfektion mit 3 verschiedenen siRNAs. Anschließend wurde ein anti-*ADRBK1*-Antikörper (Verdünnung 1:1.000) zum Nachweis verwendet. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. A1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *ADRBK1*; siK = *non-silencing*-Kontrolle.

Aus MTT-Assays war bereits bekannt, dass die Zellvitalität nach Repression von *ADRBK1* reduziert war. Zusätzlich konnte visuell eine erhöhte Anzahl toter Zellen festgestellt werden. Um herauszufinden, ob dieser Effekt Apoptose-vermittelt war, wurden zunächst die beiden Proteine Caspase 3 und *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) untersucht, welche beim Eintritt der Zelle in die Apoptose gespalten werden und somit als Marker für diese gelten. Die Proteinlevel dieser Proteine und die ihrer Spaltprodukte *cleaved* Caspase 3 und *cleaved* PARP erwiesen sich in der Zelllinie S2-

028 nach transientem *Knockdown* von *ADRBK1* als unverändert, während in der Zelllinie PaTu-8988t ein schwaches Signal des *cleaved* Caspase 3-Proteins auftrat. Die Spaltung des PARP-Proteins war hier sehr deutlich sichtbar.

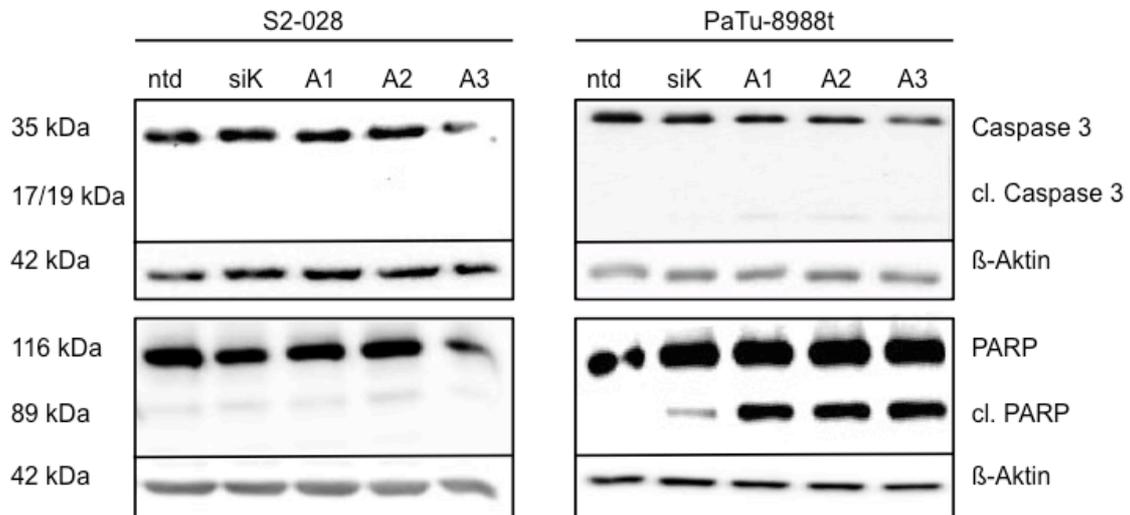


Abbildung 4.9: Effekt der *ADRBK1*-Repression auf die Apoptosemarker Caspase 3 und PARP.

In n=3 Western-Blot-Analysen wurden die Zelllinien mithilfe von Caspase 3-, *cleaved* Caspase 3- und PARP-Antikörpern bezüglich ihrer Apoptose-Signale analysiert. Die Proteinisolierung erfolgte 48 h nach der Transfektion. Lediglich in der Zelllinie PaTu-8988t war eine Spaltung der beiden Proteine sichtbar. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, cl. Caspase 3 = *cleaved* Caspase 3; cl. PARP = *cleaved* PARP; A1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *ADRBK1*; siK = *non silencing*-Kontrolle.

Die Induktion von Apoptose nach *Knockdown* von *ADRBK1* war, wie in Abbildung 4.9 ersichtlich, Zelllinien-abhängig und somit höchstwahrscheinlich nicht alleinverantwortlich für die im BrdU- und MTT-Assay beobachtete Wachstumsinhibition. Im Folgenden sollten daher weitere mögliche Ursachen für die gezeigte reduzierte Zellvitalität und –proliferation nach *ADRBK1*-*Knockdown* gesucht werden. Dafür wurden Proteine des Zellzyklus wie die Cycline A und D1, die beiden *cyclin-dependent kinase* Inhibitoren 1A/B (CDKN1A/p21 und CDKN1B/p27) sowie das Regulatorprotein pRB untersucht. Hierbei konnte jedoch weder bei den Cyclinen A und D1, noch bei den Zellzyklus-assoziierten Proteinen CDKN1A/p21, CDKN1B/p27 und pRB ein veränderter Proteinlevel festgestellt werden (siehe Abbildung 4.11 und Abbildung 4.11).

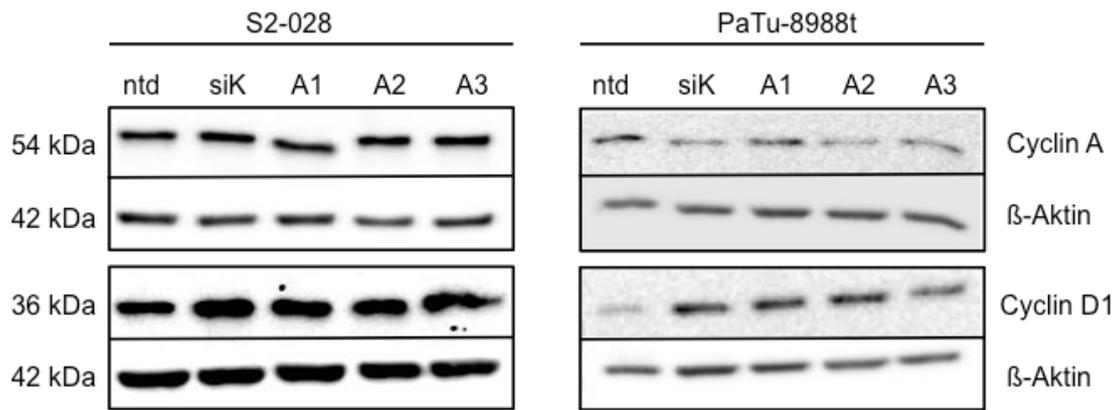


Abbildung 4.10: Effekt der *ADRBK1*-Repression auf Zellzyklusproteine.

In $n=3$ *Western-Blot*-Analysen wurden die Zelllinien mithilfe von Cyclin A und Cyclin D1-Antikörpern auf Effekte bezüglich des Zellzyklus nach *ADRBK1-Knockdown* analysiert. Die Proteinisolierung erfolgte 48 h nach der Transfektion. In den Zelllinien S2-028 und PaTu-8988t zeigte keines der Zellzyklusproteine Cyclin A und Cyclin D1 im *Western-Blot* einen veränderten Level nach transientem *ADRBK1-Knockdown*. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, A1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *ADRBK1*; siK = *non-silencing*-Kontrolle.

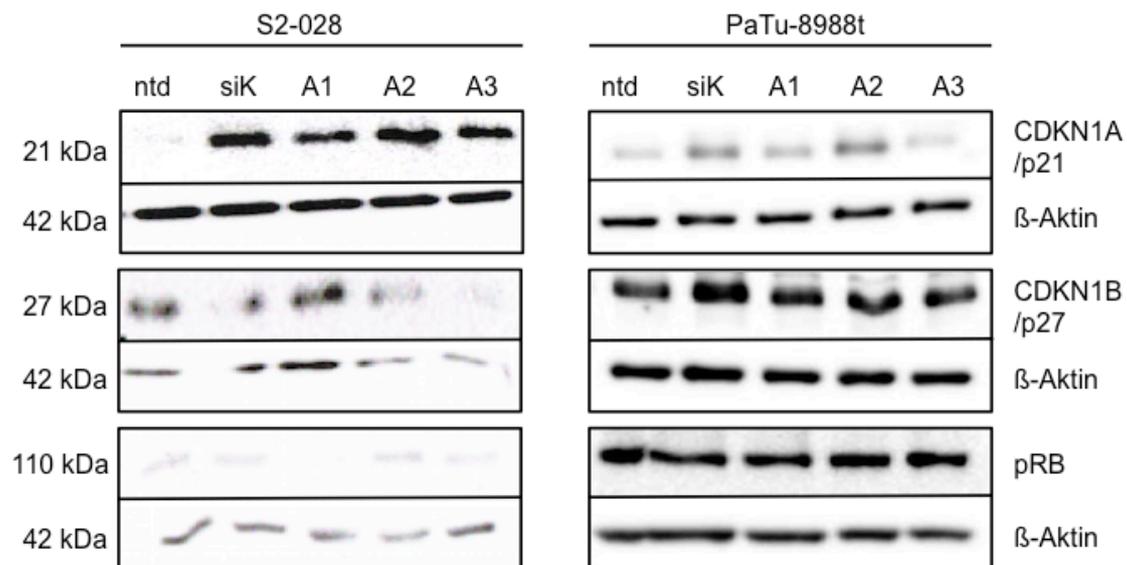


Abbildung 4.11: Effekt der *ADRBK1*-Repression auf Zellzyklus-assoziierte Proteine.

