

Aus dem medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Schwerpunkt für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Th. M. Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Marburg

Funktionelle Charakterisierung der Kinasen IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC im Pankreaskarzinom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sabrina Katharina Bielak-Würzer

aus Wiesbaden

Marburg an der Lahn, 2014

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/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 16.04.2014.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr PD Dr. M. Buchholz

1. Korreferent: PD Dr. W. Meißner

2. Korreferent: Prof. Dr. A. Burchert

1	Einleitung	7
1.1	Das Pankreaskarzinom	7
2	Aktueller Stand der Wissenschaft	9
2.1	Bedeutung humaner Kinasen in Pankreaskarzinomzellen	9
2.2	Kinasen als molekulare Zielstrukturen für therapeutische Interventionen im Pankreaskarzinom	12
2.3	IRAK1	14
2.4	TTK	17
2.5	SGK1	19
2.6	TBK1	20
2.7	PRKDC	21
3	Zielsetzung der Arbeit	23
4	Material und Methoden	24
4.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien	24
4.1.1	Chemikalien	24
4.1.2	Laborgeräte	24
4.1.3	Kit-systeme	25
4.1.4	Medien	25
4.1.5	Reagenzien	26
4.1.6	Verbrauchsmaterialien	26
4.1.7	Antikörper	27
4.1.8	Primer	27
4.1.9	siRNA	27
4.2	Zellkultur	29
4.2.1	Zelllinien	29
4.2.2	Medien und Medienzusätze	29
4.2.3	Zellkulturbedingungen	30
4.3	Zellbiologische Methoden	30
4.3.1	Passagieren, Zählen und Aussäen von Zellen	30
4.3.2	siRNA Transfektion	30
4.3.3	Kryokonservierung	31
4.4	Funktionelle Versuche	31
4.4.1	MTT-Assay	32
4.4.2	Migrationsassay	32
4.4.3	Soft-Agar-Assay	33

4.5	Molekularbiologische Methoden	34
4.5.1	Isolation von RNA	35
4.5.2	Herstellen von cDNA	35
4.5.3	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	36
4.6	Proteinanalytische Methoden	38
4.6.1	Proteinextraktion	38
4.6.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	38
4.6.3	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	39
4.6.4	Western-Blot	41
4.6.5	Ponceau-S-Färbung der Membran	41
4.6.6	Immundetektion und Chemolumineszenz	42
4.7	Statistische Methoden	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Expressionsanalyse von IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC in verschiedenen Zelllinien	44
5.2	Knockdown-Effizienz der siRNAs	47
5.3	Einfluss der Herunterregulation der Kinasen auf die Vitalität der Pankreaskarzinomzellen	48
5.4	Migrationsverhalten nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK	50
5.5	Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit von Tumorzellen nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK	52
5.6	Einfluss des Knockdowns von IRAK1 und TTK auf die Apoptoserate / Expression apoptotischer Marker	54
6.	Diskussion	56
6.1	Einfluss der fünf Kinasen auf das Verhalten von Pankreaskarzinomzelllinien <i>in vitro</i>	56
6.1.1	Die fünf Kinasen sind sowohl in allen Pankreaskarzinomzelllinien als auch in der Hek293-Zelllinie exprimiert	56
6.1.2	IRAK1- sowie TTK-Hemmung führen zur Minderung der Zellvitalität	57
6.1.3	IRAK1 und TTK haben keinen signifikanten Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der untersuchten Zelllinien	58
6.1.4	TTK ist essentiell für die Metastasierung des PDAC	59
6.1.5	TTK-Hemmung führt zur Apoptoseinduktion	60
6.2	Kritische Auseinandersetzung mit den Methoden dieser Arbeit	62
6.3	Schlussfolgerung	64
6.4	Ausblick	65
7	Zusammenfassung	66
8	Abstract	67
9	Literaturverzeichnis	68

10	Anhang	79
10.1	Abkürzungsverzeichnis	79
10.2	Tabellenverzeichnis	81
10.3	Abbildungsverzeichnis	82
10.4	Verzeichnis akademischer Lehrer	83
10.5	Danksagung	84
10.6	Ehrenwörtliche Erklärung	85

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom gehört zu den zehn häufigsten Krebsarten und steht an vierter Stelle der Krebssterbefälle bei Männern und Frauen in Deutschland (Husmann 2010). In den letzten Jahren sind in Deutschland die Erkrankungsraten bei Männern um 6% und bei Frauen um 17% angestiegen (Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland 2010). Dieser Trend zeigt sich weltweit, vor allem jedoch in den Industrieländern (Bosetti et al. 2012). Da das Pankreaskarzinom ein mittleres Erkrankungsalter von 70 Jahren bei Männern und 76 Jahren bei Frauen aufweist (Zentrum für Krebsregisterdaten 2012), könnte der Trend der steigenden Erkrankungsraten auch durch die demographische Entwicklung in den Industrieländern erklärt werden. Das Pankreaskarzinom ist jedoch keine alleinige Erkrankung des alten Menschen, sondern tritt gehäuft auch bei jüngeren Menschen auf. Je jünger aber der Patient bei Erstdiagnose ist, desto höher ist die Chance eines weniger aggressiven Karzinoms (Brecht et al. 2011).

Frühsymptome des Pankreaskarzinoms sind eine Rarität und unspezifisch. Daher wird das Pankreaskarzinom in den meisten Fällen erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Dies und der Aspekt der frühen Metastasierung sind ein Grund für die ungünstige 5-Jahres-Überlebensrate von 7-8% selbst bei optimaler Therapie (Zentrum für Krebsregisterdaten 2012).

Als sichere Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom gelten die chronische Pankreatitis und Zigarettenrauch, sowie eine genetische Prädisposition (Hassan et al. 2007; Lynch et al. 2009; Nitsche et al. 2011; Vrieling et al. 2010). Weiterhin werden Ernährungsgewohnheiten, Adipositas und berufliche Schadstoffexpositionen als prädisponierende Faktoren untersucht (Andreotti und Silverman 2012; Nothlings et al. 2007a; Nothlings et al. 2007b).

Bisher besteht der einzige kurative Therapieansatz des Pankreaskarzinoms in der Operation (Morgan und Adams 2010). Jedoch ist eine R0-Resektion nur in Einzelfällen möglich und die adjuvante oder palliative Chemotherapie verlängert das Überleben auch nur um wenige Monate. Daher wird nach neueren Therapiemöglichkeiten wie der

„targeted-therapy“ geforscht, worauf auch diese Arbeit basiert. In der Literatur sind unzählige Ansätze zu finden, doch bisher konnte noch keine wirksame „targeted-therapy“ entwickelt werden (Stathis und Moore 2010). Hierzu kommt auch das Problem, dass nicht alle Unterformen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas auf dieselben Chemotherapien gleich gut ansprechen (Collisson et al. 2011). So reagiert der quasi-mesenchymale Typ sensitiver auf eine Gemcitabine-Chemotherapie als der klassische Typ und dies verhält sich umgekehrt unter einer Erlotinib-Therapie (Collisson et al. 2011).

Bis zu 85% der Pankreaskarzinome gehören zur Gruppe der duktales Adenokarzinome und gehen vom Pankreaskopf aus (Ammerpohl und Kalthoff 2007; Mihaljevic et al. 2010). Daher beschäftigt sich diese Arbeit mit Zelllinien des duktales Adenokarzinoms des Pankreaskopfes (PDAC).

2 Aktueller Stand der Wissenschaft

2.1 Bedeutung humaner Kinasen in Pankreaskarzinomzellen

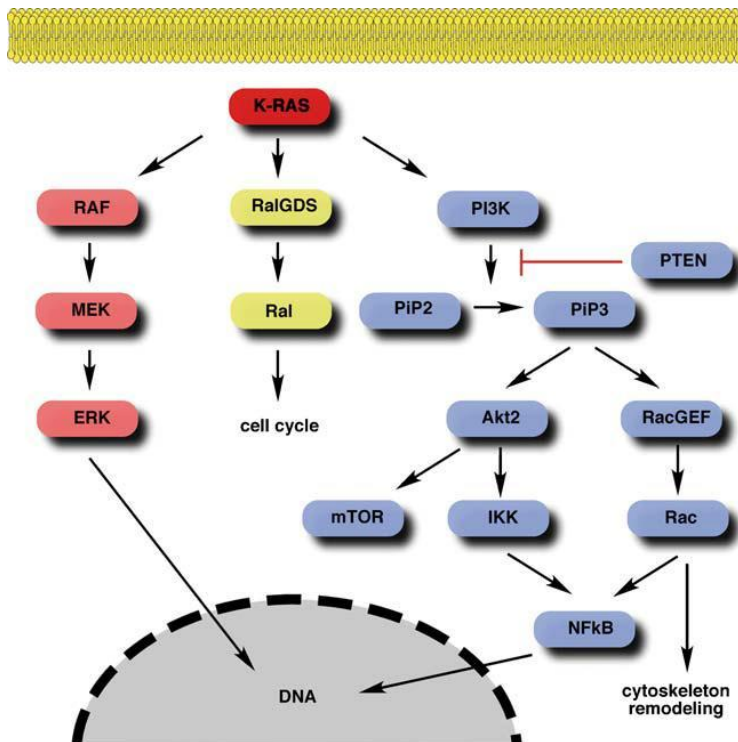
In dieser Arbeit werden fünf verschiedene Kinasen daraufhin untersucht, in wieweit sie mit der Pathogenese und dem Überleben von Pankreaskarzinomzellen in Verbindung stehen. Im günstigsten Fall könnte dies die Grundlage einer neuen „targeted-therapy“ darstellen.

Kinasen sind Enzyme, die einen erheblichen Einfluss auf die Signaltransduktion der Zellen haben. So können sie durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung andere Enzyme oder Transkriptionsfaktoren aktivieren, deaktivieren oder ihre Lokalisation in der Zelle bestimmen. Das jeweilige Resultat ist dabei vom Substrat abhängig.

Kinasen sind ein essentieller Bestandteil von Signalkaskaden, die unter anderem zur Expression von Wachstumsfaktoren oder zum Anhalten des Zellzyklus führen können. Es kann eine Apoptose initiiert oder die Expression weiterer Proteine vorangetrieben werden. Kinasen sind somit essentiell im Lebenszyklus einer Zelle.

In Karzinomzellen wie auch im Pankreaskarzinom sind häufig Kinasen wichtiger proliferativer Signalwege (wie zum Beispiel dem PI3K/Akt-, dem RAS/RAF/ERK- und dem PKC-Signalweg) mutiert, sodass sie ständig aktiviert bleiben und/oder ihre Hemmung durch mutierte pro-apoptotische Proteine, wie zum Beispiel die Bax-Proteinfamilie, wegfällt (Sharma und Settleman 2010; You et al. 2010a).

Ein Beispiel für einen Signalweg, der in fast 100% aller PDAC mutiert ist, ist der K-RAS Signalweg (Mihaljevic et al. 2010; You et al. 2010a). Dieser Signalweg greift über drei verschiedene Signalkaskaden in die Zellproliferation, den Zellzyklus und in die Apoptose ein. Zusätzlich kann hierüber auch eine Tumorangio-genese initiiert werden.



(Mihaljevic et al. 2010)

Abbildung 2.1: Der K-RAS Signalweg. Das G-Protein K-Ras ist in fast allen Pankreaskarzinomen mutiert. Über seine drei Signalwege, den RAF/ERK-, den PI3K/Akt- und den RalGDS-Signalweg, kann es Einfluss auf verschiedene Funktionen in der Zelle ausüben und somit die Proliferation, die Apoptose, die Invasionsfähigkeit und die Angiogenese beeinflussen. Durch die Mutation im K-Ras Gen und wahrscheinlich auch in weiteren Genen der Kinasen dieser Signalkaskaden gerät dieser Signalweg außer Kontrolle und führt u. a. zur unkontrollierten Proliferation der Zelle. (Mihaljevic et al. 2010; You et al. 2010a)

Die in der dargestellten Abbildung aufgeführten Kinasen sind nur einige, bisher besonders gut erforschte Kinasen dieser Signalkaskaden. Zwischen den einzelnen Schritten finden sich noch mehrere nicht so gut erforschte Kinasen, die auch eine bisher noch nicht erkannte zentrale Rolle in der Karzinogenese spielen könnten. Diese Erkenntnis gilt natürlich für alle Signalwege in humanen Zellen und nicht nur für den K-Ras-Signalweg, der hier lediglich ein Beispiel eines im Pankreaskarzinom mutierten Signalweges darstellen soll. Für die Entstehung des Pankreaskarzinoms werden noch viele weitere mutierte Signalwege verantwortlich gemacht, wie zum Beispiel der TGF- β -SMAD-Signalweg, der „hedgehog pathway“ und der WNT/NOTCH-Signalweg (You et al. 2010a; Mihaljevic et al. 2010; Maitra

und Hruban 2008). Insgesamt wurden bisher bis zu 12 verschiedene Signalwege entdeckt, die im Pankreaskarzinom eine Rolle spielen, wobei hier nur die bekanntesten genannt werden (You et al. 2010b). Da all diese Signalwege ineinander greifen, ist noch nicht verstanden, welche und wieviele Mutationen für die Entstehung des Pankreaskarzinoms benötigt werden (You et al. 2010a).

Die Erkenntnis, dass Kinasen eine Schlüsselrolle in der Kanzerogenese spielen, führte dazu, Kinasen als Angriffspunkt verschiedener Pharmaka zu nutzen. Zum Beispiel wird Imatinib, ein Hemmstoff der Tyrosinkinase ABL, zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie eingesetzt (Karow 2012). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib, der zur Therapie des Pankreaskarzinoms zugelassen wurde, hemmt die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor receptor) (Yang et al. 2013).

Im klinischen Alltag werden noch viele weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren therapeutisch genutzt. So wird zum Beispiel auch Sunitinib zum Therapieversuch des Pankreaskarzinoms herangezogen (Awasthi et al. 2011; Cuneo et al. 2008).

Weiterhin werden mittlerweile monoklonale Antikörper hergestellt, die an Rezeptoren und andere Proteine binden, die in der Signaltransduktion von Kinasen involviert sind. Hier ist als Beispiel der monoklonale Antikörper Bevacizumab zu nennen, der an das Zytokin VEGF (vascular endothelial growth factor) bindet und somit die Angiogenese von Karzinomen inhibiert (Karow 2012). Dieser Antikörper wird im klinischen Alltag bei verschiedenen Karzinomen therapeutisch genutzt und nun auch bei der Therapie des Pankreaskarzinoms in Betracht gezogen, wobei hier der Nutzen noch nicht gesichert zu sein scheint (Martin et al. 2012).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass schon einige Versuche gemacht wurden, mittels der Hemmung verschiedener Kinasen eine effektivere Therapie des Pankreaskarzinoms zu erlangen. Doch konnte hierbei noch keine Therapie gefunden werden, die das Überleben stark verlängert. Somit müssen weitere Ansätze erforscht werden, was in dieser Arbeit geschieht.

2.2 Kinasen als molekulare Zielstrukturen für therapeutische Interventionen im Pankreaskarzinom

Im Rahmen eines Kooperationsprojektes zur Generierung neuer therapeutischer Ansätze in der Pankreaskarzinomforschung wurde ein Pilotprojekt am Naturwissenschaftlich-Mathematischen Institut (NMI) Reutlingen durchgeführt, in dem alle humanen Kinasen daraufhin gescreent wurden, inwieweit ihre Herunterregulation mittels siRNA in Pankreaskarzinomzelllinien einen Einfluss auf deren Apoptoserate hat. Dies wurde mit Hilfe eines Caspase-Aktivitätsassay dargestellt. Als Zelllinien wurden Panc-1 Zellen, eine etablierte Pankreaskarzinomzelllinie, und Hek293 Zellen, die als immortalisierte aber nicht maligne transformierte Kontrollen dienten, gegenübergestellt.