In $n=3$ *Western-Blot*-Analysen wurden die Zelllinien mithilfe von CDKN1A-, CDKN1B- und pRB-Antikörpern auf Effekte bezüglich des Zellzyklus nach *ADRBK1-Knockdown* analysiert. Die Proteinisolierung erfolgte 48 h nach der Transfektion. In den Zelllinien S2-028 und PaTu-8988t zeigte keines der Zellzyklus-assoziierten Proteine CDKN1A/p21, CDKN1B/p27 und pRB im *Western-Blot* einen veränderten Level nach transientem *ADRBK1-Knockdown*. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, A1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *ADRBK1*; siK = *non-silencing*-Kontrolle.

Das Protoonkogen *MYC* beeinflusst als Transkriptionsfaktor unter anderem die Expression von wachstumsfördernden Genen und somit den Zellzyklus. Es spielt

zudem eine Rolle beim programmierten Zelltod. Um zu überprüfen, ob die Repression von *ADRBK1* einen Einfluss auf die an diesen beiden Prozessen beteiligten Kaskaden hat, wurde auch der Proteinlevel von *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* (c-myc) im *Western-Blot* untersucht. Hierbei konnte, wie in Abbildung 4.12 ersichtlich, jedoch keine Veränderung des Proteinlevels festgestellt werden.



Abbildung 4.12: Effekt der *ADRBK1*-Repression auf das Protoonkogen *MYC*.

In n=3 *Western-Blot*-Analysen wurden die Zelllinien mithilfe von c-myc-Antikörpern auf Effekte bezüglich der mit diesem Protoonkogen assoziierten Signalkaskaden nach *ADRBK1-Knockdown* analysiert. Die Proteinisolierung erfolgte 48 h nach der Transfektion. Die Repression von *ADRBK1* hatte in den Zelllinien S2-028 und PaTu-8988t im *Western-Blot* keine Änderung des Proteinlevels von c-myc zur Folge. Als Ladekontrolle diente β-Aktin, A1/2/3 = verschiedene siRNAs gegen *ADRBK1*; siK = *non-silencing*-Kontrolle.

5 Diskussion

5.1 NPC2

Mit Hilfe von sogenannten Hochdurchsatz-*Screening*-Technologien können heutzutage relativ kostengünstig und zeitsparend neue Gene identifiziert werden, welche mögliche Ansatzpunkte für die Entwicklung neuartiger diagnostischer und therapeutischer Strategien darstellen. Auf diese Weise entstehen zum Beispiel spezifische Gendatenbanken für bestimmte Krebsarten wie das Pankreaskarzinom. Die Gene werden anschließend in den meisten Fällen in Einzelgenanalysen einer funktionellen Charakterisierung unterzogen.

Auch *NPC2* wurde auf diese Weise als Kandidatengen identifiziert. Es handelte sich hierbei um ein Hochdurchsatz-*Screening*, welches auf der Herstellung einer Transkriptom-basierten shRNA-Bibliothek beruhte. Nach Transduktion der so entstandenen shRNAs in Pankreaskarzinomzelllinien und 5-wöchiger Kultivierung konnte eine Depletion oder Anreicherung bestimmter Konstrukte festgestellt werden. *NPC2* gehörte zu den depletierten Konstrukten, d.h. die Zellen konnten nach *Knockdown* nicht überleben. Man schloss daher auf eine überlebenswichtige Funktion dieses Gens in den Krebszellen und das Gen wurde als potentielles Onkogen für weitere funktionelle Analysen ausgewählt.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels funktioneller Assays die genaue Aufgabe von *NPC2* in Pankreaskarzinomzelllinien aufzudecken. Dazu wurde die Zellproliferation (BrdU-Inkorporation), -vitalität (MTT-Assay) und -migration (*Time-Lapse-Analyse*) nach transientem *Knockdown* des Gens in verschiedenen Zelllinien untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch lediglich im MTT-Assay für die Zelllinie BxPC3 ein funktioneller Effekt. Es konnte eine Abnahme der Vitalität nachgewiesen werden und zwar um etwa 20 % in den mit siRNA N2 und etwa 30 % in den mit siRNA N3 transfizierten Zellen verglichen mit der *non silencing*-Kontrolle. Diese Ergebnisse waren mit $p < 0,01$ hoch signifikant. In den anderen untersuchten Zelllinien sowie in den anderen Assays konnte ein solcher Effekt hingegen nicht gezeigt werden.

Im Bezug auf die Funktion von *NPC2* in Krebszellen ist noch wenig bekannt und viele Ergebnisse sind sehr widersprüchlich. Eine deutliche Hochregulation des Gens konnte in Gewebe aus Brust-, Kolon- und Lungenkrebs festgestellt werden. In Proben aus Nieren- und Lebertumoren war das Gen hingegen herunterreguliert (Liao et al., 2013). Für das Pankreaskarzinom zeigte sich zunächst in Expressionsanalysen auf mRNA-

Ebene, dass *NPC2* in pankreatischem Tumorgewebe und verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien überexprimiert wird. Dadurch konnte die Hypothese einer klinisch relevanten Funktion des Gens speziell im Pankreaskarzinom weiter gestützt werden.

Hinsichtlich der Bedeutung von *NPC2* konnte des Weiteren festgestellt werden, dass das Gen auch im humanen papillären Schilddrüsenkarzinom hochreguliert ist (Asakawa et al., 2002). *NPC2*-depletierte Zellen eines großzelligen Lungenkarzinoms (*KRAS*-mutiert) wiesen zudem eine signifikante Abnahme der Papillenformation sowie Zellproliferation auf. Zusätzlich zeigten sich für diese Zellen verminderte Apoptoseraten (Sugawara et al., 2011). *NPC2*-Depletion führte in BxPC3-Zellen (*KRAS*-Wildtyp) zur Abnahme der Zellvitalität, wie die durchgeführten MTT-Assays in dieser Arbeit zeigten. Es wurde nicht weiter untersucht, wodurch diese verminderte Zellvitalität zustande kam. Ursachen könnten jedoch zum Beispiel vermehrte Apoptose oder Nekrose der Zellen sein, keinesfalls jedoch verminderte Apoptoseraten wie von Sugawara im Rahmen der Papillenformation berichtet. Eine Abnahme der Zellproliferation im BrdU-Assay konnte in meiner Arbeit ebenfalls nicht beobachtet werden. Die verwendeten Zelllinien sind wahrscheinlich auch aufgrund des unterschiedlichen *KRAS*-Status nicht miteinander vergleichbar und zudem weist das Pankreaskarzinom im Gegensatz zum großzelligen Lungenkarzinom in seinem Wachstum keine Papillenformation auf. Meine Ergebnisse spiegeln deshalb die der Studie von Sugawara nicht wider.

Fibroblasten besitzen für das Pankreaskarzinom eine große Bedeutung. Im Rahmen der desmoplastischen Stromareaktion vermitteln sie unter anderem Chemo- und Strahlenresistenz (Schober et al., 2014). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Tumorinvasion. *NPC2* wurde als negativer Regulator der Fibroblastenaktivierung und somit somatischer Zellplastizität identifiziert. Die *NPC2-Knockdown*-Fibroblasten zeigten eine anhaltende Phosphorylierung der MAPK (Csepegi, Jiang, Kojima, Crofford, & Frolov, 2011). Auch in Zellen des hepatozellulären Karzinoms konnte eine MAPK-Aktivierung nach *NPC2-Knockdown* beobachtet werden (Liao et al., 2013). Ein ähnlicher Effekt lässt sich nach meinen Erkenntnissen aus den durchgeführten Assays nicht auf das Pankreaskarzinom übertragen. Zwar wurde der Proteinlevel der MAPK im Western-Blot nach *NPC2-Knockdown* nicht bestimmt, eine MAPK-Aktivierung hätte jedoch auch eine verstärkte Zellproliferation und somit verstärkte BrdU-Inkorporation zur Folge gehabt. Eine solche war in keiner der verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien nachweisbar. Der Effekt des *Knockdowns* auf die umgebenden Stromazellen wurde nicht untersucht, da die von mir verwendeten Methoden zunächst nur eine Aussage bezüglich zellautonomer Effekte erlaubten.

Besonders im Pankreaskarzinom spielen jedoch auch die umgebenden Stromazellen wie z.B. PSC, Fibroblasten und Tumor-assoziierte Makrophagen und deren Interaktion mit den Krebszellen eine wichtige Rolle. Sie könnten, wie oben erwähnt, ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf Proliferation, Überleben und Invasion der eigentlichen Krebszellen haben. Eine Bedeutung von NPC2 für die Zell-Zell-Interaktion ist deshalb noch nicht ausgeschlossen und sollte für weitere Analysen bezüglich der Funktion von NPC2 im Pankreaskarzinom berücksichtigt werden. Dass NPC2 an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt sein könnte, belegt zum Beispiel eine Studie von Kamata. In isolierten prämaligen Lungenkarzinomzellen aus dem ^{V600E}BRAF-gesteuerten Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass die C-C motif Chemokin Rezeptor 1 (CCR1)-abhängige Rekrutierung unreifer Zellen der Makrophagen-Linie (IMC) durch NPC2 eingeschränkt wird. Diese Wirkung wird auf parakrine Weise vermittelt, indem der CCR1-Ligand Chemokin (C-C motif) Ligand 6 (CCL 6) in den IMC vermehrt abgebaut wird (Kamata et al., 2015).

Auf welchem Weg die Beeinflussung des Wachstums der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC3 durch NPC2 vermittelt wird und welche Signalkaskaden beteiligt sind, bleibt vorerst unklar. Da in den anderen Zelllinien im MTT-Assay keine Abnahme der Vitalität der Zellen festgestellt werden konnte, lässt sich dieser wachstumsfördernde Effekt von NPC2 nicht auf das Pankreaskarzinom im Allgemeinen übertragen. Abschließend lässt sich sagen, dass zellautonome Effekte in Pankreaskarzinomzellen im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen in anderen Zelllinien eher unwahrscheinlich, aber dennoch nicht auszuschließen sind. Aufgrund der von mir verwendeten Methoden ergab sich ein sehr festgelegtes Setting mit einer Inkubationsdauer von höchstens 72 h. Diese deutlich kürzeren Beobachtungszeiträume als zum Beispiel im *Screening* selbst lassen sich durch den Einsatz von siRNA zur Transfektion erklären. Sie eignet sich nicht für die Untersuchung von längerfristigen Effekten eines *Gen-Knockdowns*, da sie nur transient wirkt. Im *Screening* hingegen waren längere Beobachtungszeiträume gegeben, da hier virale Vektoren in die Zellen transduziert wurden und diese somit selbst in der Lage waren shRNA zu produzieren. In diesem Fall handelt es sich um einen persistenten *Knockdown*. Ein Beispiel für Untersuchungen mit längeren Kulturzeiten (10-14 Tage) sind Softagar-Assays zur Untersuchung von Substrat-unabhängigem Wachstum bei Tumorzellen.

Wie bereits oben erwähnt, spielt das Protein NPC2 im Cholesterinstoffwechsel im Rahmen des intrazellulären Cholesterintransports eine wichtige Rolle. Cholesterin selbst ist als Bestandteil der Zellmembran wichtig für das Zellwachstum und über die Ausbildung von Lipidflößen ist es zudem am Ablauf verschiedener Signalkaskaden

(unter anderem Apoptose, Zellzyklus und Metastasierung) beteiligt. Es hat somit für die Karzinogenese und den Metabolismus von Krebszellen eine Bedeutung (Cruz, Mo, McConathy, Sabnis, & Lacko, 2013). Auch im Bereich der *targeted therapies* hat man deshalb Cholesterin als potentielles Ziel bereits untersucht. Dabei konnte in einer Metaanalyse herausgefunden werden, dass die niedrigdosierte Einnahme von Statinen nicht zu einem reduzierten Pankreaskarzinomrisiko führt (Bonovas, Filioussi, & Sitaras, 2008). In Pankreaskarzinomen sowie Zelllinien aus diesem Karzinom fand man eine Anreicherung von Cholesterinestern, vermittelt durch die Acetyl-CoA-Acetyltransferase (ACAT-1). Die Expression dieses Enzyms korrelierte zudem mit einem schlechteren Patienten-Überleben. Die Hemmung der ACAT durch einen Inhibitor oder mittels *shRNA-Knockdown* konnte das Tumorwachstum und die Metastasierung in einem Mausmodell deutlich verringern (Li et al., 2016). Als potentielles Onkogen ist *NPC2* daher vielleicht nicht direkt, sondern indirekt über seine Funktion im Cholesterintransport am Überleben der Krebszellen beteiligt. Auch hier bieten sich noch Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen.

5.2 *ADRBK1*

Auch das Kandidatengen *ADRBK1* wurde in einem Hochdurchsatz-*Screening* identifiziert. Dieses *Screening* basierte neben Pankreaskarzinom-spezifischen cDNA-*Microarrays* auch auf dem Prinzip der reversen Transfektion, welche die parallelisierte funktionelle Analyse großer Mengen von Genen und somit eine bessere Vorauswahl der Gene für spätere Einzelgenanalysen ermöglicht. Ausschlaggebend für die Auswahl dieses Kandidatengens zur weiteren funktionellen Charakterisierung war das Ergebnis der fluoreszenzmikroskopischen Lokalisationsbestimmung. *ADRBK1* zeigte nach Serumentzug eine Translokation von rein zytoplasmatischer hin zu teilweise nukleärer Lokalisation. Was zunächst als Reaktion auf die Kulturbedingungen mit und ohne 10 % FCS interpretiert wurde, konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden. Allerdings befand sich das Protein auch ohne Nährstoff- bzw. Wachstumsfaktorentzug nach 48 Stunden immer teilweise im Kern. Die Translokation war somit zeitabhängig und es stellte sich die Frage, ob die Kinase *ADRBK1* eine direkte Rolle bei der Genregulation spielt und ob die Translokation in den Kern durch Serumentzug regulierbar ist. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells 2* (NFAT2 = NFATc1) stellt ein Beispiel für ein solches Regulatorprotein der Genexpression im Pankreaskarzinom dar. Er aktiviert nach Ca^{2+} /Calcineurin-abhängiger Translokation in den Nukleus die Transkription des Onkogens *MYC* und führt somit zu vermehrter Zellproliferation und ankerunabhängigem Wachstum (Buchholz et al., 2006).

ADRBK1 ist in Makrophagen ein wichtiger Regulator des *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha/nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*-Signalwegs (I κ B α /NF- κ B-Signalweg), welchem auch in Krebszellen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Die Kinase vermittelt die Tumornekrosefaktor α -induzierte (TNF α -induzierte) I κ B α -Phosphorylierung. I κ B α wird daraufhin abgebaut und NF- κ B kann ungehindert in den Nukleus translozieren, um Gene für Zellproliferation und -überleben zu aktivieren (Patil, Luo, Porter, Benovic, & Parameswaran, 2010). Auch der TGF β -Signalweg wird maßgeblich durch ADRBK1 reguliert. Nach TGF β -Stimulation von HCC-Zelllinien bindet das Protein an sogenannte Rezeptor-regulierte SMAD-Proteine und phosphoryliert diese. Auf diese Weise wird verhindert, dass der SMAD-Komplex in den Nukleus transloziert, es kommt zu einer verminderten Genexpression von Wachstumsgenen und somit zur Wachstumsinhibition (Ho et al., 2005). Diese beiden Publikationen zeigen exemplarisch, dass ADRBK1 in anderem Kontext bereits als Regulatorprotein der Genexpression fungiert.

Die mutmaßliche Funktion von *ADRBK1* in Krebszellen wurde erst in wenigen Studien thematisiert. Eine funktionelle Charakterisierung der Kinase in PDAC liegt in der Literatur bislang noch nicht vor. Die Rolle von *ADRBK1* in verschiedenen Tumoren scheint sehr gewebe- und zelltypspezifisch zu sein.

So konnte zwar in Gewebe aus Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe eine erhöhte Expression von *ADRBK1* festgestellt werden, bemerkenswerterweise zeigte sich nach Überexpression des Gens in zwei schlecht differenzierten Schilddrüsenzelllinien jedoch eine signifikante Reduktion in der Zellproliferation aller Klone (Métayé, Levillain, Kraimps, & Perdriset, 2008).

Eine Studie an Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms (HCC) erwies, dass die Überexpression von *ADRBK1* auch in diesen Zelllinien eine anti-proliferative Wirkung besitzt. Hierbei wurde zusätzlich nachgewiesen, dass dieser Effekt durch einen *gap 2*/Mitose-Phase-Zellzyklusarrest (G2/M-Zellzyklusarrest) vermittelt wird und es konnten erhöhte Level von phosphoryliertem p53 sowie Cyclin B1 festgestellt werden. Die basale Expression in den einzelnen Zelllinien variierte stark, aufschlussreich wäre daher in dieser Studie eine zusätzlich Quantifizierung der Expressionslevel in primärem Gewebe aus HCC (Wei, Hurtt, Ciccarelli, Koch, & Doria, 2012).

Im Prostatakarzinom zeigte sich in verschiedenen Gewebeproben eine vermehrte Expression von ADRBK1. Diese Proben wiesen zusätzlich einen prognostisch

schlechten *Gleason Score* auf (Prowatke et al., 2007). Die Expression eines inhibitorischen Peptids, welches vom C-terminalen Fragment der Kinase abgeleitet wurde, führte in Prostatakarzinomzellen durch direkte Hemmung von GPCRs zu einer Reduktion der Tumorformation und des Tumorwachstums (Bookout et al., 2003). Hier zeigt ADRBK1 also im Gegensatz zum Schilddrüsenkarzinom und HCC eine pro-proliferative Wirkung. Allerdings bleibt die Frage offen, ob diese Wirkung auf einer Regulation spezifischer Rezeptoren beruht oder ob sie das Ergebnis eines umfassenderen Effekts des eingesetzten Inhibitors ist.

In Brustkrebszelllinien ließen sich erhöhte Level von *ADRBK1* feststellen. Der *Knockdown* mittels siRNA führte analog zum Prostatakarzinom zu einem abgeschwächten Tumorwachstum, welches sich zum Teil mit einem Ruhe-/*gap 1*-Phase-Zellzyklusarrest (G0/G1-Zellzyklusarrest) begründen ließ (Zhang et al., 2014).