Hierbei wurden einige Kinasen identifiziert, deren Herunterregulation mittels spezifischer siRNA eine erhöhte Rate an Caspase-Aktivität und somit eine Apoptose in Pankreaskarzinomzellen, nicht jedoch in untransformierten Kontrollzellen zeigte.

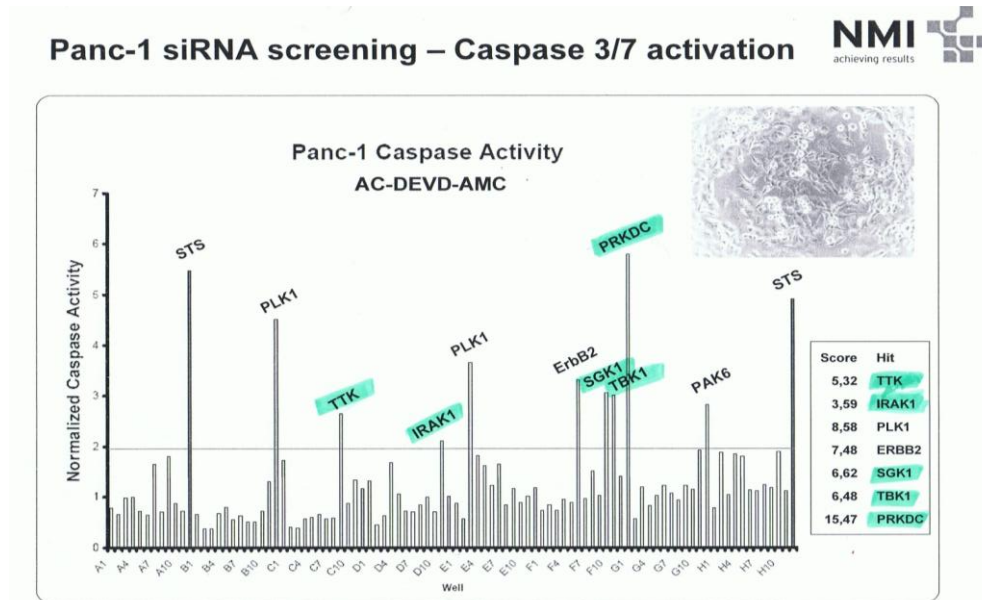


Abbildung 2.2: Panc-1 siRNA screening auf Caspase 3/7 Aktivierung vom NMI Reutlingen für das PakaNostra-Projekt. Die hier benannten Kinasen scheinen eine besondere Bedeutung im Überleben der Panc-1 Zellen zu haben, da durch ihre Hemmung ein festgelegter Schwellenwert der Caspaseaktivität weit überschritten wurde. Diese ausgeprägte Caspaseaktivität deutet auf eine stattfindende Apoptose hin.

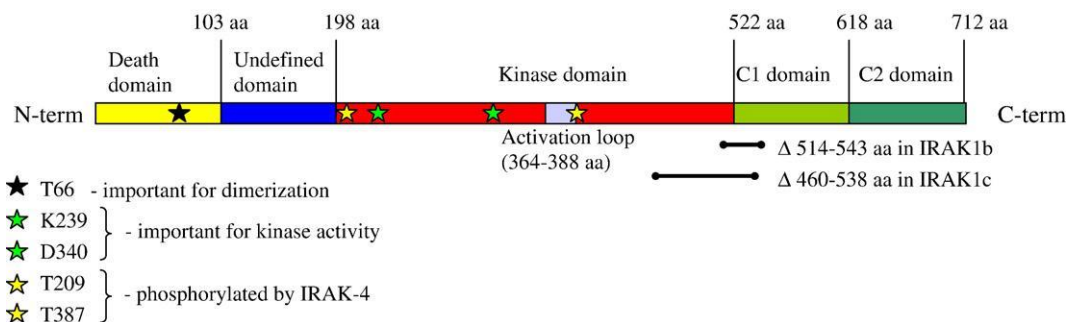
Von diesen Kinasen wurden fünf Kinasen, für die in der Literatur wenige oder keine Daten zu spezifischen Rollen in der Karzinogenese existierten (türkis markiert), für diese Arbeit ausgesucht, um ihre Funktion in Pankreaskarzinomzelllinien genauer zu beleuchten.

2.3 IRAK1

Das Gen IRAK1 kodiert für die Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase und ist ein essentieller Bestandteil der Signalkaskaden der Toll-like-Rezeptoren sowie der meisten Interleukin-1-Rezeptoren, welche in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B resultieren.

Das IRAK1-Gen besteht aus 14 Exons und ist auf dem X-Chromosom lokalisiert (Thomas et al. 1999). Das Genprodukt ist eine Serin/Threonin-Kinase die zur Familie der IRAK-Kinasen gehört. Diese Familie besteht aus vier verschiedenen Serin/Threonin-Proteinkinasen (IRAK1, IRAK2, IRAK3 (IRAKM) und IRAK4), wobei nur die Kinasen IRAK1 und IRAK4 eine Kinasenaktivität besitzen (Gottipati et al. 2008).

Die IRAK1-Kinase ist aus verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut, wobei die genaue Funktion aller Domänen noch nicht vollständig geklärt ist.



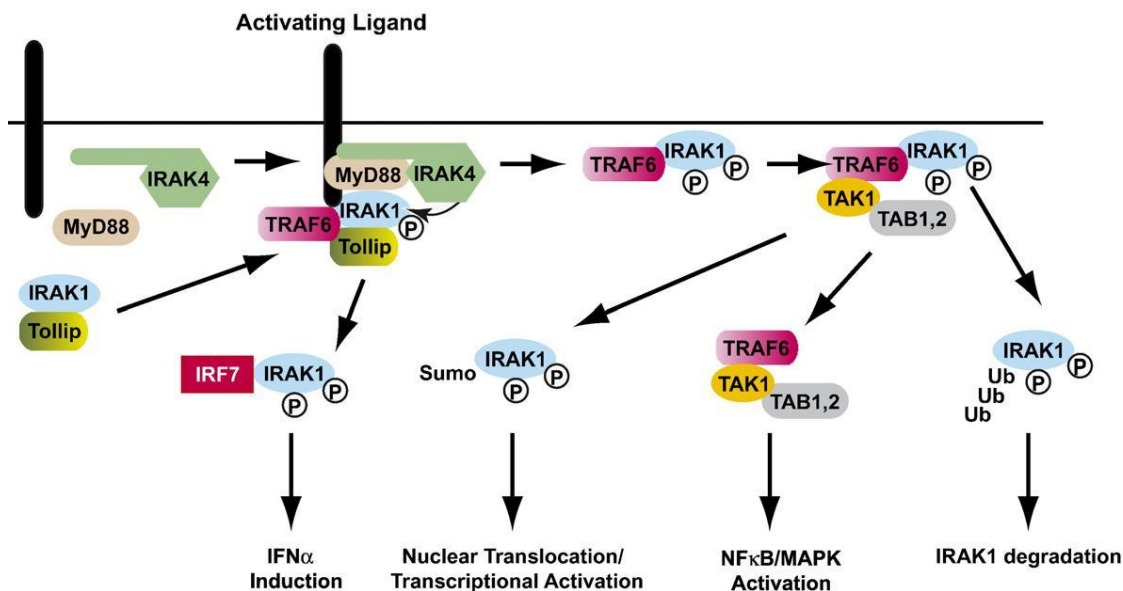
(Gottipati et al. 2008)

Abbildung 2.3.1: Aufbau des IRAK1-Gens.

Zwei alternative Splice-Varianten des humanen IRAK1-Gens sind bisher bekannt: IRAK1b und IRAK1c. IRAK1b fehlt eine Region aus 30 Aminosäuren, was dazu führt, dass es keine Kinaseaktivität besitzt und resistent gegenüber einem Abbau im Proteasom ist. Zusätzlich kann es aber NF- κ B aktivieren und interagiert auch mit der Signalkaskade der IL-1-Rezeptoren (Jensen und Whitehead 2001).

IRAK1c hingegen fehlt das Exon 11, es hat keine Kinasenaktivität und fungiert als ein negativer Regulator der Toll-Like-Rezeptor/IL-1-Rezeptor (TLR/IL-1R)-induzierten Entzündungsreaktion (Rao et al. 2005). Somit scheint IRAK1c ein Gegenspieler der IRAK1-Kinase zu sein.

Die Funktion von IRAK1:



(Gottipati et al. 2008)

Abbildung 2.3.2: Signalkaskade von IRAK1: Im inaktiven Zustand liegen IRAK1 an Tollip gebunden, IRAK4 und MyD88 im Zytosol frei vor. Bindet nun ein Ligand an den Toll-like-/Interleukin-1-Rezeptor (TLR/IL-1R), so interagiert MyD88 mit dem Rezeptor woraufhin sich IRAK1 mit seiner Death Domäne an MyD88 bindet. Zusätzlich interagiert IRAK1 mit TRAF6. Nach der Phosphorylierung durch IRAK4 wird IRAK1 aktiviert und beginnt mit einer Autophosphorylierung, sodass es sich als Komplex mit TRAF6 vom Rezeptor ablösen kann. Mit Hilfe von weiteren Co-Faktoren wie TAK1 und TAB1 und 2 wird NF-κB aktiviert. Weiterhin kann IRAK1 nach Ubiquitinierung abgebaut werden oder mithilfe von SUMO (small ubiquitin-like modifier)-Proteinen in den Zellkern transloziert werden.

IRAK1 wird somit über eine Interleukin-1-Ausschüttung im Rahmen von zum Beispiel einer Entzündungsreaktion über den IL1-Rezeptor aktiviert (Cao et al. 1996). Dadurch gehört IRAK1 zu einem der wichtigsten Faktoren für die Aktivierung von NF-κB (Jensen et al. 2000;

Luftig et al. 2003). Weiterhin stabilisiert IRAK1 unabhängig von TRAF6 die mRNA von NF- κ B (Hartupée et al. 2008) und führt somit zu einer effizienteren Translation.

NF- κ B (= nuclear factor kappa B) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von verschiedenen Genen für Signalwege zur Apoptose-Hemmung, Zellüberleben, Invasionsfähigkeit von Zellen und Tumorangiogenese initiieren kann (Mihaljevic et al. 2010). So wurde auch in vielen Karzinomarten, sowie im PDAC eine ständige Aktivierung von NF- κ B gefunden. Daher wird NF- κ B eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben. In verschiedenen Karzinomarten, wie zum Beispiel dem Mamma-Karzinom wurde ein Einfluss von NF- κ B auf die Metastasierung, die Invasion und die Angiogenese von Karzinomzellen nachgewiesen (Huber et al. 2004; Garg und Aggarwal 2002; Park et al. 2007). Zusätzlich hat sich die Aktivierung von NF- κ B als ein Problem in der Chemotherapieresistenz verschiedener Tumore herausgestellt (Garg und Aggarwal 2002).

Auch im duktalem Adenokarzinom des Pankreas wurde eine Überexpression von IRAK1 im Vergleich zu gesunden Zellen beschrieben (Grutzmann et al. 2004), sowie eine verstärkte NF- κ B-Aktivität im Zusammenhang mit IL-1-Expression (Niu et al. 2004). Dies führt zu der Annahme, dass IRAK1 über die NF- κ B-Aktivierung auch an dem Pathomechanismus des Pankreaskarzinoms beteiligt sein könnte. Eine weitere Arbeitsgruppe hat herausgefunden, dass in Pankreaskarzinomzellen eine verminderte Expression von miRNA-146a im Zusammenhang mit einer verstärkten Expression von IRAK1, EGFR (epidermal growth factor receptor) und NF- κ B zu finden ist. Nachdem sie die Expression der miRNA-146a verstärkten, führte dies zu einer Herunterregulation von IRAK1, EGFR und NF- κ B und somit zur Hemmung der Zellinvasion des Pankreaskarzinoms (Li et al. 2010). Ähnliche Effekte konnten auch in anderen Karzinomarten gezeigt werden (Bhaumik et al. 2008). Diese Ergebnisse zeigen sowohl dass miRNA-146a als ein Antagonist von IRAK1 angesehen werden kann, als auch dass IRAK1 über NF- κ B eine Rolle in der Zellinvasion vom Pankreaskarzinom zu spielen scheint.

IRAK1 hat auch noch weitere Funktionen, wie zum Beispiel die Hemmung von I κ B α (Liu et al. 2008). I κ B α ist ein Regulatorprotein, das NF- κ B durch Komplexbildung im Zytoplasma hält und somit inaktiviert. Dadurch dass IRAK1 I κ B α hemmt, kann NF- κ B in den Zellkern wandern und seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben.

Weiterhin hat IRAK1 die Fähigkeit unabhängig zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu pendeln und im Zellkern das Histon H3 zu phosphorylieren, was auch zur Transkriptionsaktivität führt (Liu et al. 2008). Dies bedeutet, dass IRAK1 in der Lage ist auch unabhängig von NF- κ B die Genexpression zu regulieren.

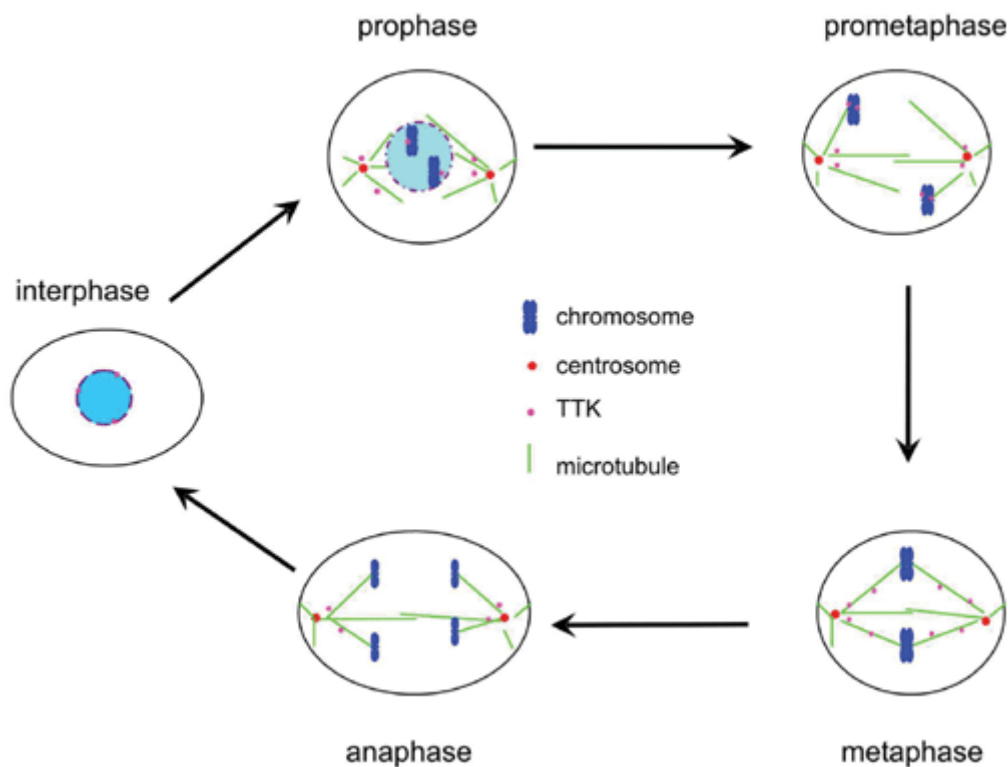
Wie diese Erkenntnisse zeigen, scheint IRAK1 ein viel versprechender Kandidat in der Pathogenese des Pankreaskarzinoms und vielleicht auch ein potentieller Angriffspunkt von Pharmaka zu sein.

2.4 TTK

Das TTK-Gen kodiert für eine Kinase, die sowohl Threonin und Serin, als auch Thyrosin phosphorylieren kann (Mills et al. 1992).

Die TTK-RNA findet sich besonders stark exprimiert in schnell proliferierenden Geweben, wie dem Thymus und dem Hoden. Auch wurde sie in malignen Tumoren gefunden, jedoch nicht in benignem, langsam proliferierenden Geweben (Mills et al. 1992). In T-Zellen kann die Expression von TTK durch IL-2 induziert werden, was zur Passage durch die S- und G₂-Phase des Zellzyklus führt (Schmandt et al. 1994). Die Kinase TTK scheint auch an verschiedenen Zellzyklus-Checkpoints eine Rolle zu spielen. Zum Beispiel führt die Phosphorylierung der Kinase CHK2 durch TTK zum G₂/M-Arrest (Wei et al. 2005).

Weiterhin erfüllt TTK in der Mitose entscheidende Funktionen: TTK phosphoryliert das Zentrosomenprotein TACC2 und trägt somit zur richtigen Lokalisation der Zentrosomen zu Beginn der Mitose bei (Dou et al. 2004). Auch an den Kinetochoren der Zentromere der Chromosomen ist TTK während der Mitose zu finden (Dou et al. 2003). TTK fungiert also an verschiedenen Stellen der Mitose, wie die folgende Abbildung zeigt.



(Dou et al. 2003)

Abbildung 2.4: Schema der Funktion von TTK während der Mitose. TTK wird hier als kleiner pinker Punkt dargestellt. Während der Interphase findet sich TTK nahe der Kernporen und sobald sich der Kern in der Prophase auflöst, geht TTK sowohl an die Kinetochore der Zentromere, als auch an die Zentrosome. Auch während der Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene und der Teilung in Schwesterchromatide, ist TTK weiterhin an den Kinetochoren zu finden. Danach dissoziiert TTK von den Kinetochoren und kehrt zu den Zentrosomen zurück, womit die Zytokinese beginnt.

Die Kinase TTK scheint demnach essentiell für den Zellzyklus und besonders für die Mitose zu sein, was auch mithilfe des Orthologs hMps1 genauer erforscht wurde (Fisk et al. 2004, 2003).

In einigen kolorektalen- und gastralen- Karzinomen konnten TTK-Mutationen gezeigt werden, weshalb man diese Mutationen mit der Pathogenese dieser Tumore in Zusammenhang bringt (Ahn et al. 2009). Weiterhin konnte in diesen Tumoren ein

Ausbleiben der Ausbildung der Spindelapparate nach TTK-Hemmung nachgewiesen werden (Niittymaki et al. 2011).

Ein Zusammenhang zwischen einer TTK-Expression und dem Pankreaskarzinom wurde bisher noch nicht erforscht, obwohl schon im Jahr 2007 in einem Screening eine Überexpression von TTK in PDAC festgestellt wurde (Ammerpohl und Kalthoff 2007).

2.5 SGK1

Das SGK1-Gen kodiert für die 49kDa große Serin/Threonin-Kinase ‚serum-and-glucocorticoid-regulated kinase-1 (SGK1)‘ (Webster et al. 1993) und wurde erstmals in einer Mammakarzinomzelllinie der Ratte gefunden. Das SGK1-Gen liegt auf Chromosom 6p23, eine Region die für ihre häufigen Mutationen in Neoplasien bekannt ist (Waldegger et al. 1998).

Die Kinase SGK1 übernimmt vielfältige Funktionen in der Zelle, wobei noch nicht alle abschließend erforscht sind. Zum einen reguliert sie Kalium-, Natrium-, Kalzium- und Chloridkanäle und zum anderen verschiedene Enzyme und Transkriptionsfaktoren (Lang et al. 2010). Folglich ist SGK1 an der Regelung von Transportmechanismen, der Hormonausschüttung, der neuronalen Erregung, Entzündungen, Zellproliferation und der Apoptose beteiligt (Lang et al. 2010).

Einen Großteil seiner Funktionen übt SGK1 über seine Funktion als Teil der PI3K-Signalkaskade (siehe Abbildung 2.1) aus (Park et al. 1999). SGK1 fungiert parallel zur Kinase Akt im PI3K-Signalweg (Lang et al. 2010). Beide Kinasen haben ähnliche und sich zum Teil ergänzende Funktionen und können zum Beispiel beide, je an verschiedenen Stellen, das Forkhead-Box-Protein FKHRL1 phosphorylieren und somit inaktivieren, was zur Inhibition von Zellzyklusarrest und zur Apoptose führt (Brunet et al. 2001). Zusammen verstärken diese beiden Kinasen also die Auswirkungen des PI3K-Signalwegs im Bezug auf das Zellüberleben, den Zellzyklus, sowie dessen Wirkung im Zellkern auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und β -Catenin (Brunet et al. 2001; Lang et al. 2010).

SGK1 ist nicht nur ein Bestandteil des PI3K-Signalwegs, es interagiert auch mit dem RAS/RAF/ERK-Signalweg, der auch für seine Bedeutung in der Onkogenese bekannt ist

(Bruhn et al. 2010). Jedoch ist man sich hier noch nicht sicher, welche der drei Isoformen der SGK-Kinasenfamilie (SGK-1,-2 oder-3) daran maßgeblich beteiligt ist.

Auch in der Regulation des Zellzyklus scheint SGK1 eine Rolle zu spielen, wobei auch hier die Bedeutung noch nicht ganz klar ist. SGK1 pendelt in Abhängigkeit vom Zellzyklus zwischen Zellkern und Zytoplasma. Eine Hemmung dieser Pendelbewegung führte zum Zellarrest (Buse et al. 1999).

SGK1 ist in einigen Tumorarten verstärkt exprimiert, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom oder dem Nierenzellkarzinom (Lang et al. 2010). Hierbei wurde ihrer Funktion im PI3K-Signalweg eine besonders hohe Bedeutung beigemessen. Jedoch entwickelten sich SGK1-knockout-Mäuse größtenteils normal (Lang et al. 2010). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass im Fall des Ausfalls von SGK1, die Kinase Akt dessen Funktion teils übernehmen könnte und umgekehrt (Sahoo et al. 2005).

Weiterhin wurde festgestellt, dass man im Prostatakarzinom ein androgenabhängiges Wachstum mit Hilfe von SGK1-Inhibitoren abschwächen kann (Lang et al. 2010). Auch der Einfluss von SGK1 auf die Chemotherapieresistenz verschiedener Tumore wird diskutiert (Lang et al. 2010).

Eine Rolle im Pankreaskarzinom wurde bisher noch nicht erforscht, jedoch wurde eine verstärkte Expression dieser Kinase im PDAC beschrieben (Ammerpohl und Kalthoff 2007).

2.6 TBK1

Die TANK-binding-kinase1 (=TBK1) gehört zur Familie der IKK-ähnlichen (= IκB-Kinase-Komplex) Kinasen und ist sowohl an der Signaltransduktion des angeborenen Immunsystems beteiligt, als auch an der Aktivierung von NF-κB und weiteren Transkriptionsfaktoren, was zur Apoptosehemmung beiträgt (Pomerantz und Baltimore 1999; Clément et al. 2008).

TBK1 scheint in vielen verschiedenen Signalwegen von Bedeutung zu sein, die mutmaßlich an der Zelltransformation und Tumorprogression beteiligt sind (Clément et al. 2008). So kann TBK1 zusammen mit TANK und TRAF2 (=TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 2) einen Komplex bilden, der über eine Aktivierung von der Kinase NIK (=NF-κB-induzierende Kinase) zur Aktivierung des IKK-Komplexes führt. Dieser IKK-Komplex hemmt IκB, wodurch NF-κB frei

wird und in den Zellkern translozieren kann, um dort als Transkriptionsfaktor zu fungieren, was zur Expression von Genen für die Immunantwort, Entzündungsreaktionen und antiapoptotische Effekte führt (Pomerantz und Baltimore 1999; Bharti und Aggarwal 2002). Seine Kinaseaktivität kann TBK1 nur durch Bindung an TANK ausüben (Goncalves et al. 2011).

Dieser Signalweg zur Aktivierung von NF- κ B durch den TBK1-TANK-TRAF2-Komplex scheint nur eine Alternative zur Aktivierung durch TRAF alleine zu sein (Pomerantz und Baltimore 1999). Pomerantz et al. konnten zeigen, dass eine Hemmung von TBK1 zwar den genannten Komplex hemmt, jedoch nicht die Aktivierung von NF- κ B über andere Signalwege.

Weiterhin ist TBK1 auch an dem Akt-Signalweg beteiligt, indem TBK1 die Kinase Akt phosphoryliert (Ou et al. 2011). Wie oben beschrieben, birgt der Akt-Signalweg auch ein onkogenes Potential.

In weiteren Publikationen wird TBK1 als „Trigger“ (Korherr et al. 2006) für Signalkaskaden des Tumorwachstums bezeichnet. Auch in der Tumorangiogenese spielt TBK1 eine Rolle, da TBK1 unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird und am IRF3-Signalweg beteiligt ist, der unter anderem für die Aktivierung der Gefäßproliferation bekannt ist (Korherr et al. 2006).

TBK1 kann zusätzlich über PAI-2 (= Plasminogen-activator inhibitor-2) die Caspase-3 vermindern, was zur Hemmung der Apoptose führt (Delhase et al. 2012). Weitere Publikationen beschreiben eine Apoptoseinduktion durch TBK1-Hemmung in Karzinomen, die durch K-Ras Mutationen entstanden sind (Barbie et al. 2009; Mihaljevic et al. 2010).

All diese Forschungsergebnisse zeigen, dass TBK1 auch ein interessanter Kandidat in der Tumorforschung ist und daher als Angriffspunkt einer Chemotherapie in Frage kommen kann (Lee und Hung 2008).

2.7 PRKDC

Das Transkriptionsprodukt des Gens PRKDC ist die katalytische Untereinheit der DNA-dependent Protein Kinase DNA-PK und wird DNA-PKcs genannt (Fujimori et al. 2002). Diese Kinase gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) und ist eine im Zellkern aktive Serin/Threonin Kinase (Smith et al. 1999).

Die DNA-PK besteht aus 3 Untereinheiten: Der DNA-PKcs, für die PRKDC kodiert, und zwei DNA-bindende Komponenten namens Ku 70 und Ku80 (Lee und Kim 2002). Nur mithilfe von den Ku-Komponenten kann DNA-PKcs an die DNA gelangen, um dort in Gegenwart von strahleninduzierten DNA-Schäden aktiviert zu werden (Lee und Kim 2002). Dieser Aktivierungsmechanismus ist bisher jedoch noch ungeklärt.

Die DNA-abhängige Proteinkinase hat ihre Funktion in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA sowie in der für die Antikörpervielfalt wichtigen V(D)J-Rekombination (Fujimori et al. 2002; Meek et al. 2004).

DNA-PK identifiziert DNA-Schäden und kann daraufhin einige DNA-bindende und nicht-DNA-bindende Proteine, sowie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit aktivieren. Darunter befindet sich auch der Tumorsuppressor p53, dessen Phosphorylierung durch DNA-PK zur Akkumulation führt und über verschiedene Signalwege im Zellzyklusarrest oder in der Apoptose resultiert (Rassow 2008).

Somit spielt DNA-PK nicht nur eine Rolle im Immunsystem und der nichthomologen End-zu-End Verknüpfung von Doppelstrangbrüchen der DNA sondern auch im Zellzyklus.

Bisher wurde die DNA-abhängige Proteinkinase im Zusammenhang mit Karzinomen wenig erforscht. Eine Mutation im PRKDC-Gen ist für die Entwicklung eines Mammakarzinoms mitverantwortlich (Yu et al. 2001; Fabre et al. 2011). Weitere Mutationen im PRKDC-Gen, wie zum Beispiel ein single nukleotid Polymorphismus, führen zu einer verringerten DNA-Reparatur und somit zu einem erhöhtem Karzinomrisiko (Fabre et al. 2011).

Eine mögliche Assoziation zwischen der DNA-abhängigen Proteinkinase und dem Pankreaskarzinom wurde bisher nur bei Ammerpohl et al. 2007 beschrieben. Hier wurde eine verstärkte Expression des PRKDC-Gens im PDAC festgestellt (Ammerpohl und Kalthoff 2007).

3 Zielsetzung der Arbeit

Wie zuvor beschrieben war das Ziel dieser Arbeit die fünf genannten Kinasen auf ihre Funktion im Pankreaskarzinom hin zu untersuchen. Hierbei sollten die Ergebnisse des Screenings des NMI Reutlingen bezogen auf die verstärkte Expression dieser Kinasen im PDAC bestätigt werden.

Weiterhin wurde der Einfluss einer Hemmung dieser Kinasen auf das Zellüberleben des PDAC im Vergleich zu unbehandelten und untransfizierten Zellen untersucht. Zeigten diese Experimente einen Einfluss einiger Kinasen auf das Zellüberleben, wurden mit diesen Kinasen weitere Versuche unternommen.

Zusätzlich sollte der Einfluss der Kinasen auf das Migrations- und das substratunabhängige Koloniebildungsverhalten mittels geeigneter und etablierter Assays untersucht werden.

Zuletzt wurde untersucht, ob eine Hemmung der Kinasen tatsächlich zur Apoptose führt und was im Vergleich hierzu mit einer untransformierten Zelllinie passiert.