Bezüglich der Zellzyklus-Regulation außerhalb von Krebszellen ist zudem bekannt, dass ADRBK1 in Zebrafischen mit *Patched 1* (PTCH1) interagiert, auf diese Weise die Cyclin B1-Funktion stimuliert (Jiang, Yang, & Ma, 2009) und ebenfalls pro-proliferativ wirkt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie Vorversuche der Arbeitsgruppe zeigten, dass *ADRBK1* im humanen PDAC im Gegensatz zu gesundem Gewebe und chronischer Pankreatitis nicht nur signifikant überexprimiert wird, sondern auch pro-proliferative Effekte vermittelt. Rekombinante Überexpression der Kinase beschleunigte das Zellwachstum, während ihr *Knockdown* signifikant das Wachstum durch Induktion eines *gap 1*-/Synthese-Phase-Zellzyklusarrest (G1/S-Zellzyklusarrest) inhibierte.

Alles in allem wurde, wie oben beschrieben, schon viele Signalkaskaden, die auch im Pankreaskarzinom wichtige Funktionen vermitteln, mit ADRBK1 in Verbindung gebracht. Als Ursache der im BrdU-Assay beobachteten Abnahme der Zellproliferation sowie der im MTT-Assay beobachteten Abnahme der Zellvitalität nach transientem *Knockdown* von ADRBK1 in Pankreaskarzinomzelllinien kommen nun einerseits Apoptose und andererseits Zellzyklusarrest und die damit verbundenen Signalkaskaden in Frage.

Ursprünglich ging man davon aus, dass die strukturell und funktionell verwandten Proteine CDKN1A/p21 und CDKN1B/p27 das zelluläre Wachstum auf ähnliche Weise hemmen. CDKN1A/p21 induziert einen meist p53-abhängigen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Bei CDKN1A/p27 erfolgt dieser Arrest unabhängig von p53. Durch Bindung der beiden Proteine wird die Aktivität der Cyclin A-CDK1/2-, Cyclin E-CDK2- und Cyclin

D-CDK4/6-Komplexe gehemmt. *Downstream* wird daraufhin RB weniger phosphoryliert, es kommt zu einer mangelnden Aktivierung von E2F und weiteren Transkriptionsfaktoren. CDKN1A/p21 kann sogar selbst Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel c-myc binden und reprimieren. Obwohl CDKN1A/p21 aufgrund seiner oben beschriebenen Funktion bisher klassischerweise immer als Tumorsuppressor angesehen wurde, gab es zuletzt auch Hinweise auf eine onkogene Funktion dieses Proteins (Abbas & Dutta, 2009). Diese „antagonistische Dualität“ hängt stark vom jeweiligen Zelltyp, der intrazellulären Lokalisation des Proteins, dem p53-Status sowie dem Typ und Level genotoxischen Stresses ab (Georgakilas, Martin, & Bonner, 2017). In PanIn-Läsionen und PDAC wurde eine frühe Überexpression des Gens im Rahmen der Karzinogenese nachgewiesen (Biankin et al., 2001). Da p53, wie bereits einleitend erwähnt, frühzeitig während der Karzinogenese in PDAC inaktiviert wird (Jones et al., 2008), spielen hier die p53-unabhängigen Funktionen von CDKN1A/p21 und somit seine onkogene Funktion eine größere Rolle. Diese wird unter anderem durch Förderung von genomischer Instabilität sowie Evasion von Seneszenz und Apoptose vermittelt (Georgakilas et al., 2017).

Im Hinblick auf eine Wachstumshemmung durch Zellzyklusarrest im Pankreaskarzinom untersuchte ich deshalb zunächst die Proteinlevel von CDKN1A/p21, CDKN1B/p27, Cyclin A, Cyclin D1 und pRB im *Western-Blot*. Es zeigte sich jedoch keine *Knockdown*-abhängige Veränderung der Proteinlevel, sodass man in Pankreaskarzinomzelllinien, im Gegensatz zu den oben erwähnten Zelllinien und Karzinomen, nicht von einer generalisierten Wachstumshemmung im Sinne eines Zellzyklusarrests ausgehen kann.

Apoptose oder auch programmierter Zelltod wird hauptsächlich über zwei Wege ausgelöst, zum einen über den extrinsischen Weg und zum anderen über den intrinsischen Weg. Beide haben eine gemeinsame Endstrecke und führen zur proteolytischen Spaltung und somit Aktivierung von Caspase 3. Diese Protease ist Bestandteil einer Enzymkaskade und leitet somit die Apoptose ein (Taylor, Cullen, & Martin, 2008). Ein Substrat der Caspase 3 ist auch das Enzym PARP, dessen eigentliche Funktion darin besteht, die DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu initiieren. PARP-Spaltung durch Caspase 3 führt zu seiner Inaktivierung, da die DNA-Reparatur zu viel Energie in Form von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) und Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Stattdessen wird bei schwerwiegenderen DNA-Schäden diese Energie gespart und dazu verwendet, die ebenfalls sehr energieaufwendige Apoptose einzuleiten und durchzuführen (Aredia & Scovassi, 2014).

Zusätzlich wurden deshalb im *Western-Blot* die Apoptosemarker PARP und Caspase 3 untersucht. Zwar war in dieser Arbeit auf Proteinlevel eine Spaltung dieser Marker in der Zelllinie PaTu-8988t nachweisbar, jedoch konnte diese Beobachtung in S2-028-Zellen nicht bestätigt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Induktion von Apoptose nach Repression des Kandidatengens *ADRBK1* ebenfalls nicht als maßgebliche Ursache der Wachstumsabnahme der Zellen gelten kann. Es findet sich also auch keine generelle Beteiligung der Kinase an apoptotischen Kaskaden im Pankreaskarzinom.

Der Transkriptionsfaktor c-myc spielt sowohl während des Zellzyklus als auch bei der Apoptose eine wichtige Rolle. Während des Zellzyklus ist c-myc essentiell für die Progression von der G₀/G₁- zur S-Phase. C-myc aktiviert neben den entsprechenden Cyclinen D1, D2, E1 und A2, die Proteine CDK4, *cell division cycle 25A* (CDC25A), E2F Transkriptionsfaktor 1 und E2F Transkriptionsfaktor 2 (E2F1/2). Die Transkription verschiedener Checkpoint-Gene des Zellzyklus wie zum Beispiel *growth arrest and DNA damage inducible 45* (GADD45) und GADD153 wird verhindert. Zudem inhibiert c-myc direkt durch Repression oder indirekt durch Abbau bzw. Sequestrierung die Funktion verschiedener CDK-Inhibitoren. Auch die Repression der Expression von CDKN1A/p21 spielt eine maßgebliche Rolle, da die Apoptose durch c-myc zum Teil über den ARF/p53 Signalweg getriggert wird. Andererseits beeinflusst c-myc das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren und kann somit auch unabhängig von p53 die Apoptose induzieren. So supprimiert der Transkriptionsfaktor einerseits indirekt die anti-apoptotischen Proteine *B-cell lymphoma 2* (BCL2) und *B-cell lymphoma-extra large* (BCL-xL), während andererseits das pro-apoptotische Protein *BCL2 associated X, apoptosis regulator* (BAX) durch eine c-myc-induzierte Konformationsänderung aktiviert wird und indirekt die Expression des pro-apoptotischen Proteins *bcl-2-like protein 11* (BIM) hochreguliert wird (Meyer & Penn, 2008).

Ergänzend wurde deshalb der Proteinlevel des Protoonkogens *MYC* bestimmt, aber auch hier konnte kein Effekt des *ADRBK1-Knockdowns* festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das vorliegende Ergebnis sehr überraschend ist. Trotz der zu Beginn der Arbeit vielversprechenden Datenlage bezüglich der Wachstumshemmung nach *Knockdown* von *ADRBK1* in Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie der nukleären Translokation, konnte ich keine der von mir im *Western-Blot* untersuchten Signalkaskaden mit diesen zuvor nachgewiesenen akuten Effekten in Verbindung bringen.

In *tissue microarrays* (TMA) unserer Arbeitsgruppe fiel auf, dass ADRBK1 in ca. 50 % der Gewebeproben aus Pankreaskarzinom immunhistochemisch nachweisbar war. Häufig zeigte sich eine konkordante Expression des Proteins in Tumor- und Immunzellen (Buchholz et al., 2015). Deshalb gilt es nun, die Bedeutung von ADRBK1 bei dem Zusammenspiel von Krebszellen mit infiltrierenden Immunzellen im Pankreaskarzinom weiter aufzuklären. Auch weiterhin stellt sich zudem die Aufgabe, zelluläre Zielproteine von ADRBK1 in PDAC-Zellen zu identifizieren, und herauszufinden, welche Signalkaskaden involviert sind. Außerdem sollte eruiert werden, inwieweit die oben beschriebene nukleäre Translokation tatsächlich regulierbar ist und ob sie Auswirkungen auf das Genexpressionsprofil dieser Zellen hat. Ein Augenmerk könnte zum Beispiel auf die bereits erwähnten Proteine TNF- α , I κ B α /NF- κ B, TGF β und SMAD gelegt werden, da diese an der Genregulation beteiligten Signalkaskaden auch in PDAC eine große Rolle spielen. Untersuchungen bezüglich der Zellmotilität, wie zum Beispiel *Time-Lapse-Analysen*, *Wound-Healing-Assays* oder *Boyden-Chamber-Assays*, wären ebenfalls interessant, da die Zellmotilität eine wichtige Fähigkeit für Krebszellen darstellt und bekanntermaßen durch ADRBK1 beeinflusst wird. Die Kinase bindet an die Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) und phosphoryliert diese. So kann die α -Tubulin-Deacetylase-Aktivität dieses Enzyms stimuliert und eine verbesserte Zellmotilität geschaffen werden (Lafarga, Mayor, & Penela, 2012).