Somit sollten die Kinasen auf ihren Einfluss auf wichtige Eigenschaften einer Karzinomzelle hin getestet werden. Im Falle, es fände sich eine Kinase, dessen Herunterregulation zur Hemmung dieser Eigenschaften von Karzinomzellen führe und gesunde Zellen unbeschadet ließe, hätte man einen neuen Angriffspunkt für eine „targeted-therapy“ gefunden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

4.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung Rotiphorese	Darmstadt (D)
Acrylamidlösung Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (D)
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg (D)
Aqua ad injectabilia Diaco	Serag-Wiessner KG, Naila (D)
DMSO (Dimethylsulfoxid) ≥99,5%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (D)
Ethanol	Otto Fischar GmbH&Co.KG, Saarbrücken
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hannover
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	MERCK, Darmstadt (D)
Thiazolylblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (D)

4.1.2 Laborgeräte

7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, USA
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau (D)
Digitalentwickler	HR16-3200 Imager und Intas ChemoCam, INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Florenz
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA Healthcare NV, Mortsel (B)
Fotometer Multiskan FC	Thermo scientific®
Inverted Microscope Model IMT-2	Olympus, Hamburg (D)
Kreisschüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen (D)
Labofuge 400e	Heraeus Instruments, Hanau (D)

Mini Trans-Blot® Cell	Bio Rad, Hercules (USA)
Multifuge 3SR+	Heraeus Instruments, Hanau (D)
Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipetten 2-, 10-, 100-, 1000µl	Eppendorf®, Hamburg (D)
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Zizers (CH)
Serie 6000 Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments, Hanau (D)
Sicherheitswerkbank Lamin Air HB2448	Heraeus Instruments, Hanau (D)
Spektrophotometer Nanodrop ND1000	PeqLab, Erlangen (D)
Techne DRI Wärmeblock DB2A	Bibby Scientific Limited, Stone (UK)
Ultraschallhomogenisator Labsonic®U	Braun, Göttingen (D)
Vortexer Vibro-Fix VF2	IKA-Labortechnik, Staufen (D)
Waage AE 163/9	Mettler Toledo, Greifensee (CH)
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach (D)
4.1.3 Kit-systeme	
Omniscript® RT-kit (200)	Qiagen, Hilden (D)
Peq GOLD Total RNA Kit	peqLab Biotechnologie, Erlangen (D)
Superscript	Life Technologies™
4.1.4 Medien	
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium:	
1x (4,5g/l Glucose, Glutamin, Pyruvat)	Gibco® Invitrogen (USA)
FCS (fetal Bovine Serum) Gold	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)

Dulbecco's PBS 1x without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Gentamycin (10mg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Trypsin-EDTA 1x	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)

4.1.5 Reagenzien

siLentFect™ Lipid Reagent	BioRad, Hercules (USA)
PowerSYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems™ (USA)
ECL Plus Lumigen™ PS-3 detection reagent Solution A & B	GE Healthcare
Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent	Thermo scientific (USA)
Protease Arrest™	GBiosciences (USA)

4.1.6 Verbrauchsmaterialien

96-Well Cluture Plate, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
BD Falcon™ Cell Culture Inserts 8µm	BD Biosciences (USA)
Cell Culture Flasks, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Cell scraper 25cm, Sarstedt	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Combitips Plus 2,5ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Einmalpipetten 2-, 5-, 10-, 50ml, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Falcons 10-, 15-, 50ml pyrogenfrei, Sarstedt	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
MicroAmp® 96-Well Reaction Plate für qRT-PCR	Applied Biosystems™ (USA)
Multiwell™ 24-Well Plate	BD Biosciences (USA)
NC-Membran Optitran BA-S83 Reinforced	Whatman GmbH, Dassel (D)
Tissue Culture Plate 6-Well, Sarstedt	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)

4.1.7 Antikörper

Antigen	Klonalität	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Besonderheiten
PARP1	polyklonal	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology®, Danvers (USA)	
β-Actin	polyklonal	Ziege	1:5000	Santa Cruz (USA)	HRP-gekoppelt

Tabelle 4.1.7 Antikörper

4.1.8 Primer

Transkript	Forward Primer	Reverse Primer	Hersteller
IRAK1	5'-cctagcaagaattctg-3'	5'-ctcgcaggtcgtaaag-3'	Biomers.net GmbH, Ulm
TTK	5'-tggccaacctctgttt-3'	5'-aatgaattcaagaaga-3'	
SGK1	5'-actcccccttcaaatg-3'	5'-gggacttgccgagttg-3'	
TBK1	5'-gaagcggcagggtgaa-3'	5'-tgtcgatatcggttc-3'	
PRKDC	5'-aagtttagcagaatcca-3'	5'-ctcgtgccacacatag-3'	

Tabelle 4.1.8 Primer

4.1.9 siRNA

Der Begriff siRNA steht für small interfering RNA. Dies ist eine RNA-Sequenz, die komplementär zu einem Teil der mRNA eines speziellen Gens ist. An diese mRNA kann sich die dazugehörige siRNA mithilfe verschiedener Enzyme anlagern und so zum Abbau der Ziel-mRNA führen. Durch dieses Gen-silencing kann die Synthese ausgewählter Proteine einer Zelle behindert werden (Miele et al. 2012).

In dieser Arbeit wurden speziell siRNA-Sequenzen verwendet, die an die mRNA der zu untersuchenden Kinasen binden und diese somit inhibieren. Pro zu untersuchender Kinase wurde ein Pool aus vier verschiedenen siRNAs eingesetzt, die je an einer anderen Stelle der mRNA binden konnten, um so eine möglichst effektive Hemmung der Kinase zu garantieren.

Zu jedem Versuch wurde eine sogenannte siKontrolle mitgeführt. Die siKontrolle ist eine siRNA die an keine mRNA bindet und daher keine Funktion besitzt. Somit konnte man einen Vergleichswert schaffen, um toxische Effekte der Transfektion sowie Off-target-Effekte kontrollieren zu können.

Die siRNA wurde gefriergetrocknet geliefert, sodass sie mit 100µl sterilem, RNase-freiem Wasser zu einer 10µM Lösung verdünnt werden musste. Sie wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

Für die Transfektion wurde ein siRNA-Pool aus den vier, in Tabelle 4.1.9 gelisteten, siRNAs hergestellt.

siRNA-Pool	Poolbestandteile	Ziel Sequenz	Hersteller
IRAK1	Hs_IRAK1_5	ccgggcaattcagtttctaca	Qiagen, Hilden (Deutschland)
	Hs_IRAK1_6	tcccatcgccatgcagatcta	
	Hs_IRAK1_10	aagcaagtcaggtttcatgta	
	Hs_IRAK1_11	ctgggtcatgtgccgcttcta	
TTK	Hs_TTK_6	cagcaataccttggatgatta	
	Hs_TTK_7	tccgactttatgattatgaaa	
	Hs_TTK_12	ttggtcgttacagcaagcaa	
	Hs_TTK_2	ttggactgttatactcttgaa	
SGK	Hs_SGK_5	cacagctgaaatgtacgacaa	
	Hs_SGK_6	ctgggctgtgatgacgaatat	
	Hs_SGK_1	ttgggttataacactagtata	
	Hs_SGK_2	tacaggcttatttgaatgta	
TBK1	Hs_TBK1_6	cagaacgtagattagcttata	
	Hs_TBK1_7	ctgacttgacacgtttgtaaa	
	Hs_TBK1_5	aaagcggcagagtttagtgaa	
	Hs_TBK1_1	caggatatcgacagcagatta	
PRKDC	Hs_PRKDC_6	ttcggctaactcgccagtta	
	Hs_PRKDC_8	gaccctgttgacagtacttta	
	Hs_PRKDC_5	ctcgtgtattacagaaggaaa	
	Hs_PRKDC_11	ccgccagtctccacacccaa	
siKontrolle	Accell® Control siRNA, Non-Targeting siRNA#1, Thermo Scientific Dharmacon®		

Tabelle 4.1.9 siRNA

4.2 Zellkultur

4.2.1 Zelllinien

Alle Zelllinien sind adhärenente, eukaryotische und humane Zelllinien.

Hek293: Die Hek293-Zelllinie (human embryonic kidney cells) ist eine immortalisierte, epitheliale Zelllinie, die mit DNA-Teilen des Adenovirus 5 transformiert wurde (Graham et al. 1977). Die Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sehr einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind. In dieser Arbeit wurden sie als Model für gesunde epitheliale Zellen gehandhabt und als Vergleich zu den Karzinomzelllinien herangezogen.

Panc1: Die Panc1-Zelllinie entstammt dem Primärtumor eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas (Elsasser et al. 1992) und zeichnet sich dadurch aus, dass sie mit den normalen duktales, epithelialen Zellen des Pankreas viele Eigenschaften gemein hat (Madden und Sarras 1988).

PaTu-8988t (im Folgenden als 8988t bezeichnet): Diese Zelllinie entstammt einer humanen Lebermetastase eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas und dient als Model für diese Tumorentität (Elsasser et al. 1992).

S2-028 (im Folgenden als Suit028 bezeichnet): Die Suit028-Zelllinie gehört mit ihrer Schwesterzelllinie Suit007 zur SUIT-2-Zelllinie, welche von einer Lebermetastase des humanen PDAC stammt. Suit-028 zeichnet sich durch eine einfache Handhabung, sowie ein Wachstum auch in serumfreien Medium aus (Iwamura et al. 1987). Suit-028 bildet, im Gegensatz zu Suit007, trotz seiner Herkunft selten Metastasen und ist bekannt für seine schlechten Migrationseigenschaften (Buchholz et al. 2003).

4.2.2 Medien und Medienzusätze

Die verwendeten Kulturmedien und deren Zusätze wurden von Gibco® Invitrogen und PAA Laboratories GmbH bezogen.

Dem Kulturmedium DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) wurden 10% FCS (fetale calf serum) und 0,5% Gentamycin hinzugefügt. Alle Zelllinien wurden in diesem komplettierten Medium kultiviert.

Als serumfreies Medium wird im folgenden DMEM + 0,5% Gentamycin bezeichnet.

4.2.3 Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxidgehalt und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in 75cm² großen Kulturflaschen in oben genanntem Nährmedium inkubiert. Außerhalb des Brutschrankes wurde mit den Zelllinien nur unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank gearbeitet.

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Passagieren, Zählen und Aussäen von Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-100% wurden die Zellen gesplittet, indem erst das Nährmedium abgesaugt wurde und die Zellen dann mit Trypsin von ihrem Untergrund abgelöst wurden. Hierzu wurden sie für 5-10 Minuten in den Brutschrank zurück gestellt. Nachdem die Zellen sich gelöst hatten, wurden sie mit einer Pipette mehrfach resuspendiert und das Trypsin mit, je nach Splitfaktor, 7-12ml Nährmedium verdünnt. Nach wiederholtem Resuspendieren wurde 1ml der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche gegeben, in die zuvor 13ml frisches Nährmedium pipettiert worden war.

Gezählt wurden die Zellen mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer. Dazu wurden aus der Zellkulturflasche mit den durch Trypsin abgelösten Zellen 10µl Zellsuspension entnommen und auf die Zählkammer pipettiert. Die Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer wurden unter dem Mikroskop gezählt und der Mittelwert ermittelt. Dieser Mittelwert wurde mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert und dieser Wert entsprach der Zellzahl in einem Milliliter der Zellsuspension.

4.3.2 siRNA Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte 24 Stunden nachdem die Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät worden waren. Pro Well der 6-Well-Platte wurden 200.000 Zellen ausgesät (mit Ausnahme der Hek293 Zelllinie: hier wurden pro Well 400.000 Zellen ausgesät, da diese Zelllinie langsamer proliferierte).

Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium in den Wells abgesaugt, durch 1,5ml frisches Wachstumsmedium ersetzt und die 6-Well-Platte wurde wieder in den Brutschrank gestellt.

Für jede Transfektion wurden 150µl serumfreies Medium mit 3µl siLentFect (siLentFect™ Lipid Reagent, BioRad), sowie 150µl serumfreies Medium mit 3,6µl der jeweiligen siRNA (entspricht 240nM siRNA und somit einer Endkonzentration des gesamten Transfektionsmediums von 20nM) vorbereitet. Die verdünnte siRNA wurde zum verdünnten siLentFect pipettiert, gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden je die 300µl der inkubierten siRNA-siLentFect-Lösungen zu den 1,5ml Wachstumsmedium in die 6-Well-Platte pipettiert.

24 Stunden nach der Transfektion wurden die jeweiligen Versuche gestartet.

4.3.3 Kryokonservierung

Um die Zelllinien über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie kryokonserviert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin abgelöst worden waren, wurde die Zellsuspension für 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2ml 10% DMSO in FCS resuspendiert und mit Hilfe eines Propanolbades, das ein langsames und somit schonenderes Herunterkühlen gewährleistet, bei -80°C weggefroren. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

Das Auftauen erfolgte bei 37°C. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie zu Wachstumsmedium in eine Kulturflasche pipettiert. Nachdem sich die lebenden Zellen angeheftet hatten, wurde das Medium erneut gewechselt.

4.4 Funktionelle Versuche

Zu jedem Versuch wurde zusätzlich eine siKontrolle sowie ein Well mit der untransfizierten Zelllinie untersucht, damit ein Vergleichswert geschaffen werden konnte. Alle Ergebnisse wurden bei der Auswertung auf das Ergebnis der siKontrolle normalisiert.

4.4.1 MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay wird der Einfluss verschiedener Substanzen (hier: die Herunterregulation der verschiedenen Kinasen durch siRNA) auf das Überleben der Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht. Vitale Zellen, die NADH/NADPH produzieren, reduzieren den gelben, wasserlöslichen Indikatorfarbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu dem blauen, wasserunlöslichen Formazan (Berridge und Tan 1993). Somit ist die Blaufärbung ein Indikator für das Zellüberleben (Mosmann 1983).

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Dreifachbestimmung in eine 96-Well-Platte ausgesät, wobei sowohl ein 48-Stunden- als auch ein 72-Stunden-Versuch (nach Transfektion) angelegt wurde, und bis zum nächsten Tag weiterkultiviert. Je Well wurden 5000 Zellen in 200µl Wachstumsmedium ausgesät.

Das Medium wurden je nach Versuch nach 48- oder nach 72 Stunden (nach Transfektion) abgesaugt und durch 200µl 1:13 verdünntes MTT-Reagenz ersetzt, wobei 1ml MTT mit 12ml serumfreien Medium gemischt wurden. Das MTT-Reagenz bestand aus 5mg Thiazolylblau gelöst in 1ml PBS.

Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Stunden, währenddessen sich die vitalen Zellen blau färbten, wurde die MTT-Lösung wieder abgesaugt. Um den blauen Farbstoff aus den Zellen zu lösen, wurden die Zellen mit 50µl DMSO (Dimethylsulfoxid ≥99,5%, Carl Roth GmbH & Co.KG) + 150µl PBS pro Well behandelt. Anschließend wurde die Stärke der Blaufärbung mittels Fotometer (Fotometer Multiskan FC, Thermo scientific®) bei 570nm gemessen.

4.4.2 Migrationsassay

Mit dem Migrationsassay sollte ein möglicher Einfluss der Herunterregulation der genannten Kinasen auf das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinien untersucht werden.

Das Prinzip dieses Migrationsassays basiert auf einem FCS-Konzentrationsgradienten zwischen zwei Kompartimenten, die durch eine Membran mit 8µm großen Poren getrennt sind. Die Zellen müssen somit aktiv durch die Poren migrieren, um in das Medium mit erhöhtem FCS-Gehalt zu gelangen (Chen 2005).

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je Well mit 0,5ml Trypsin vom Untergrund abgelöst. Anschließend wurden sie in je 2ml serumfreien Medium resuspendiert und gezählt.

Weiterhin wurde in die Wells einer speziellen 24-Well-Platte (Multiwell™ 24-Well Plate, BD Biosciences) 750µl eines 10% FCS-haltigen Mediums vorgelegt. In diese Wells wurden nun die Inserts (BD Falcon™ Cell Culture Inserts 8µm, BD Biosciences) hineingehängt. In jedes Insert wurden 40 000 Zellen in 0,5ml serumfreien Medium als Doppelbestimmung pipettiert. Die Zellen wurden 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Da die 8988t Zellen langsamer migrierten, wurden sie für 6 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Flüssigkeit der Inserts vorsichtig abgekippt, kurz in PBS gewaschen und umgedreht auf einem Papier zum Abtropfen abgestellt. Anschließend wurden die Inserts für 10 Minuten in eine neue 24-Well-Platte mit je 500µl eiskaltem Methanol gehängt. Somit wurden die Zellen an der Membranunterseite fixiert. Danach wurde der Inhalt der Inserts wieder vorsichtig abgekippt und die Inserts wurden für 7 Minuten in eine weitere 24-Well-Platte mit je 500µl 0,5% Krystal-Violett in 25% Methanol gehängt. Dies färbte die fixierten Zellen blau an.

Nun wurden die Inserts erst in PBS, anschließend vorsichtig unter fließendem Leitungswasser gewaschen und dann mit fusselfreien Kosmetiktüchern von innen ausgewischt. So sollten Zellen, die nicht durch die Membran migriert waren, entfernt werden.

Die Inserts wurden unter dem Mikroskop (4-fach Objektiv) fotografiert. Dabei wurden je Insert zwei peripher gelegene Bilder gemacht.

Die migrierten Zellen wurden mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ (bereitgestellt von Wayne Rasband (NIH)) ausgezählt.

4.4.3 Soft-Agar-Assay

Mit dem Soft-Agar-Assay wurde der Einfluss des Knockdowns der Kinasen auf das substratunabhängige Wachstum von Pankreaskarzinomzellen untersucht.

Das substratunabhängige Wachstum ist eine Besonderheit von malignen Zellen und steht in Zusammenhang mit der Fähigkeit zu metastasieren. Benigne epitheliale Zellen würden ohne Signale anderer Zellen in eine Apoptose übergehen, die sogenannte „Anoikis“ (Frisch und Francis 1994).

Durch den Softagar werden die einzelnen Zellen auf Distanz gehalten, sodass sie sich untereinander keine Wachstumsfaktoren und -signale übermitteln können. Somit wird getestet, ob eine einzige Zelle unabhängig von anderen eine Kolonie bilden kann.

Hierfür wurde ein 0,6%iger Soft-Agar aus 5ml 5%igen aufgekochten BactoAgar (Bacto™ Agar, BD) und 37ml Wachstumsmedium (41°C) hergestellt. Von diesem Soft-Agar wurden je 1ml in eine 12-Well-Platte pipettiert und zum Aushärten bei Raumtemperatur abgestellt, während der restliche Soft-Agar in einem Wärmeschrank bei 41°C flüssig gehalten wurde.

Die am Vortag transfizierten Zellen wurden gezählt und es wurde eine Zelldichte von 20 000 Zellen pro 1ml eingestellt. Pro Zelllinie wurden 2ml des warmen, flüssigen Soft-Agars mit je 1ml der Zellsuspension gemischt und als Doppelbestimmung je 1ml des Gemischs auf den ausgehärteten Soft-Agar in die 12-Well-Platte pipettiert. Nachdem auch diese Schicht bei Raumtemperatur ausgehärtet war, wurden noch je Well 1ml Wachstumsmedium darauf pipettiert.

Die 12-Well-Platte wurde daraufhin im Brutschrank für 8 Tage inkubiert, wobei nach 4 Tagen neues Wachstumsmedium hinzu pipettiert wurde.

Nach 8 Tagen wurden die gebildeten Kolonien unter dem Mikroskop gezählt. Hierbei wurden jeweils vier Blickfelder (bei 12-, 3-, 6- und 9Uhr) ausgezählt und addiert.

4.5 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Methoden kamen einerseits zum Einsatz, um eine Expression der Kinasen in Pankreaskarzinomzelllinien nachzuweisen. Andererseits sollte auch ein knockdown-Effekt der siRNAs auf mRNA-Ebene bewiesen werden, um somit die Effizienz der Transfektion zu zeigen. Dies wurde parallel zu jedem MTT-Assay, nach Entnahme des benötigten Zellvolumens, aus den übriggebliebenen Zellen durchgeführt.

4.5.1 Isolation von RNA

Zunächst musste die RNA aus den transfizierten Zelllinien extrahiert werden. Dafür wurden die Zellen 48- bis 72 Stunden nach Transfektion mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers (Cell scraper 25cm, Sarstedt) in 0,5ml PBS abgeschabt. Diese Zellsuspension wurde aufgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt.

Aus den Zellpellets wurde mit Hilfe eines Kit-Systems (Peq GOLD Total RNA Kit, peqLab Biotechnologie) RNA isoliert. Hierzu wurden die Zellpellets homogenisiert und unter denaturierten Bedingungen lysiert, wobei die vorhandenen RNAsen und sonstigen Enzyme inhibiert wurden. Das Lysat wurde dann auf eine sogenannte HiBind-Zentrifugensäule geladen, welche die RNA bindet, sodass die restlichen Zellulären Bestandteile herausgewaschen werden konnten. Anschließend wurde die gereinigte RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Die erhaltene Menge an RNA wurde mit Hilfe des Nanodrops (Spektrophotometer Nanodrop ND1000, PeqLab) bestimmt.

Diese RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

4.5.2 Herstellen von cDNA

cDNA wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase aus RNA hergestellt. Hierzu wurde das Kit-System Superscript (Life Technologies™) verwendet. $1\mu\text{g}$ der extrahierten RNA wurde mit Aqua dest. auf $24\mu\text{l}$ Volumen aufgefüllt und nach Zugabe von $1\mu\text{l}$ $50\mu\text{M}$ Oligo-dT (Life Technologies™) für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Lösung auf Eis gelegt und mit $14,5\mu\text{l}$ Mastermix versetzt.

Mastermixbestandteile	Volumen	Hersteller
5x First Strand Buffer	$8\mu\text{l}$	Life Technologies™
0,1M DTT	$4\mu\text{l}$	
dNTP's Mix (10mM)	$2\mu\text{l}$	
Reverse Transkriptase	$0,5\mu\text{l}$	

Tab. 4.5.2 Superscript Mastermix

Diese Lösung wurde nun für 50 Minuten bei 42°C und danach nochmals für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bis zum Gebrauch für die qRT-PCR bei -20°C gelagert.

4.5.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Während der qRT-PCR werden nicht nur die gewünschten DNA-Abschnitte exponentiell repliziert, sondern es wird auch die Menge an amplifiziertem Material nach jedem Zyklus gemessen. Dies geschieht durch das fluoreszierende Substrat Sybr green (PowerSYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems™), welches in die doppelsträngige DNA interkaliert und detektiert wird. Als Referenz für das Mengenverhältnis der gesuchten DNA-Abschnitte wurde das sogenannte Housekeeping-gen RPLP0 ebenfalls amplifiziert.

Für die qRT-PCR wurde als erstes eine 1:20 Verdünnung aller Primer (Tab.4.1.8 Primer) durchgeführt. Als nächstes musste für jedes Primerpaar ein Mastermix angesetzt werden, von dem 19µl in jedes dazugehörige Well einer 96-Well-Platte (MicroAmp® 96-Well Reaction Plate für qRT-PCR, Applied Biosystems™) pipettiert wurden.

Mastermixbestandteile	Volumen in µl
Aqua dest., RNase frei	8,6
Forward Primer	0,2
Reverse Primer	0,2
PowerSYBR® Green	10,0
Gesamtvolumen pro Well	19,0

Tab. 4.5.3.1 Mastermix für qRT-PCR

Zu dem Mastermix in den Wells wurde nun je 1µl der zu untersuchenden cDNA pipettiert. Dies geschah als Intraassay-Doppelbestimmung für jedes zu replizierende Gen.

	Versuch 1						Versuch 2				
siRNA	IRAK1	TTK	SGK	siKontrolle	untransfiziert	IRAK1	TTK	SGK	siK	untrans.	
A											
B											
C											
D											
E								--			
F								--			
G								--			
H								--			
	IRAK1	TTK	SGK	siKontrolle	untransfiziert						
	Versuch 3						Wasserprobe				

Tab. 4.5.3.2 Beispiel für ein Pipettierschema für das Expressionsverhältnis von IRAK1, TTK und SGK1 nach siRNA-Knockdown in 3 Versuchen; rosa: Mastermix für RPLP0, grau: Mastermix für IRAK1, türkis: Mastermix für TTK, gelb: Mastermix für SGK. Dazu kam noch je Well 1µl der cDNA aus den jeweiligen Versuchen.

Die 96-Well-Platte wurde mit einer speziellen Klebefolie versiegelt und unter Kühlung kurz zentrifugiert, damit sich die Reagenzien unten in den Wells sammelten. Anschließend wurde die 96-Well-Platte in den PCR-Thermocycler gestellt und unter dem Modus Standard 7500 mit folgendem Temperaturprofil inkubiert:

- 2 Minuten 50°C
- 10 Minuten 95°C: Aktivierung der Taq-Polymerase
- 40x {
 - 15 Sekunden 95°C: Denaturierung
 - 1 Minute 60°C: Annealing und Extension

Zusätzlich wurden Schmelzkurvenanalysen zur Kontrolle der Reinheit der amplifizierten DNA durchgeführt.

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden dann mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Applied Biosystems™) ausgewertet.

4.6 Proteinanalytische Methoden

4.6.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden die Zelllinien 24 Stunden nach Transfektion im Medium mit Zellschabern abgeschabt und für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen.

Jedes Zellpellet wurde in 120 μl PBS-Lösung mit 1% Protease Arrest (Protease Arrest™, GBiosciences) resuspendiert. Die Zellen dieser Suspension wurden nun mittels Ultraschall (Ultraschallhomogenisator Labsonic®U Braun, Göttingen) zertrümmert, sodass die Zellproteine nun frei in der Lösung waren.

4.6.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinlösung kurz herunterzentrifugiert.

In einer 96-Well-Platte wurden in die ersten zwei Reihen als Referenzwertdoppelbestimmung und in die Wells für die Proteinproben je 150 μl Protein Reagent (Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent, Thermo scientific) vorgelegt. Anschließend wurden in diese zwei Reihen in Doppelbestimmung ein Test-Protein (BSA (Bovine Serum Albumin)) in den Mengen 1 μg , 2 μg , 3 μg , 4 μg und 6 μg pipettiert. Die zwei Wells in der oberen linken Ecke enthielten nur das Protein-Reagenz und dienten somit als Null-Wert für das Fotometer.

In die Wells für die Proteinproben wurden nun je 1 μl der zuvor hergestellten Proteinlösungen pipettiert.

Die Konzentration der Proteinproben wurde dann mittels Fotometer (Fotometer Multiskan FC, Thermo scientific®) ermittelt.

4.6.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Durch diese Gelelektrophorese sollten die Proteine der Größe nach durch ein elektrisches Feld in einem polyacrylamidhaltigen Gel aufgetrennt werden. Um die unterschiedliche Ladung der Proteine auszugleichen, wurden sie an das anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) gebunden, wodurch sie alle eine negative Ladung erhielten. Somit konnte sich ihre individuelle Ladung nicht mehr hinderlich im elektrischen Feld auswirken.

Für die SDS-Gelelektrophorese mussten erst die folgenden Puffer angesetzt werden:

Trenngelpuffer:

- 1,5M Tris Base (36,34g/200ml)
- 0,4% SDS (4ml, 20%ig)
- ph 8,8

10x Lauffpuffer:

- 250mM Tris Base (30,3g/1l)
- 1,92M Glycin (144g/1l)
- 1% SDS (10g/1l)

Sammelgelpuffer:

- 0,5M Tris Base (12,11g/200ml)
- 0,4% SDS (4ml, 20%ig)
- ph 6,8

4x SDS Probenpuffer:

- 2g Tris HCL (253mM)
 - 25g Bromphenolblau
 - 25ml A-dest
- mit Glycerol auf 45ml auffüllen, pH 6,8
einstellen, dann + 5ml 20%ige SDS-Lösung(2%)

Anschließend wurde das Gel zwischen zwei Glasplatten des Gelelektrophoreseaufbaus gegossen (Die folgenden Ansätze sind für zwei Gele). Hierfür wurde die Sammelgel-Lösung und eine 10%ige Trenngel-Lösung angesetzt:

Sammelgel-Lösung:

25ml Sammelgelpuffer
+ 59ml A-dest
+ 16ml Acrylamid (30%/0,8%)
(bei 4°C lagern)

10%ige Trenngel-Lösung:

4,4ml A-dest
+ 3,0ml Trenngelpuffer
+ 4,0ml Acrylamidlösung
+ 0,6ml Glycerol

Als erstes wurden pro Gel 255µl „Stop-Gel“, bestehend aus 250µl Trenngel-Lösung und je 2,5µl APS(10%) und TEMED, zwischen die Glasplatten pipettiert. Wenn dieses Gel getrocknet war, wurde die Trenngellösung, der jeweils 20µl 10%iges APS und TEMED hinzugefügt wurde, über die beiden „Stop-Gele“ bis ca. 5mm unterhalb der Probenaschen gegossen. Darüber wurden je Gel 2ml Sammelgel-Lösung, mit 5µl APS(10%) und 5µl TEMED versetzt, pipettiert. Der Kamm wurde luftblasenfrei eingesetzt und die Gele für ca. 45 Minuten zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Währenddessen wurden je 100µl der Proteinproben mit 11µl DTT und 6µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Diese Proteinproben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gelagert.

Das ausgehärtete Gel wurde in den Elektrophoreseaufbau gehängt und mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Dabei wurde dann der Kamm möglichst luftblasenfrei entnommen. Die Proteinproben wurden entsprechend dem Standard (5µl Protein Kaleidoscope, BioRad) geladen. Dies entsprach 10µg des entsprechenden Proteins aus den Proteinproben.

Der Gelelektrophorese-Aufbau wurde an eine Stromstärke von 120 Volt angeschlossen bis die Proben die Sammelgel/Trenngelgrenze erreicht hatten. Dann wurde die Stromstärke auf konstant 200 Volt erhöht, bis die Proben am unteren Ende des Gels herausgelaufen waren. Anschließend wurde der Strom abgestellt und die Gelelektrophorese abgebaut. Das Gel konnte nun für den Westernblot benutzt werden.

4.6.4 Western-Blot

Beim Blotten wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt, sodass die Proteine von dem Gel auf eine dahinter gelagerte Nitrocellulosemembran wandern. Dort werden die Proteine aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen an der Membranoberfläche gebunden und sind für zum Beispiel Antikörperreaktionen zugänglich.

Für den Westernblot mussten zunächst folgende Puffer angesetzt werden:

Blotting-Puffer:	TBS (10x):	TBST (1x):
<ul style="list-style-type: none"> • 100ml Laufpuffer ohne SDS • 200ml Methanol • 700ml A-dest = 1Liter 	<ul style="list-style-type: none"> • 24,2g Tris Base • 80g NaCl • 15ml HCL (37%ig) pH 7,6 einstellen = 1Liter 	<ul style="list-style-type: none"> • 100ml TBS (10x) • 900ml A-dest • 1ml Tween 20 = 1Liter

Tab. 4.6.4 Western-Blot Puffer

Der Aufbau des Blots erfolgte in einer mit Blotting-Puffer gefüllten Schale im Blotting-Rahmen vom Minus-Pol zum Plus-Pol wie folgt: Schwamm, Filterpapier, Gel, markierte Nitrocellulosemembran (NC-Membran Optitran BA-S83 Reinforced, Whatman GmbH, Dassel), Filterpapier, Schwamm. Der Blotting-Rahmen wurde zusammen geklemmt und in einen Behälter (Mini Trans-Blot® Cell, Bio Rad, Hercules) gestellt, der mit Plotting-Puffer aufgefüllt wurde. Nun wurde für 1 Stunde eine Stromstärke von 300mA angelegt.