6 Zusammenfassung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas stellt heute immer noch eines der aggressivsten und am schlechtesten behandelbaren Malignome dar. Deshalb ist es umso wichtiger, Genetik und Pathomechanismen dieser Erkrankung im Detail aufzuklären und Marker zur Früh- bzw. Differenzialdiagnose sowie potentielle Ziele für *targeted therapies* zu finden.

Mit Hilfe von enzymatisch generierten, Transkriptom-basierten shRNA-Bibliotheken konnten in Hochdurchsatzanalysen potentielle Onko- bzw. Tumorsuppressorgene in PDAC identifiziert werden. *NPC2* wurde als eines dieser potentiellen Onkogene für weitere funktionelle Assays im Bezug auf Zellvitalität, -proliferation und -motilität ausgewählt. Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene zeigten eine deutliche Überexpression des Gens sowohl in pankreatischem Tumorgewebe als auch in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien. Von vier in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zeigte sich nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* jedoch nur in BxPC3-Zellen ein akuter funktioneller Effekt im Sinne einer hoch signifikanten Abnahme der Zellvitalität. Dieser wachstumsfördernde Effekt von *NPC2* lässt sich nicht auf das Pankreaskarzinom im Allgemeinen übertragen. Die Zellproliferation und -motilität waren nach transienter Repression von *NPC2* im Kurzzeit-Versuch nicht beeinträchtigt.

Auch das Gen *ADRBK1* wurde in einem Hochdurchsatz-Screening, welches auf Pankreaskarzinom-spezifischen cDNA-Microarrays und dem Prinzip der reversen Transfektion basierte, identifiziert. *ADRBK1* zeigte eine zeitabhängige Translokation in den Nukleus und es stellte sich die Frage, ob die Kinase eine direkte Rolle bei der Genregulation spielt. Vorversuche der Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass *ADRBK1* im humanen PDAC nicht nur signifikant überexprimiert wird, sondern auch proliferative Effekte vermittelt. Rekombinante Überexpression der Kinase beschleunigte das Zellwachstum, während ihr *Knockdown* dieses signifikant inhibierte. Als Ursache für die beobachtete Wachstumshemmung kamen potentiell die Induktion eines Zellzyklusarrests oder Apoptose in Frage. Die daraufhin von mir im *Western-Blot* untersuchten Proteinlevel von CDKN1A/p21, CDKN1B/p27, Cyclin A, Cyclin D1, pRB und c-myc waren nach *ADRBK1*-Repression jedoch unverändert. Eine Spaltung der Apoptosemarker PARP und Caspase 3 war nur in der Zelllinie PaTu-8988t nachweisbar. Somit kann weder die Induktion von Apoptose noch ein Zellzyklusarrest als maßgebliche Ursache der Wachstumsabnahme nach *ADRBK1*-*Knockdown* gelten. Um die Bedeutung des Gens für PDAC weiter aufzuklären, sollte die nukleäre Translokation und deren potentielle Auswirkungen auf die Genfunktion weiter

untersucht werden. Zudem sollten zelluläre Zielproteine von ADRBK1, die Relevanz der Kinase beim Zusammenspiel von Krebszellen mit infiltrierenden Immunzellen und ihre Rolle bezüglich der Zellmotilität identifiziert werden.

7 Summary

Ductal adenocarcinoma of the pancreas today still is one of the most aggressive and most difficult to treat malignomas. Thus it is even more important to uncover genetic drivers and pathomechanisms of this disease in detail and to find markers for early or differential diagnosis, respectively, as well as potential targets for therapies.

By means of enzymatically generated transcriptome-based shRNA libraries, cooperating researchers were able to identify putative oncogenes and tumor suppressor genes specific for PDAC. *NPC2* as one of those potential oncogenes was selected for further functional assays concerning cell vitality, proliferation and motility. Expression analyses on mRNA level showed a distinct overexpression of the gene both in pancreatic tumor tissue and in different cell lines of the pancreatic ductal adenocarcinoma. Out of four cell lines analyzed in short-term experiments within this work, only BxPC3 cells showed a functional effect in terms of a highly significant reduction of cell vitality after siRNA-mediated knockdown. This growth-promoting effect of *NPC2* cannot be transferred to PDAC in general. Cell proliferation and –motility after repression of *NPC2* were not affected.

The gene *ADRBK1* has likewise been identified in a high-throughput screening, which was based on cDNA-microarrays specific for PDAC and the concept of reverse transfection. *ADRBK1* showed a time-dependent translocation into the nucleus, which led to the question, whether the kinase plays a direct role in gene regulation. Preliminary tests in our research group also showed that *ADRBK1* is not only significantly overexpressed in human PDAC, but also mediates pro-proliferative effects. Recombinant overexpression of the kinase accelerates, while its knockdown significantly inhibits, cell growth. Potential reasons for the observed growth inhibition were either induction of cell cycle arrest or apoptosis. Protein levels of CDKN1A/p21, CDKN1B/p27, Cyclin A, Cyclin D1, pRB and c-myc subsequently examined in Western blot after repression of *ADRBK1* were unchanged. Cleavage of PARP and Caspase 3, both markers of apoptosis, were detectable only in PaTu-8988t cells. Thus neither induction of apoptosis nor cell cycle arrest can be regarded as the prevailing reason of growth inhibition after *ADRBK1* knockdown. To elucidate the role of the gene in PDAC, nuclear translocation and its potential effects on gene function should be further investigated. Moreover cellular target proteins of *ADRBK1*, its relevance in interaction between cancer cells and infiltrating immune cells and its role concerning cell motility are to be identified.

8 Literaturverzeichnis

- Abbas, T., & Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature Reviews. Cancer*, 9(6), 400–14. <http://doi.org/10.1038/nrc2657>
- Aredia, F., & Scovassi, A. I. (2014). Poly(ADP-ribose): A signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical Pharmacology*, 92(1), 157–163. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.06.021>
- Asakawa, J.-I., Kodaira, M., Ishikawa, N., Hirai, Y., Nagataki, S., Moatamed, F., & Sugawara, M. (2002). Two-dimensional complementary deoxyribonucleic acid electrophoresis revealing up-regulated human epididymal protein-1 and down-regulated CL-100 in thyroid papillary carcinoma. *Endocrinology*, 143(11), 4422–8. <http://doi.org/10.1210/en.2002-220550>
- Aune, D., Greenwood, D. C., Chan, D. S. M., Vieira, R., Vieira, A. R., Navarro Rosenblatt, D. A., ... Norat, T. (2012). Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of prospective studies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(4), 843–52. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdr398>
- Bardeesy, N., Aguirre, A. J., Chu, G. C., Cheng, K.-H., Lopez, L. V., Hezel, A. F., ... Depinho, R. A. (2006). Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), 5947–52. <http://doi.org/10.1073/pnas.0601273103>
- Ben, Q., Xu, M., Ning, X., Liu, J., Hong, S., Huang, W., ... Li, Z. (2011). Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 47(13), 1928–37. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.03.003>
- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G., & Lefkowitz, R. J. (1986). Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(9), 2797–801.
- Bezard, E., Gross, C. E., Qin, L., Gurevich, V. V., Benovic, J. L., & Gurevich, E. V. (2005). L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiology of Disease*, 18(2), 323–35. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.005>
- Biankin, A. V., Kench, J. G., Morey, A. L., Lee, C.-S., Biankin, S. A., Head, D. R., ... Sutherland, R. L. (2001). Overexpression of p21WAF1/CIP1 is an Early Event in the Development of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancer Res.*, 61(24), 8830–8837.
- Bipat, S., Phoa, S. S. K. S., van Delden, O. M., Bossuyt, P. M. M., Gouma, D. J., Laméris, J. S., & Stoker, J. (2005). Ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for diagnosis and determining resectability of pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 29(4), 438–45.
- Bonovas, S., Filioussi, K., & Sitaras, N. M. (2008). Statins Are Not Associated With a Reduced Risk of Pancreatic Cancer at the Population Level, When Taken at Low Doses for Managing Hypercholesterolemia: Evidence From a Meta-Analysis of 12 Studies. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(10), 2646–2651. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2008.02051.x>
- Bookout, A. L., Finney, A. E., Guo, R., Peppel, K., Koch, W. J., & Daaka, Y. (2003).