4.6.5 Ponceau-S-Färbung der Membran

Um einen erfolgreichen Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran nachzuweisen, wurde die Membran nach vollendetem Blot mit dem roten Farbstoff Ponceau S für 5 Minuten angefärbt und bis die Banden sichtbar wurden mit Aqua dest. wieder entfärbt. Die Membran wurde eingescannt und danach wieder mit TBST vollständig entfärbt.

4.6.6 Immundetektion und Chemolumineszenz

Bei der Immundetektion werden Antikörper genutzt, die spezifisch an das gesuchte Protein binden. Ein Zweitantikörper, der zusätzlich an den ersten Antikörper bindet, ist an HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt, eine Peroxidase, die das in ECL (ECL Plus Lumigen™ PS-3 detection reagent Solution A & B, GE Healthcare) enthaltene Lumino unter Freisetzung von Chemolumineszenz oxidiert. Somit können die markierten Proteine per Röntgenfilm detektiert und sichtbar gemacht werden.

Zuerst wurde die Nitrocellulosemembran in 10ml 5%iger Magermilch, in TBST gelöst, auf einem Kippschüttler für 4 Stunden geblockt. Dies sollte unspezifische Antikörperbindungen an der Membran verhindern. Anschließend wurde die Magermilchlösung verworfen und die Membran wurde mit dem ersten Antikörper in 10ml 5%iger Magermilch-TBST-Lösung über Nacht auf einem Kippschüttler bei 4°C inkubiert. Dieser erste Antikörper war ein Antikörper, der spezifisch an den Apoptosemarker PARP-1 bindet.

Am nächsten Tag wurde die Membran vier Mal für 10 Minuten mit TBST gewaschen, bevor 1µl des zweiten HRP-gekoppelten Antikörpers in 10ml 5%iger Magermilch-TBST-Lösung auf die Membran gegeben wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler.

Anschließend wurde die Membran erneut vier Mal für 10 Minuten in TBST gewaschen und daraufhin auf eine Folie mit Proteinseite nach oben gelegt. Über die Membran wurde nun 1ml Solution A + 25µl Solution B der ECL-Lösung gegeben und für 1 Minute inkubiert. Nachdem die ECL-Lösung von der Membran abgetropft war, wurde die Membran in eine neue Folie eingeschlagen und entweder per Film oder digital entwickelt (Digitalentwickler HR16-3200 Imager und Intas ChemoCam, INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Florenz).

Um zu zeigen, dass bei jeder Probe eine äquivalente Menge an Protein aufgetragen wurde, wurde die Membran erneut in TBST gewaschen und mit einem HRP-gekoppelten β -Actin-Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Auch dieser Antikörper wurde mittels ECL und Digitalentwickler sichtbar gemacht.

4.7 Statistische Methoden

Jeder Versuch wurde mindestens dreimal durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit zu zeigen. Weiterhin wurde zu jedem Versuch eine Kontroll-siRNA und eine untransfizierte Zelllinie als Vergleich mituntersucht.

Alle Berechnungen und Tabellen wurden mit dem Programm Microsoft Excel erstellt. Die Ergebnisse wurden auf das Ergebnis der Kontroll-siRNA normalisiert und daraus wurden die Diagramme erstellt. Als Fehlerindikator wurde die einfache Standardabweichung in die Diagramme eingebaut.

Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger students T-Test durchgeführt, wobei ein P-Wert $\leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Expressionsanalyse von IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC in verschiedenen Zelllinien

Um die Ergebnisse des Screenings des NMI Reutlingen genauer zu beleuchten, musste zuerst eine tatsächliche Expression der Kinasen in der Hek293- und Panc1-Zelllinie nachgewiesen werden. Zusätzlich sollten auch geeignete zusätzliche Pankreaskarzinomzelllinien für die Folgeversuche gefunden werden.

Daher wurde eine qRT-PCR mit der cDNA von sieben etablierten Pankreaskarzinomzelllinien (8988s, 8988t, IMIMPC1, IMIMPC2, Panc1, Suit007, Suit028) und der Hek293-Zelllinie durchgeführt, in der die Expression der verschiedenen Kinasen untersucht werden sollte.

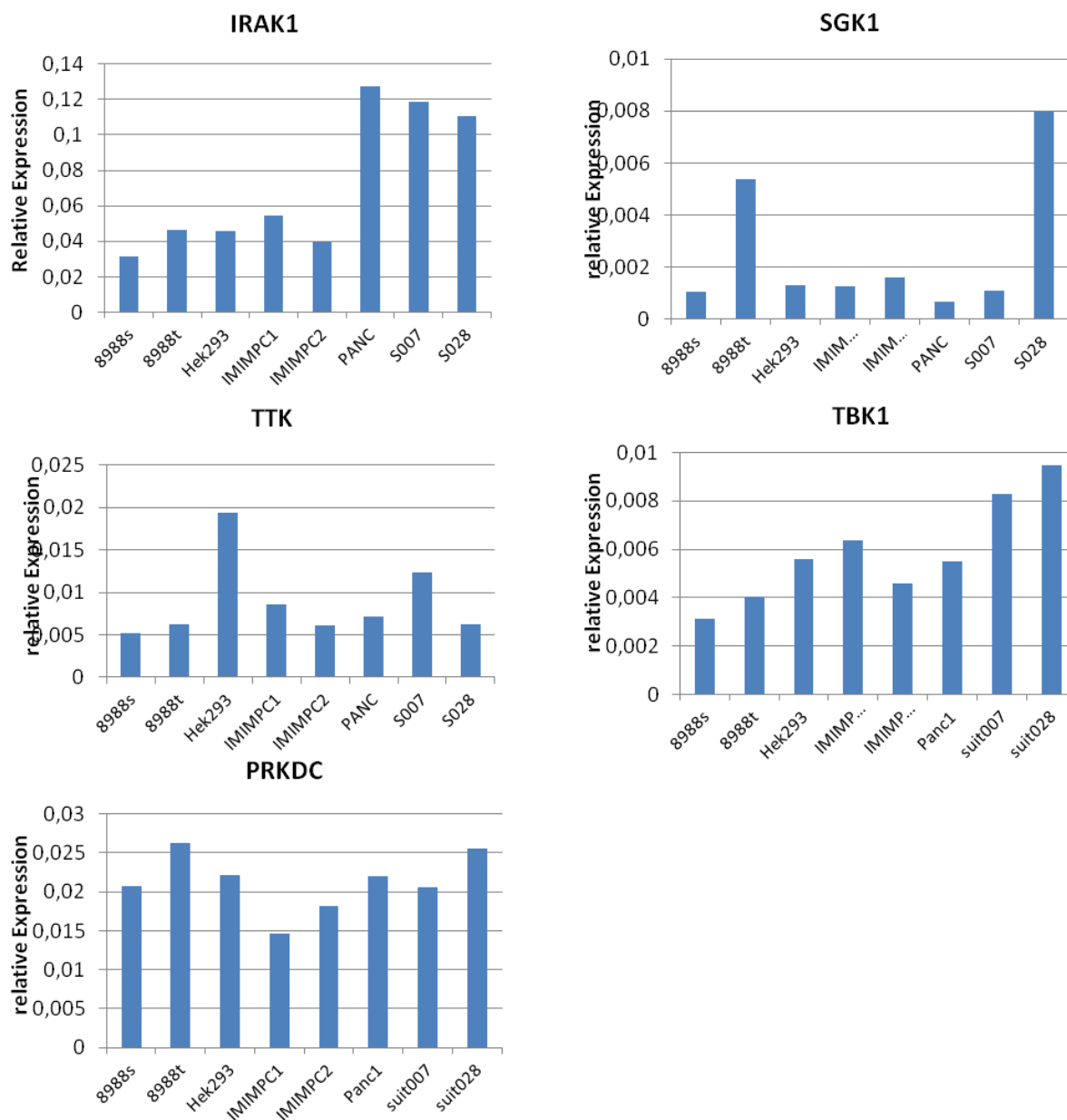


Abbildung 5.1.1 Relative Expression der Kinasen IRAK1, SGK1, TTK, TBK1 und PRKDC in verschiedenen Panreaskrzinomzelllinien und Hek293. Die Daten sind Mittelwerte und resultieren aus einer Intraassay-Doppelbestimmung der relativen Expression der einzelnen Kinasen. Die dargestellten Werte wurden mittels der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Applied Biosystems™) ermittelt.

Eine Expression der verschiedenen Kinasen in allen untersuchten Zelllinien konnte nachgewiesen werden.

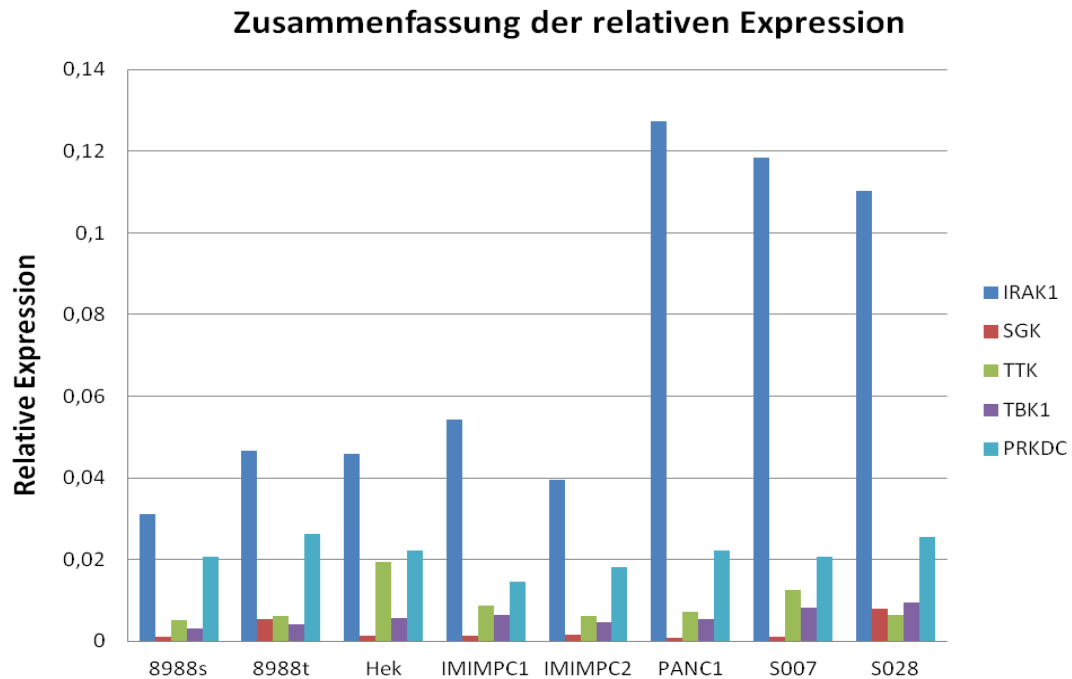


Abbildung 5.1.2: Vergleich der relativen Expression der verschiedenen Kinasen in den genannten Tumorzelllinien und Hek293.

Eine Überexpression der Kinasen in den Karzinomzelllinien im Vergleich zu der Hek293-Zelllinie konnte nicht gezeigt werden. Im Gegenteil, TTK zeigte eine Überexpression in Hek293-Zellen im Vergleich zu den Tumorzellen.

Zusätzlich zu den Zelllinien Hek293 und Panc1 wurden die Zelllinien 8988t und suit028 für weitere Versuche ausgewählt, da in diesen beiden Zelllinien alle Kinasen möglichst hoch exprimiert waren.

5.2 Knockdown-Effizienz der siRNAs

Die Knockdown-Effizienz der siRNA auf die mRNA der zugehörigen Kinasen wurde mittels qRT-PCR gemessen. Dazu wurde 48-72 Stunden nach Transfektion eine RNA-Isolation mit anschließender reverser Transkription in cDNA vorgenommen. Mit dieser cDNA wurde dann eine qRT-PCR durchgeführt, wobei nach vorhandener Expression der herunterregulierten Kinasen gesucht wurde.

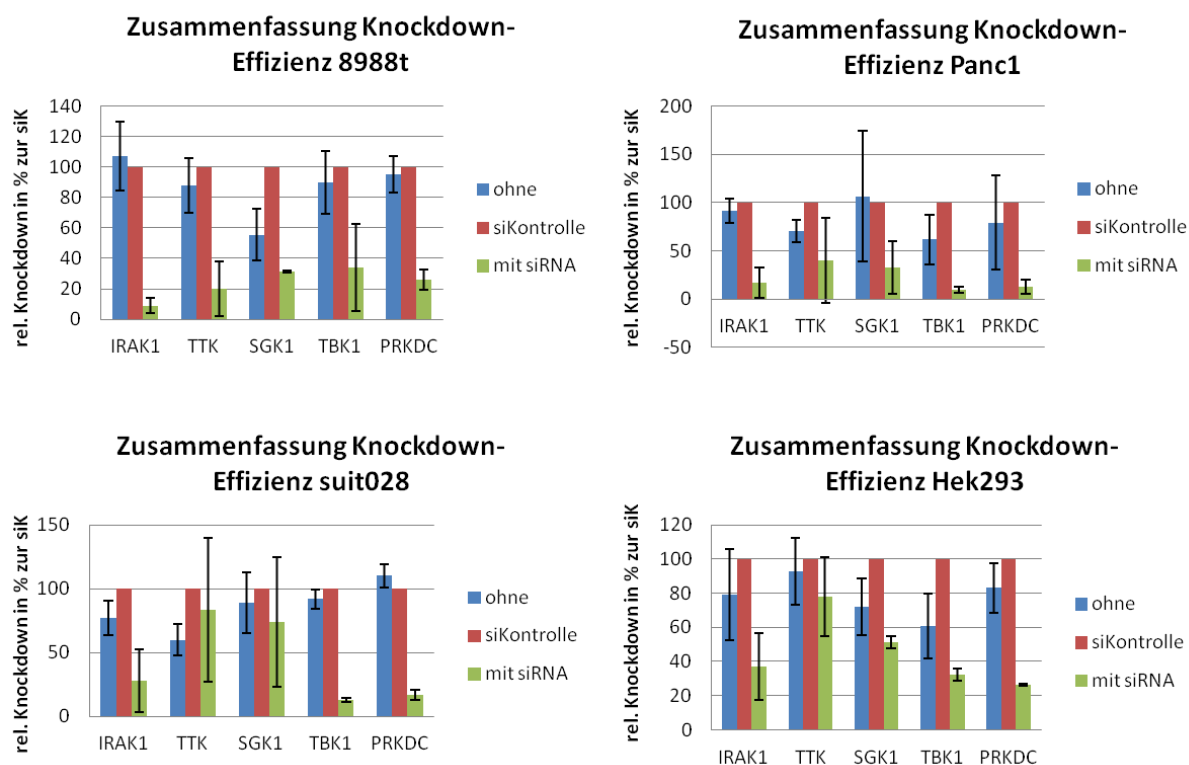


Abbildung 5.2 Knockdown-Effizienz der siRNAs. Die Abbildungen entstanden aus den Mittelwerten von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen und die Werte sind auf die siKontrolle normalisiert. Es ist zu beachten, dass es sich bei den jeweiligen siRNAs um einen siRNA-Pool handelt (Tab. 2.1.11 siRNA). Die Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung der drei Versuche.

Wie aus den Diagrammen zu entnehmen ist, konnte ein effizienter Knockdown der verschiedenen Kinasen in den jeweils untersuchten Zelllinien herbeigeführt werden.

5.3 Einfluss der Herunterregulation der Kinasen auf die Vitalität der Pankreaskarzinomzellen

Der Knockdown-Effekt auf die Zellvitalität wurde mittels MTT-Assay untersucht. Hierzu wurde bei jeder der vier ausgewählten Zelllinien ein Knockdown der fünf Kinasen mittels siRNA durchgeführt. Zusätzlich diente eine Kontroll-siRNA und eine Probe der untransfizierten Zelllinie als Vergleich.

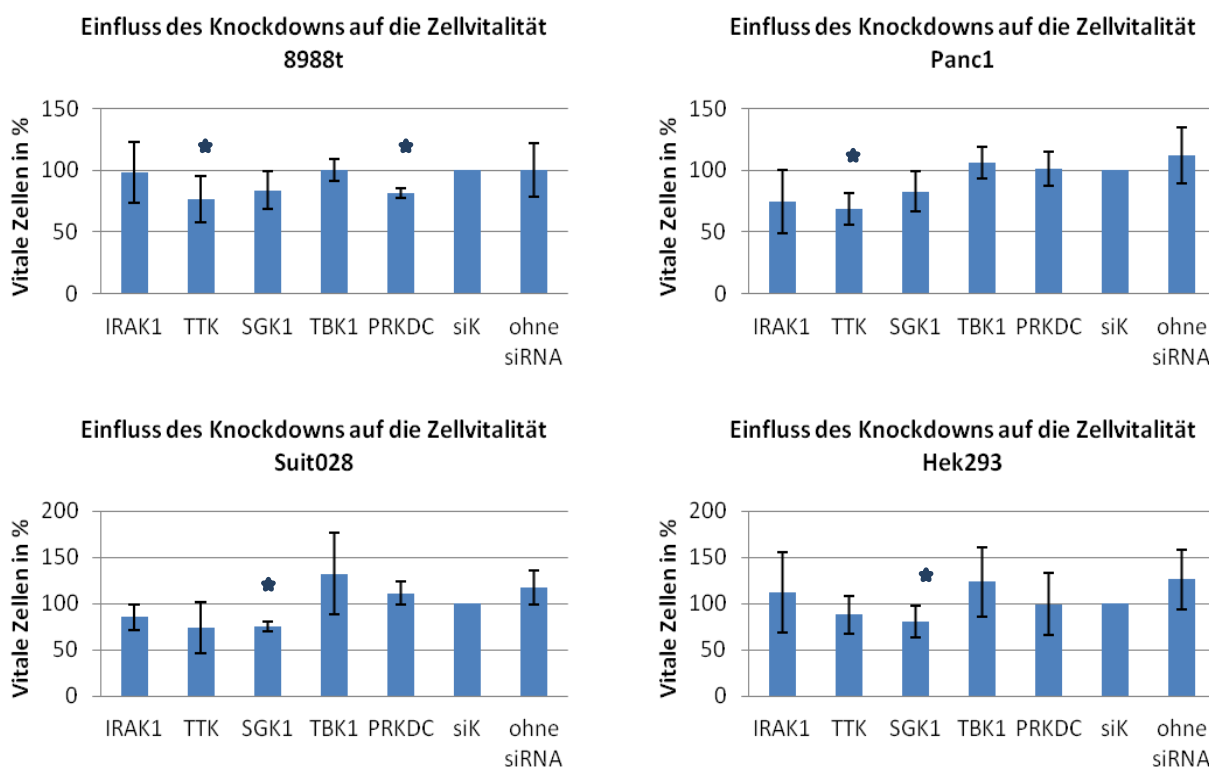


Abbildung 5.3: Einfluss des Knockdowns auf die Zellvitalität der einzelnen Zelllinien. Die Balken zeigen die einfachen Standardabweichungen der jeweiligen drei Versuche, die hier zusammengefasst und auf die siKontrolle normalisiert worden sind. Die durch den students TTest ermittelten signifikanten ($p \leq 0,05$) Minderungen der Zellvitalität sind mit * markiert.

Wie der Abbildung 5.3 zu entnehmen ist, wurde bei einigen Zelllinien durch den Knockdown der einzelnen Kinasen eine signifikante Verminderung vitaler Zellen erreicht. Erwünscht war jedoch eine Verminderung vitaler Zellen bei den Tumorzelllinien, während die Hek293-Zelllinie unbeschadet bleiben sollte.

Die Herunterregulation der Kinasen TBK1 und PRKDC hatte bis auf eine Ausnahme (PRKDC in 8988t) keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität. Daher wurden diese beiden Kinasen verworfen und nicht weiter untersucht.

Die Herunterregulation der Kinase SGK1 führte zu einem signifikanten Verlust vitaler Zellen der Zelllinien suit028 und Hek293. Weiterhin zeigte sich ein ebenfalls negativer Einfluss auf die Zellvitalität der beiden anderen Zelllinien 8988t und Panc1. Folglich erfüllte auch dieser Knockdown-Effekt nicht die gewünschten Kriterien, da nicht nur die Tumorzelllinien, sondern auch die Hek293-Zelllinie an vitalen Zellen verloren. Somit wurde auch diese Kinase nicht mehr weiter untersucht.

Unter der Herunterregulation von TTK zeigten die Zelllinien 8988t und Panc1 eine signifikante Abnahme vitaler Zellen. Auch hatte TTK einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität der suit028-Zelllinie, der jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Die Hek293-Zelllinie wurde weniger beeinträchtigt von der Herunterregulation von TTK und daher wurde TTK als Kandidat ausgewählt und stand für weitere Versuche zur Verfügung.

Weiterhin zeigte die Herunterregulation von IRAK1 einen stärker ausgeprägten hemmenden Einfluss auf die Zellvitalität der Tumorzelllinien, als auf die Hek293-Zelllinie. Auch wenn diese Werte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht als signifikant galten, wurde auch diese Kinase für weitere Versuche ausgewählt.

Nach der Untersuchung des Knockdown-Effekts der fünf Kinasen auf die Zellvitalität der Tumor- und Kontrollzelllinien, zeigten nur zwei der fünf Kinasen einen gewünschten Effekt. Mit diesen zwei Kinasen, IRAK1 und TTK, wurden noch weiter funktionelle und proteinanalytische Experimente durchgeführt.

5.4 Migrationsverhalten nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK

Das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinien nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK wurde mittels Boyden Chamber Migration Assay untersucht. Die Hek293- Zelllinie wurde hierbei nicht untersucht, da diese als nicht-maligne Zelllinie nicht migriert.

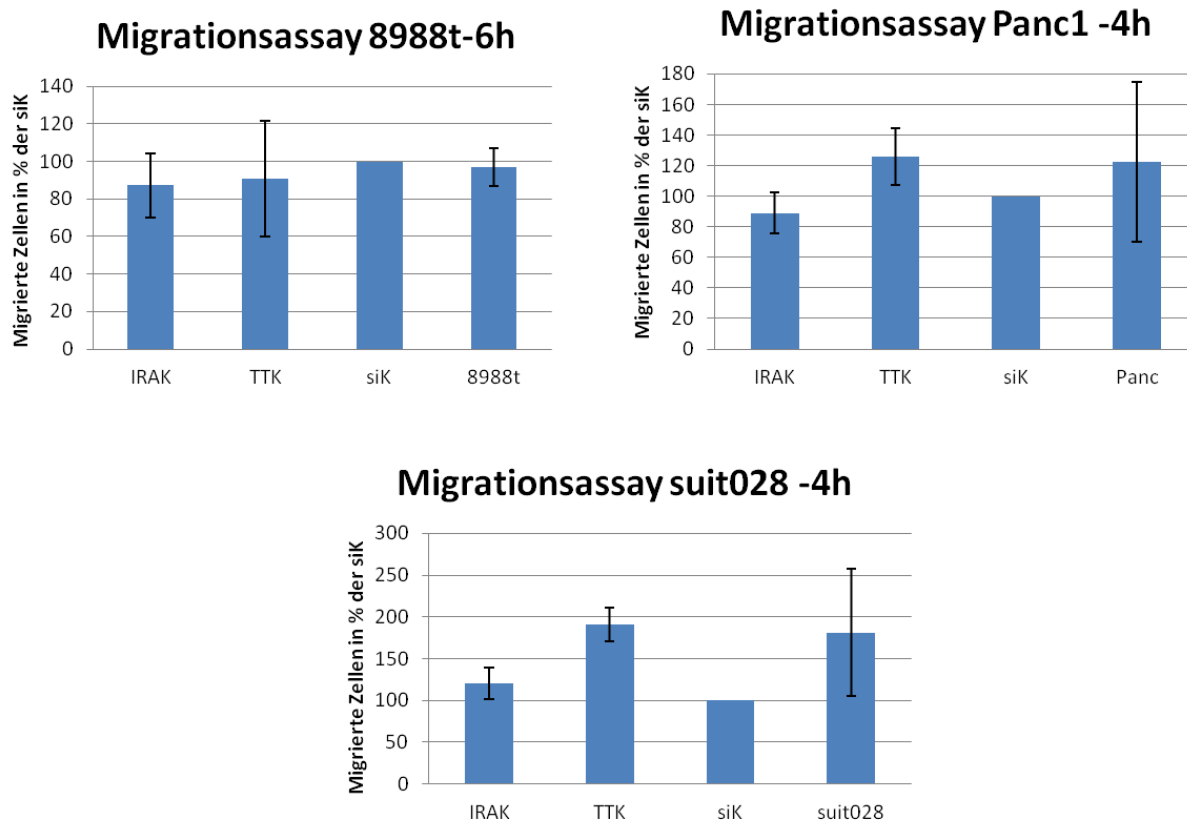


Abbildung 5.4: Ergebnisse des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzelllinien nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK mittels siRNA. Die Diagramme enthalten jeweils alle drei Versuche sowie die Fehlerbalken der einfachen Standardabweichung. Alle Werte sind auf die siKontrolle normalisiert. Eine signifikante Minderung des Migrationsverhaltens ist hier nicht festgestellt worden.

Wie aus Abbildung 5.4 zu entnehmen ist, ergab die Herunterregulation der Kinasen keine signifikante Minderung des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzelllinien.

Die Herunterregulation von IRAK1 führte bei den Zelllinien 8988t und Panc1 zu einer Minderung des Migrationsverhaltens, welches jedoch aufgrund der hohen

Standardabweichung nicht signifikant war. Die Zelllinie suit028 ließ sich im Gegensatz hierzu nicht in ihrem Migrationsverhalten hemmen. Wie zuvor im Kapitel Material und Methoden beschrieben, ist die Zelllinie Suit028 für diesen Versuch nicht geeignet.

Nach Herunterregulation von TTK konnte kein Nachweis eines verminderten Migrationsverhaltens erbracht werden.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die Herunterregulation der zwei Kinasen keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinien hat. Eine leichte Minderung der Migration konnte lediglich bei 8988t und Panc1 unter dem Knockdown von IRAK1 festgestellt werden.

5.5 Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit von Tumorzellen nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK

Der Einfluss auf die Koloniebildungsfähigkeit der Pankreaskarzinomzelllinien nach IRAK1- und TTK-Knockdown wurde mittels Soft-Agar Assay bestimmt. Auch hier wurde die Hek293-Zelllinie aufgrund von fehlender Koloniebildungsfähigkeit nicht mituntersucht.

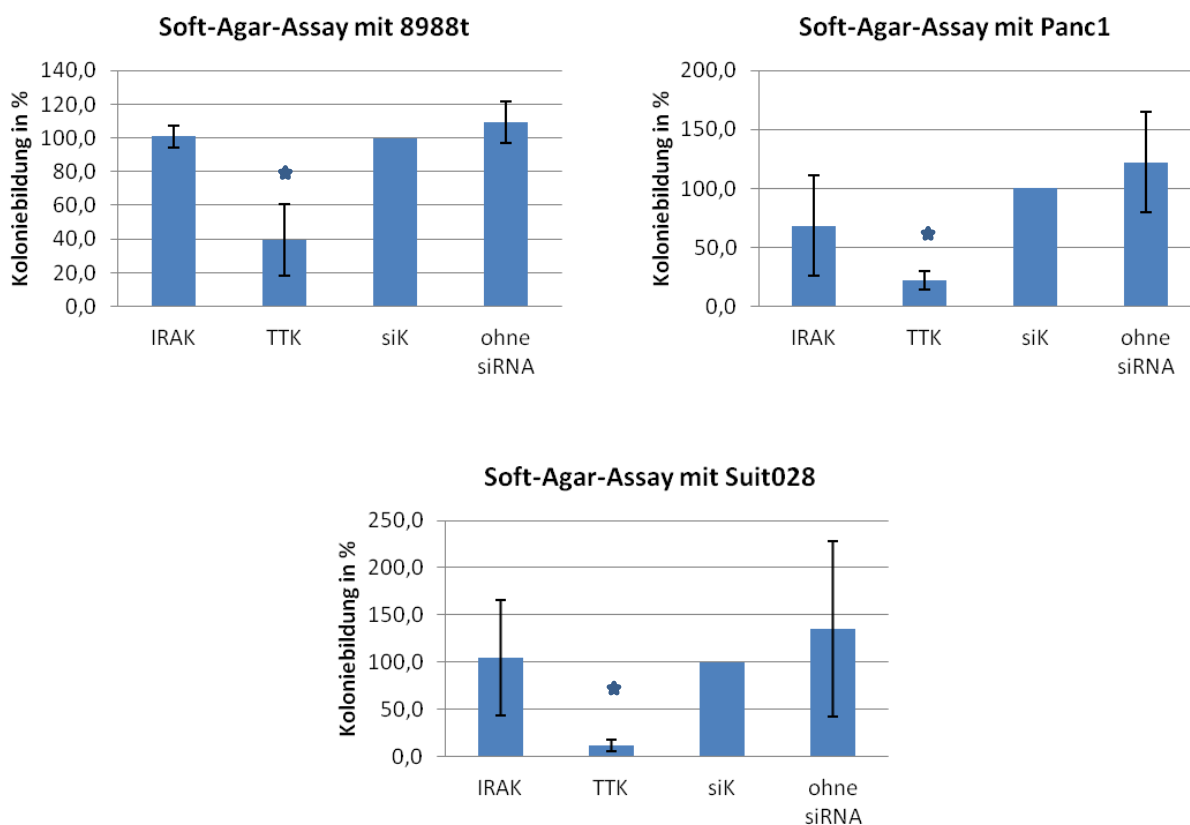


Abbildung 5.5: Einfluss der Herunterregulation der Kinasen IRAK1 und TTK auf die Koloniebildungsfähigkeit der Pankreaskarzinomzellen. Die Diagramme enthalten jeweils die auf die siKontrolle normalisierten Mittelwerte aller drei Versuche einschließlich der einfachen Standardabweichung als Fehlerbalken. * : signifikante ($p \leq 0,05$) Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit.

Wie die Abbildung 5.5 zeigt, konnte unter TTK-Knockdown eine signifikante Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit in allen drei Pankreaskarzinomzelllinien erreicht werden. Somit

scheint die Expression der Kinase TTK essentiell für die Koloniebildungsfähigkeit von Pankreaskarzinomzellen zu sein.

Die Herunterregulation von IRAK1 hingegen führte zu keiner signifikanten Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit in allen drei Zelllinien. Lediglich die Panc1-Zelllinie zeigte eine leichte Verminderung der gebildeten Kolonien. Jedoch ist auch hier die Standardabweichung der verschiedenen Experimente sehr groß, sodass dieses Ergebnis nicht signifikant ist.