- Targeting Gbetagamma signaling to inhibit prostate tumor formation and growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37569–73. <http://doi.org/10.1074/jbc.M306276200>
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D. T., Petersen, G., Bracci, P. M., Ji, B. T., ... La Vecchia, C. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(7), 1880–8. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdr541>
- Brugge, W. R., Lauwers, G. Y., Sahani, D., Fernandez-del Castillo, C., & Warshaw, A. L. (2004). Cystic neoplasms of the pancreas. *The New England Journal of Medicine*, 351(12), 1218–26. <http://doi.org/10.1056/NEJMra031623>
- Buchholz, M., Honstein, T., Kirchhoff, S., Kreider, R., Schmidt, H., Sipos, B., & Gress, T. M. (2015). A multistep high-content screening approach to identify novel functionally relevant target genes in pancreatic cancer. *PLoS One*, 10(4), e0122946. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122946>
- Buchholz, M., Kestler, H. A., Bauer, A., Böck, W., Rau, B., Leder, G., ... Gress, T. M. (2005). Specialized DNA arrays for the differentiation of pancreatic tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11(22), 8048–54. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1274>
- Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., ... Ellenrieder, V. (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *The EMBO Journal*, 25(15), 3714–3724. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601246>
- Chari, S. T., Leibson, C. L., Rabe, K. G., Ransom, J., de Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*, 129(2), 504–11. <http://doi.org/10.1016/j.gastro.2005.05.007>
- Conrad, C., Erfle, H., Warnat, P., Daigle, N., Lörch, T., Ellenberg, J., ... Eils, R. (2004). Automatic identification of subcellular phenotypes on human cell arrays. *Genome Research*, 14(6), 1130–6. <http://doi.org/10.1101/gr.2383804>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817–25. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Crnogorac-Jurcevic, T., Efthimiou, E., Nielsen, T., Loader, J., Terris, B., Stamp, G., ... Lemoine, N. R. (2002). Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. *Oncogene*, 21(29), 4587–94. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1205570>
- Cruz, P. M. R., Mo, H., McConathy, W. J., Sabnis, N., & Lacko, A. G. (2013). The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, 4, 119. <http://doi.org/10.3389/fphar.2013.00119>
- Csepegi, C., Jiang, M., Kojima, F., Crofford, L. J., & Frolov, A. (2011). Somatic cell plasticity and Niemann-Pick type C2 protein: fibroblast activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 2078–87. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.135897>
- Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., ... Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425–35. <http://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c15963>
- Eckhart, A. D., Ozaki, T., Tevaeai, H., Rockman, H. A., & Koch, W. J. (2002).

- Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. *Molecular Pharmacology*, 61(4), 749–58.
- Elsässer, H. P., Lehr, U., Agricola, B., & Kern, H. F. (1992). Establishment and characterisation of two cell lines with different grade of differentiation derived from one primary human pancreatic adenocarcinoma. *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 61(5), 295–306.
- Esposito, I., Konukiewitz, B., Schlitter, A. M., & Klöppel, G. (2014). Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(38), 13833–13841. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13833>
- Fensterer, H., Giehl, K., Buchholz, M., Ellenrieder, V., Buck, A., Kestler, H. A., ... Gress, T. M. (2004). Expression profiling of the influence of RAS mutants on the TGFB1-induced phenotype of the pancreatic cancer cell line PANC-1. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 39(3), 224–35. <http://doi.org/10.1002/gcc.20000>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet].
- Georgakilas, A. G., Martin, O. A., & Bonner, W. M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends in Molecular Medicine*, 23(4), 310–319. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.001>
- Giardiello, F. M., Offerhaus, G. J., Lee, D. H., Krush, A. J., Tersmette, A. C., Booker, S. V., ... Hamilton, S. R. (1993). Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut*, 34(10), 1394–6.
- Grange-Midroit, M., García-Sevilla, J. A., Ferrer-Alcón, M., La Harpe, R., Huguelet, P., & Guimón, J. (2003). Regulation of GRK 2 and 6, beta-arrestin-2 and associated proteins in the prefrontal cortex of drug-free and antidepressant drug-treated subjects with major depression. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 111(1–2), 31–41.
- Gress, T. M., Müller-Pillasch, F., Geng, M., Zimmerhackl, F., Zehetner, G., Friess, H., ... Lehrach, H. (1996). A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene*, 13(8), 1819–30.
- Gress, T. M., Wallrapp, C., Frohme, M., Müller-Pillasch, F., Lacher, U., Friess, H., ... Hoheisel, J. D. (1997). Identification of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 19(2), 97–103.
- Hagmann, W., Jesnowski, R., & Löhr, J. M. (2010). Interdependence of gemcitabine treatment, transporter expression, and resistance in human pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12(9), 740–7.
- Han, H., Bearss, D. J., Browne, L. W., Calaluce, R., Nagle, R. B., & Von Hoff, D. D. (2002). Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. *Cancer Research*, 62(10), 2890–6.
- Ho, J., Cocolakis, E., Dumas, V. M., Posner, B. I., Laporte, S. A., & Lebrun, J.-J. (2005). The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *The EMBO Journal*, 24(18), 3247–58. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600794>
- Howes, N., Lerch, M. M., Greenhalf, W., Stocken, D. D., Ellis, I., Simon, P., ... Neoptolemos, J. P. (2004). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 2(3),

252–61.

- Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., & Kern, S. E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(8), 2969–72.
- Hurlé, M. A. (2001). Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity. *Journal of Neurochemistry*, 77(2), 486–92.
- Hustinx, S. R., Leoni, L. M., Yeo, C. J., Brown, P. N., Goggins, M., Kern, S. E., ... Maitra, A. (2005). Concordant loss of MTAP and p16/CDKN2A expression in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence of homozygous deletion in a noninvasive precursor lesion. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 18(7), 959–63. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800377>
- Huth, J., Buchholz, M., Kraus, J. M., Mølhave, K., Gradinaru, C., v Wichert, G., ... Kestler, H. A. (2011). TimeLapseAnalyzer: multi-target analysis for live-cell imaging and time-lapse microscopy. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 104(2), 227–34. <http://doi.org/10.1016/j.cmpb.2011.06.002>
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Olsen, M., Lowe, A. W., van Heek, N. T., Rosty, C., ... Goggins, M. (2003). Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *The American Journal of Pathology*, 162(4), 1151–62. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63911-9](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63911-9)
- Iacobuzio-Donahue, C. A., Song, J., Parmigiani, G., Yeo, C. J., Hruban, R. H., & Kern, S. E. (2004). Missense mutations of MADH4: characterization of the mutational hot spot and functional consequences in human tumors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(5), 1597–604.
- Iqbal, J., Ragone, A., Lubinski, J., Lynch, H. T., Moller, P., Ghadirian, P., ... Narod, S. A. (2012). The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *British Journal of Cancer*, 107(12), 2005–9. <http://doi.org/10.1038/bjc.2012.483>
- Iwamura, T., Katsuki, T., & Ide, K. (1987). Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 78(1), 54–62.
- Jaber, M., Koch, W. J., Rockman, H., Smith, B., Bond, R. A., Sulik, K. K., ... Giros, B. (1996). Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 12974–9.
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., ... Tuveson, D. A. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62(1), 112–20. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>
- Jiang, X., Yang, P., & Ma, L. (2009). Kinase activity-independent regulation of cyclin pathway by GRK2 is essential for zebrafish early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(25), 10183–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0812105106>
- Jones, S., Hruban, R. H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D. W., ... Klein, A. P. (2009). Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 217. <http://doi.org/10.1126/science.1171202>

- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., ... Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1801–6. <http://doi.org/10.1126/science.1164368>
- Kamata, T., Jin, H., Giblett, S., Patel, B., Patel, F., Foster, C., ... Whiteside, T. (2015). The cholesterol-binding protein NPC2 restrains recruitment of stromal macrophage-lineage cells to early-stage lung tumours. *EMBO Molecular Medicine*, 7(9), 1119–37. <http://doi.org/10.15252/emmm.201404838>
- Kanda, M., Matthaei, H., Wu, J., Hong, S.-M., Yu, J., Borges, M., ... Goggins, M. (2012). Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology*, 142(4), 730–733.e9. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.12.042>
- Kastrinos, F., Mukherjee, B., Tayob, N., Wang, F., Sparr, J., Raymond, V. M., ... Syngal, S. (2009). Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA*, 302(16), 1790–5. <http://doi.org/10.1001/jama.2009.1529>
- Kennedy, B. E., Charman, M., & Karten, B. (2012). Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria without interacting with NPC1. *Journal of Lipid Research*, 53(12), 2632–42. <http://doi.org/10.1194/jlr.M029942>
- Klein, A., Amigo, L., Retamal, M. J., Morales, M. G., Miquel, J. F., Rigotti, A., & Zanlungo, S. (2006). NPC2 is expressed in human and murine liver and secreted into bile: potential implications for body cholesterol homeostasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 43(1), 126–33. <http://doi.org/10.1002/hep.20985>
- Kwon, H. J., Abi-Mosleh, L., Wang, M. L., Deisenhofer, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Infante, R. E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, 137(7), 1213–24. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>
- Lafarga, V., Mayor, F., & Penela, P. (2012). The interplay between G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) and histone deacetylase 6 (HDAC6) at the crossroads of epithelial cell motility. *Cell Adhesion & Migration*, 6(6), 495–501. <http://doi.org/10.4161/cam.21585>
- Li, J., Gu, D., Lee, S. S.-Y., Song, B., Bandyopadhyay, S., Chen, S., ... Cheng, J.-X. (2016). Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene*. <http://doi.org/10.1038/onc.2016.168>
- Liao, Y.-J., Lin, M.-W., Yen, C.-H., Lin, Y.-T., Wang, C.-K., Huang, S.-F., ... Arthur Chen, Y.-M. (2013). Characterization of Niemann-Pick Type C2 protein expression in multiple cancers using a novel NPC2 monoclonal antibody. *PLoS One*, 8(10), e77586. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077586>
- Lim, W., Olschwang, S., Keller, J. J., Westerman, A. M., Menko, F. H., Boardman, L. A., ... Houlston, R. S. (2004). Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterology*, 126(7), 1788–94.
- Lombardi, M. S., Kavelaars, A., Cobelens, P. M., Schmidt, R. E., Schedlowski, M., & Heijnen, C. J. (2001). Adjuvant arthritis induces down-regulation of G protein-coupled receptor kinases in the immune system. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(3), 1635–40.
- Malka, D., Hammel, P., Maire, F., Rufat, P., Madeira, I., Pessione, F., ... Ruszniewski, P. (2002). Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51(6), 849–52.
- McWilliams, R. R., Rabe, K. G., Olswold, C., De Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic

- carcinoma. *Cancer*, *104*(2), 388–94. <http://doi.org/10.1002/cncr.21166>
- Métayé, T., Levillain, P., Kraimps, J.-L., & Perdrisot, R. (2008). Immunohistochemical detection, regulation and antiproliferative function of G-protein-coupled receptor kinase 2 in thyroid carcinomas. *The Journal of Endocrinology*, *198*(1), 101–10. <http://doi.org/10.1677/JOE-07-0562>
- Meyer, N., & Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*, *8*(12), 976–990. <http://doi.org/10.1038/nrc2231>
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., ... Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(15), 1960–6. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.9525>
- Nazli, O., Bozdogan, A. D., Tansug, T., Kir, R., & Kaymak, E. (2000). The diagnostic importance of CEA and CA 19-9 for the early diagnosis of pancreatic carcinoma. *Hepato-Gastroenterology*, *47*(36), 1750–2.
- Neesse, a., Michl, P., Frese, K. K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M. a., ... Tuveson, D. a. (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, *60*(6), 861–868. <http://doi.org/10.1136/gut.2010.226092>
- Neoptolemos, J. P., Stocken, D. D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., ... Büchler, M. W. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*, *304*(10), 1073–81. <http://doi.org/10.1001/jama.2010.1275>
- Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J. T., Gellert, K., Ridwelski, K., ... Riess, H. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA*, *310*(14), 1473–81. <http://doi.org/10.1001/jama.2013.279201>
- Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., ... Tuveson, D. A. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5933), 1457–61. <http://doi.org/10.1126/science.1171362>
- Patil, S., Luo, J., Porter, K. J., Benovic, J. L., & Parameswaran, N. (2010). G-protein-coupled-receptor kinases mediate TNF α -induced NF κ B signalling via direct interaction with and phosphorylation of I κ B α . *The Biochemical Journal*, *425*(1), 169–78. <http://doi.org/10.1042/BJ20090908>
- Patterson, M. C., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T., & Wijburg, F. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Molecular Genetics and Metabolism*, *106*(3), 330–44. <http://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.012>
- Porta, M., Fabregat, X., Malats, N., Guarner, L., Carrato, A., de Miguel, A., ... Real, F. X. (2005). Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *7*(5), 189–97.
- Premont, R. T., & Gainetdinov, R. R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual Review of Physiology*, *69*, 511–34. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154731>
- Prowatke, I., Devens, F., Benner, A., Gröne, E. F., Mertens, D., Gröne, H.-J., ... Joos, S. (2007). Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using

- tissue microarrays. *British Journal of Cancer*, 96(1), 82–8. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603490>
- Rulyak, S. J., Brentnall, T. A., Lynch, H. T., & Austin, M. A. (2003). Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer*, 98(4), 798–804. <http://doi.org/10.1002/cncr.11562>
- Schober, M., Jesenofsky, R., Faissner, R., Weidenauer, C., Hagmann, W., Michl, P., ... Löhr, J.-M. (2014). Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancers*, 6(4), 2137–54. <http://doi.org/10.3390/cancers6042137>
- Shah, A. N., Summy, J. M., Zhang, J., Park, S. I., Parikh, N. U., & Gallick, G. E. (2007). Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Annals of Surgical Oncology*, 14(12), 3629–37. <http://doi.org/10.1245/s10434-007-9583-5>
- Siegel, P. M., & Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 3(11), 807–21. <http://doi.org/10.1038/nrc1208>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30. <http://doi.org/10.3322/caac.21387>
- Silva, J. M., Mizuno, H., Brady, A., Lucito, R., & Hannon, G. J. (2004). RNA interference microarrays: high-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6548–52. <http://doi.org/10.1073/pnas.0400165101>
- Sugawara, M., Ohye, H., Tomoda, C., Kogai, T., Kamata, Y., Pezeshkpour, G. H., & Moatamed, F. (2011). A novel role for Niemann-Pick disease type 2C protein in papillae formation. *PloS One*, 6(1), e15777. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015777>
- Sultana, A., Smith, C. T., Cunningham, D., Starling, N., Neoptolemos, J. P., & Ghaneh, P. (2007). Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(18), 2607–15. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.2551>
- Suo, Z., Wu, M., Citron, B. A., Wong, G. T., & Festoff, B. W. (2004). Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(13), 3444–52. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4856-03.2004>
- Tan, M. H., Nowak, N. J., Loor, R., Ochi, H., Sandberg, A. A., Lopez, C., ... Chu, T. M. (1986). Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Investigation*, 4(1), 15–23.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 231–241. <http://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Tersmette, A. C., Petersen, G. M., Offerhaus, G. J., Falatko, F. C., Brune, K. A., Goggins, M., ... Hruban, R. H. (2001). Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(3), 738–44.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–90. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

- Ungerer, M., Böhm, M., Elce, J. S., Erdmann, E., & Lohse, M. J. (1993). Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, *87*(2), 454–63.
- Vilá, M. R., Lloreta, J., Schüssler, M. H., Berrozpe, G., Welt, S., & Real, F. X. (1995). New pancreas cancers cell lines that represent distinct stages of ductal differentiation. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *72*(4), 395–404.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, *10*(8), 789–99. <http://doi.org/10.1038/nm1087>
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., ... Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, *369*(18), 1691–703.
- Vroon, A., Kavelaars, A., Limmroth, V., Lombardi, M. S., Goebel, M. U., Van Dam, A.-M., ... Heijnen, C. J. (2005). G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *174*(7), 4400–6.
- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., & Büchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *The British Journal of Surgery*, *91*(5), 586–94. <http://doi.org/10.1002/bjs.4484>
- Wei, Z., Hurtt, R., Ciccarelli, M., Koch, W. J., & Doria, C. (2012). Growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by overexpression of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(6), 2371–7. <http://doi.org/10.1002/jcp.22972>
- Yamanashi, Y., Takada, T., Shoda, J.-I., & Suzuki, H. (2012). Novel function of Niemann-Pick C1-like 1 as a negative regulator of Niemann-Pick C2 protein. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *55*(3), 953–64. <http://doi.org/10.1002/hep.24772>
- Yamanashi, Y., Takada, T., Yoshikado, T., Shoda, J.-I., & Suzuki, H. (2011). NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology*, *140*(5), 1664–74. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.050>
- Young, A., Lou, D., & McCormick, F. (2013). Oncogenic and wild-type Ras play divergent roles in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Cancer Discovery*, *3*(1), 112–23. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0231>
- Zhang, C., Chen, X., Li, Y., S W A, H., Wu, J., Shi, X., ... Kim, S. (2014). si-RNA-Mediated Silencing of ADRBK1 Gene Attenuates Breast Cancer Cell Proliferation. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, *29*(8), 303–9. <http://doi.org/10.1089/cbr.2014.1653>
- Ziauddin, J., & Sabatini, D. M. (2001). Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature*, *411*(6833), 107–10. <http://doi.org/10.1038/35075114>

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 9.1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
5-FU	Fluorouracil
ABCG5/G8	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5/8</i>
ADM	azinär duktales Metaplasie
ADRBK1	β -adrenerge Rezeptorkinase 1
AFL	atypische flache Läsionen
AMD	<i>average mean displacement</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BCKDK	<i>branched chain ketoacid dehydrogenase</i>
BCL2/-xL	<i>B-cell lymphoma 2/ -extra large</i>
BIM	<i>bcl-2-like protein 11</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BRCA1/2	<i>breast cancer 1/2, early onset</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Kälberserumalbumin
c-myc	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
CA 19-9	<i>carbohydrate-Antigen 19-9</i>
Caspase	<i>cysteine-aspartic acid protease</i>
CDC25A	<i>cell division cycle 25A</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKN1A/B (p21/p27)	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitoren</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>
CEA	karzinoembryonales Antigen
DEPTOR	<i>DEP domain containing MTOR-interacting protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nucleotidtriphosphat
ds cDNA	doppelsträngige <i>complementary DNA</i>

DTT	Dithiothreitol
E2F1/2	E2F Transkriptionsfaktor 1/2
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR-Inhibitor	<i>epidermal growth factor receptor</i> -Inhibitor
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ENTRACE	<i>enzymatically generated transcriptome-based</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie
FAMMM-Syndrom	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Syndrom
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
F _c	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	fetales Kälberserum
FOLFIRINOX	Kombinationstherapie aus Folinsäure, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin
FPC	familiäres Pankreaskarzinom
G0-Zellzyklusarrest	Ruhephase-Zellzyklusarrest
G1-Phase	<i>gap</i> 1-Phase
G2-Zellzyklusarrest	<i>gap</i> 2-Phasen-Zellzyklusarrest
GADD45/153	<i>growth arrest and DNA damage inducible</i>
GNMT	Glycin N-Methyltransferase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HDAC6	Histon-Deacetylase 6
HEK-293	<i>human embryonic kidney</i> Zelllinie
HNPCC	hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom
HPDE	<i>human pancreatic duct epithelial</i> Zelllinie
HRP	<i>horseradish</i> -Peroxidase
hTERT-HPNE	<i>human telomerase reverse transcriptase</i> HPNE-Zellen
IGF2R	<i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>
IPMN	intraduktal papillär-muzinöse Neoplasie
I κ B α	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
Ki-67	<i>marker of proliferation</i> Ki-67

KPC	LSL-Kras ^{G12D/+} /LSL-Trp53 ^{R172H/+} /Pdx-1-Cre-Modell
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M-Phase	Mitose-Phase
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCN	muzinös-zystische Neoplasie
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog/E3 ubiquitin protein ligase</i>
MLN64	<i>StAR-related lipid transfer (START) domain containing 3</i>
Mmel	Restriktionsendonuklease
MPL	Myeloproliferatives Leukämie-Protein
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatographie
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance-associated protein</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	mTOR-complex 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUC1	<i>Mucin 1, cell surface associated</i>
Multidetektor-CT	Multidetektorcomputertomographie
Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	Natriumpyrophosphat
nab-Paclitaxel	Albumin-gebundenes Paclitaxel
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NAD ⁺	Nicotinamidenindinukleotid
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NaVO ₃	Natriumvanadat
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NFAT2/NFATc1	<i>nuclear factor of activated T-cells 2</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NMI	Naturwissenschaftlich-Mathematisches Institut
NP-C	Niemann-Pick-Erkrankung Typ C
NPC1	<i>Niemann-Pick disease, type C1</i>
NPC1L1	<i>NPC1-like protein 1</i>
NPC2	<i>Niemann-Pick disease, type C2</i>

Oligo dT	Oligo Desoxythymidin
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PALB2	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PARP	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDAC	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PEGPH20	pegylierte, rekombinante humane Hyaluronidase PH20
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	<i>retinoblastoma</i> -Protein
PSC	Pankreassternzelle
PTCH1	<i>Patched 1</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
R0	ohne Residualtumor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPLP0	<i>ribosomal protein, large, P0</i>
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> -Medium
RT	reverse Transkriptase
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHH	<i>sonic hedgehog</i>
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siK	<i>non-silencing</i> Kontrolle
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SMAD4	SMAD <i>family member 4</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	TBS Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLA	<i>Time-Lapse</i> -Analyse
TMA	<i>tissue microarray</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TPO	Thrombopoietin

UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VDAC1	<i>voltage-dependent anion channel 1</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: HERSTELLUNG DER TRANSKRIPTOM-BASIERTE SHRNA-BIBLIOTHEK.	6
ABBILDUNG 1.2: MODELL DER PHYSIOLOGISCHEN FUNKTION VON NPC2 IN DER ZELLE.	8
ABBILDUNG 4.1: EXPRESSION VON <i>NPC2</i> IN PROBEN AUS PANKREATISCHEM GEWEBE.	30
ABBILDUNG 4.2: EXPRESSION VON <i>NPC2</i> IN VERSCHIEDENEN ZELLINIEN.	31
ABBILDUNG 4.3: EFFIZIENZ DES TRANSIENTEN <i>KNOCKDOWN</i> VON <i>NPC2</i> AUF MRNA-EBENE.	32
ABBILDUNG 4.4: ZELLVITALITÄT NACH REPRESSION VON <i>NPC2</i> .	33
ABBILDUNG 4.5: ZELLPROLIFERATION NACH REPRESSION VON <i>NPC2</i> .	34
ABBILDUNG 4.6: UNGERICHTETE ZELLBEWEGUNG NACH REPRESSION VON <i>NPC2</i> .	35
ABBILDUNG 4.7: <i>KNOCKDOWN</i> DER <i>ADRBK1</i> -EXPRESSION FÜHRT ZUR SIGNIFIKANTEN ABNAHME DER ZELLVITALITÄT UND ZELLPROLIFERATION.	36
ABBILDUNG 4.8: EFFIZIENZ DES TRANSIENTEN <i>KNOCKDOWN</i> VON <i>ADRBK1</i> AUF PROTEINEBENE.	37
ABBILDUNG 4.9: EFFEKT DER <i>ADRBK1</i> -REPRESSION AUF DIE APOPTOSEMARKER CASPASE 3 UND PARP.	38
ABBILDUNG 4.10: EFFEKT DER <i>ADRBK1</i> -REPRESSION AUF ZELLZYKLUSPROTEINE.	39
ABBILDUNG 4.11: EFFEKT DER <i>ADRBK1</i> -REPRESSION AUF ZELLZYKLUS-ASSOZIIERTE PROTEINE.	39
ABBILDUNG 4.12: EFFEKT DER <i>ADRBK1</i> -REPRESSION AUF DAS PROTOONKOGEN <i>MYC</i> .	40

9.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN	13
TABELLE 2.2: VERWENDETE GERÄTE	14
TABELLE 2.3: VERWENDETE CHEMIKALIEN	15
TABELLE 2.4: SIRNA ZUR TRANSIENTEN TRANSFEKTION	16
TABELLE 2.5: PRIMER FÜR QRT-PCR	16
TABELLE 2.6: VERWENDETE KITS	16
TABELLE 2.7: PRIMÄRE ANTIKÖRPER FÜR <i>WESTERN-BLOT</i>	17
TABELLE 2.8: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER FÜR <i>WESTERN-BLOT</i>	18
TABELLE 2.9: VERWENDETER STANDARD	18
TABELLE 2.10: NÄHRMEDIEN UND ZUSÄTZE	19
TABELLE 3.1: MASTERMIX ZUR CDNA-SYNTHESE	22
TABELLE 3.2: MASTERMIX ZUR QRT-PCR	22
TABELLE 3.3: PHASEN DER QRT-PCR	23
TABELLE 3.4: ZUSAMMENSETZUNG DER MTT-SOLUBILISIERUNGS-LÖSUNG	23
TABELLE 3.5: ANSATZ ZUR PROTEINISOLATION INKLUSIVE PHOSPHOPROTEASE-INHIBITOREN	25
TABELLE 3.6: PUFFER FÜR DIE SDS-PAGE	26
TABELLE 3.7: ANSATZ FÜR 2 GELE	27
TABELLE 3.8: PUFFER FÜR <i>WESTERN-BLOT</i>	28
TABELLE 9.1: ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61

9.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Universität Marburg waren Arabin, Bartsch, Bauer S., Bauer U.-M., Baum, Baumann, Becker A., Becker K., Becker S., Bender, Bertelmann, Bertoune, Bien, Braun, Brehm, Brendel, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Daniel, Dannlowski, Daut, Decher, del Rey, Dettmeyer, Dietz, Dinges, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Ellenrieder, Enzensberger, Fendrich, Fenner, Feuser, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Garten, Geks, Giese, Glatz, Gress, Grgic, Grundmann, Grzeschik, Haberhausen, Häußermann, Hegele, Hertl, Höffken, Hofmann, Höglinger, Hoyer, Hüttner, Jaques, Jerrentrup, Jomaa, Kalder, Kann, Kanngießler, Kerwat, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Klose, Klug, Koczulla, Köhler S., König, Konrad, Koolmann, Kühne, Kühnert, Kussin, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüers, Maier, Maisch, Maisner, Maurer, Meißner, Merte, Metzelder, Michl, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Mylius, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimphius, Nimsky, Oertel, Olbert, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Patrascan, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera Knorrenschild, Ries, Riße, Roeßler, Rost, Ruchholtz, Sahmland, Schachtner, Schäfer H., Schäfer J., Schäfer M., Schieffer, Schmidt, Schneider, Schoner, Schröder, Schu, Schulze, Seifart, Sekundo, Sevinc, Shams-Eldin, Sommer, Stahl, Steinfeld, Stiewe, Strik, Suske, Teymoortash, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann Re., Westermann Ro., Wilhelm, Wißniowski, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zavorotnyy, Zemlin, Zentgraf, Zoremba, Zwiorek.

9.5 Danksagung

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gress für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen.

Meinen besonderen Dank richte ich an meinen Doktorvater Prof. (apl.) Dr. rer. nat. Malte Buchholz für seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation. Er stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite und brachte mir viel Geduld entgegen.

Außerdem gilt mein Dank dem aktuellen und ehemaligen Team der AG Buchholz bestehend aus Ramona Diels, Tatjana Honstein, Brajesh Kaistha, Anja Krattenmacher, Sandra Kirchhoff, Lisa Ortmüller, Melanie Sauer, Harald Schmidt und Daniela Schumacher. Mit ihrer Erfahrung, ihrer Hilfsbereitschaft, ihrem Wissen, ihren Ideen und ihrer Kritik halfen sie mir sehr, diese Arbeit anzufertigen.

Weiterhin danke ich den vielen hilfsbereiten Händen der anderen AGs in der Gastroenterologie.