5.6 Einfluss des Knockdowns von IRAK1 und TTK auf die Apoptoserate / Expression apoptotischer Marker

Zuletzt wurde der Einfluss der Herunterregulation der Kinasen IRAK1 und TTK auf die Expression apoptotischer Marker mittels Westernblot untersucht. Als Marker der Apoptose dienten die Spaltprodukte des Enzyms PARP1, welche bei dem Vorgang der Apoptose freigesetzt werden (Lazebnik et al. 1994; Oliver et al. 1998). Zusätzlich wurde β -Actin bestimmt, um nachzuweisen, dass in jeder Bande eine äquivalente Menge an Protein aufgetragen wurde.

Es wurden für jede der vier Zelllinien zwei Versuche durchgeführt bei denen jeweils nach PARP1 und β -Actin gesucht wurde.

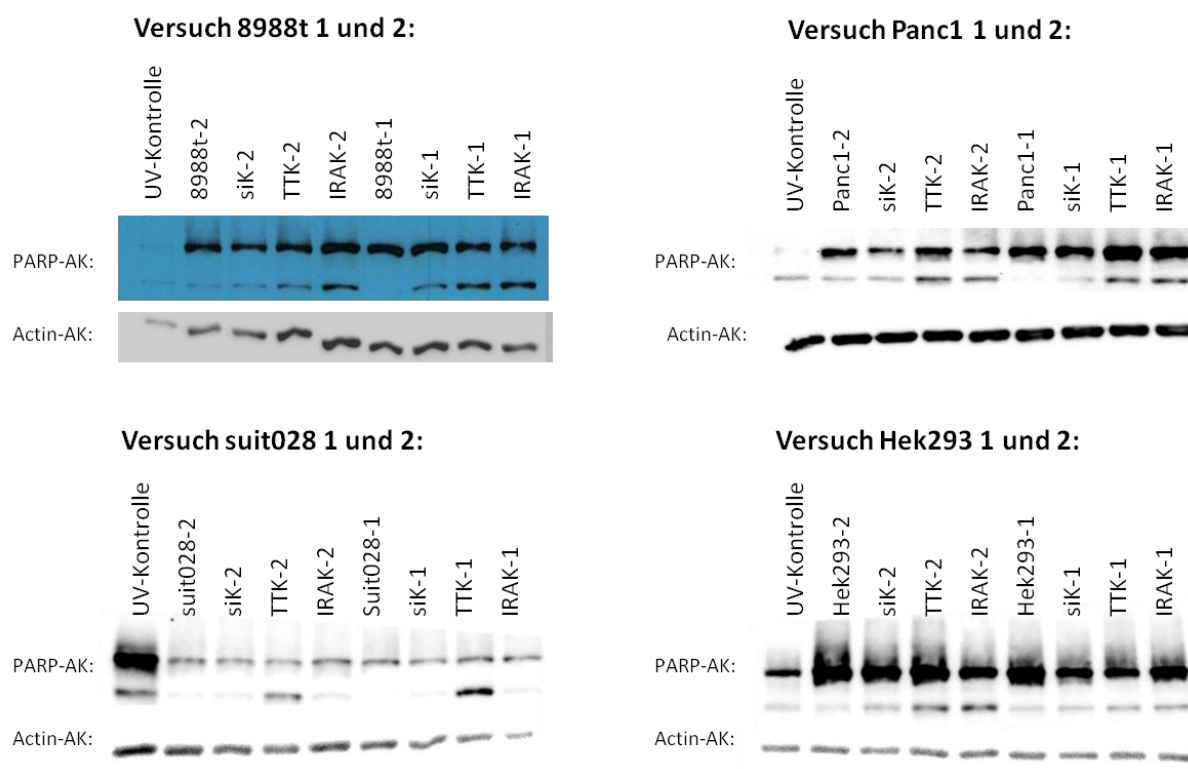


Abbildung 5.6 Einfluss des Knockdowns der Kinasen IRAK1 und TTK auf die Expression apoptotischer Marker. Westernblotanalyse der Proteine PARP1 und β -Actin. Je Zelllinie wurden zwei Versuche durchgeführt. Die Stärke der Bandenfärbung wurde immer im Vergleich zur siKontroll-Bande beurteilt. Zusätzlich lief eine UV-Kontrolle mit. Versuch 8988t

1 und 2 wurden noch mittels Röntgenfilm ausgewertet (Entwicklermaschine Curix 60, AGFA Healthcare NV), während alle anderen Versuche digital entwickelt werden konnten.

Eine PARP1-Spaltung konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Gewünscht war eine PARP1-Spaltung nach der Herunterregulation von IRAK1 und TTK in den Pankreaskarzinomzelllinien, nicht jedoch in der Kontrollzelllinie Hek293.

In beiden Versuchen mit der Zelllinie 8988t konnte eine PARP1-Spaltung unter IRAK1- und unter TTK-Knockdown im Vergleich zu der siKontrolle und der untransfizierten Zelllinie nachgewiesen werden. Die PARP1-Spaltung unter IRAK1-Knockdown war jedoch leicht stärker ausgeprägt als unter TTK-Knockdown. Verglichen mit der Bandenfärbung von β -Actin fällt auf, dass bei Versuch 1 die aufgetragene Proteinmenge sich eher gleicht als in Versuch 2. Daher ist Versuch 1 aussagekräftiger.

Die Herunterregulation von IRAK1 und TTK in der Panc1-Zelllinie zeigte eine deutliche PARP1-Spaltung im Vergleich zu der siKontrolle und der untransfizierten Zelllinie. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses wird durch eine durchgehend äquivalente Menge an Protein in der β -Actin-Darstellung bekräftigt.

Die Zelllinie suit028 zeigt in beiden Versuchen eine PARP1-Spaltung unter TTK-Knockdown, jedoch nicht nach Herunterregulation von IRAK1. Der β -Actin-Darstellung nach schwankt die Proteinmenge zwar in Versuch 1 leicht, in Versuch 2 ist sie aber wieder gleich.

In Versuch 1 der Zelllinie Hek293 konnte unter Herunterregulation von IRAK1 und TTK keine PARP1-Spaltung nachgewiesen werden, während in Versuch 2 eine leichte PARP1-Spaltung gezeigt werden konnte. Dies geschah bei einer gleichmäßigen β -Actin-Färbung und somit gleicher Proteinmenge.

Abschließend kann konstatiert werden, dass in den Pankreaskarzinomzelllinien 8988t und Panc1 die Herunterregulation von IRAK1 und TTK in beiden Fällen zu einer PARP1-Spaltung, also Apoptose, führt. In der Pankreaskarzinomzelllinie suit028 führt nur die Herunterregulation von TTK zur Apoptose, während das Zellsterben von der IRAK1-Herunterregulation nicht beeinflusst wird.

6. Diskussion

Die Diagnose eines Pankreaskarzinoms ist auch heutzutage noch aufgrund mangelnder kurativer Therapieoptionen mit einer infausten Prognose assoziiert (Mihaljevic et al. 2010). Daher ist der Erforschung neuer Therapieansätze wie zum Beispiel der „targeted-therapy“ höchste Priorität entgegenzubringen (Krell et al. 2012; Oberstein und Saif 2011). Zu diesen Ansätzen gehört unter anderem die Erforschung der Funktion von Kinasen in Karzinomen, dessen Aufgabe sich schon bezüglich verschiedener Karzinomentitäten viele Arbeitsgruppen gewidmet haben. Im Bezug auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas wurden auch schon einige Ansätze einer „targeted-therapy“ untersucht (Awasthi et al. 2011; Martin et al. 2012), jedoch mit nur geringem Erfolg.

In dieser Arbeit wurden fünf, bisher bezüglich des Pankreaskarzinoms wenig erforschte, humane Kinasen auf ihre Funktion im PDAC hin untersucht, mit dem Ziel, einen neuen und effektiveren Angriffspunkt einer möglichen „targeted-therapy“ zu finden. Dabei wurde besonders auf karzinomspezifische Eigenschaften, wie die Proliferation, die Migration, die Metastasierung und die Hemmung der Apoptose eingegangen.

6.1 Einfluss der fünf Kinasen auf das Verhalten von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro*

6.1.1 Die fünf Kinasen sind sowohl in allen Pankreaskarzinomzelllinien als auch in der Hek293-Zelllinie exprimiert

Wie schon bei Ammerpohl et al. 2007 gezeigt und durch die Screening-Ergebnisse des NMI Reutlingen nahegelegt wurde, konnte auch in dieser Arbeit eine Expression der Kinasen IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC in allen getesteten Pankreaskarzinomzelllinien sowie in der Hek293-Zelllinie nachgewiesen werden. Eine Überexpression der genannten Kinasen in den Tumorzelllinien im Vergleich zu der Hek293-Zelllinie konnte jedoch nicht festgestellt werden.

6.1.2 IRAK1- sowie TTK-Hemmung führen zur Minderung der Zellvitalität

Wie in Abbildung 5.2 gezeigt, konnte mithilfe des jeweiligen siRNA-Pools eine effektive Herunterregulation der zugehörigen Kinase erzielt werden, was die Grundvoraussetzung für die folgenden Versuche war.

Mithilfe des Zellüberlebensassays sollten sich die Kinasen herauskristallisieren, die einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität maligner Zellen haben, aber benigne Zellen möglichst unbeschadet lassen.

Dieser Effekt konnte am besten nach Herunterregulation der Kinase TTK gezeigt werden. Der Prozentsatz an vitalen Tumorzellen sank um mehr als 25%, während der Einfluss auf die Hek293-Zelllinie weitaus geringer ausfiel.

Dieses Ergebnis korreliert gut mit der Annahme, dass die Kinase TTK eine essentielle Rolle in der Zellproliferation, im Zellzyklus und besonders in der Mitose spielt (Dou et al. 2004; Dou et al. 2003; Schmandt et al. 1994; Niittymaki et al. 2011). Demnach scheint TTK eine übergeordnete Rolle beim Überleben von Pankreaskarzinomzellen verglichen mit Hek293-Zellen zu spielen (wo es verstärkt exprimiert ist (siehe Abb.5.1)) was zu der Vermutung führt, dass TTK in Karzinomzellen mutiert ist und somit zu einer verstärkten Proliferation führt. Solche TTK-Mutationen konnten schon in kolorektalen- und gastralen Karzinomen gezeigt werden (Ahn et al. 2009).

Ähnlich erging es den untersuchten Zelllinien nach Herunterregulation von IRAK1, jedoch erreichten diese Ergebnisse aufgrund ihrer hohen Standardabweichung keine statistische Signifikanz.

Die drei anderen Kinasen SGK1, TBK1 und PRKDC zeigten eher unerwünschte Effekte: Ihre Herunterregulation hemmte entweder, wie im Fall der SGK1-Repression gleichermaßen alle Zelllinien oder führte, wie im Fall von TBK1- oder PRKDC-Herunterregulation, zur Zunahme der Zellvitalität. Daher wurden diese Kinasen nicht weiter untersucht.

Die Tatsache, dass eine SGK1-Herunterregulation eine Minderung der Zellvitalität aller untersuchten Zelllinien gleichermaßen herbeiführt, lässt vermuten, dass SGK1 sowohl für HEK293-Zellen als auch für Pankreaskarzinomzellen eine wichtige Kinase darstellt. Dass der Effekt nur so gering ausgefallen ist, könnte an der funktionellen Ergänzung zwischen Akt und

SGK1 liegen (Sahoo et al. 2005). Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung von Lang et al. 2010, dass sich SGK1-knockout-Mäuse größtenteils normal entwickelten.

Dass unter TBK1-Herunterregulation eine eher gesteigerte Zellvitalität in allen Zelllinien zu beobachten war, korreliert nicht mit der aktuellen Literatur, in der TBK1 als „Trigger“ (Korherr et al. 2006) für Tumorwachstum sowie als Inhibitor einer Apoptose bekannt ist. Da die bisherigen Forschungsergebnisse nicht im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom untersucht wurden, liegt die Annahme nahe, dass TBK1 für das Überleben des Pankreaskarzinoms keine besondere Rolle zu spielen scheint.

PRKDC ist im Gegensatz zu den anderen untersuchten Kinasen eine Kinase, deren Funktion vorrangig in der DNA-Reparatur besteht und bei Fehlern der DNA einen Zellzyklusarrest oder Apoptose induziert (Rassow 2008). Yu et al. 2001 fanden heraus, dass Polymorphismen im PRKDC-Gen mitverantwortlich für die Entstehung eines Mammakarzinoms seien. In der vorliegenden Arbeit konnte ein relevanter Einfluss auf das Überleben, die Koloniebildungsfähigkeit oder die Migration von Pankreaskarzinomzellen ausgeschlossen werden. Denkbar ist, dass PRKDC nur in der Initiation der Tumorentstehung, nicht aber in fortgeschrittenen Karzinomstadien eine funktionelle Rolle innehat, oder aber dass im Gegensatz zum Mammakarzinom in Pankreaskarzinomzellen keine zentrale Rolle für PRKDC existiert.

6.1.3 IRAK1 und TTK haben keinen signifikanten Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der untersuchten Zelllinien

Die Fähigkeit aktiv zu migrieren ist eine weitere wichtige Eigenschaft von malignen Zellen, die eng mit der Fähigkeit der Metastasierung verknüpft zu sein scheint (Keleg et al. 2003), welche aber nicht alle malignen Zellen zwingend aufweisen müssen.

Für Panc1-Zellen ist eine gute Migrationsfähigkeit bekannt (Giehl et al. 2000) und auch die 8988t-Zelllinie soll eine leicht ausgeprägte Migrationsfähigkeit besitzen (Elsasser et al. 1992), wohingegen die Suit028-Zelllinie dafür bekannt ist, eine eher schlechte Migrationsfähigkeit zu besitzen (Buchholz et al. 2003). Daher sind die Ergebnisse, dass eine Herunterregulation von IRAK1 oder TTK in Suit028-Zellen eher zu einer verstärkten Migration als zu einer Hemmung führen würde, nicht zu verwerten, da dieses Experiment nicht für Suit028-Zellen geeignet ist. Nach IRAK1-Knockdown konnte sowohl in der 8988t- als auch in

der Panc1-Zelllinie eine bis zu 13%ige Verminderung der Migrationsfähigkeit gezeigt werden, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Dies passt zu der Annahme, dass IRAK1 über die Aktivierung von NF- κ B unter anderem auch zur Zellinvasion beiträgt (Fujioka et al. 2003; Sclabas et al. 2003; Luftig et al. 2003). Dass IRAK1 aber nicht der einzige Aktivator von NF- κ B ist, erklärt den geringen Effekt der IRAK1-Hemmung auf die Migrationsfähigkeit. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Li et al. 2010, die über eine verstärkte Expression von miRNA-146a eine Herunterregulation von IRAK1, EGFR und NF- κ B erreichten und somit eine Hemmung der Zellinvasion verzeichneten. Auch hier scheint IRAK1 nicht alleine für die NF- κ B-Aktivität verantwortlich zu sein. Zusätzlich beschreibt die aktuelle Literatur noch viele weitere Signalwege ohne NF- κ B, die zur Zellinvasion und Metastasierung führen können.

Interessant ist, dass eine Herunterregulation von TTK eher zur Zunahme der Migrationsfähigkeit zu führen scheint, wie die Ergebnisse aus den drei Versuchen mit der Zelllinie Panc1 zeigen. Hierauf müsste in weiteren Experimenten genauer eingegangen werden, um die Funktion von TTK bezüglich der Migrationseigenschaften von Tumorzellen genauer zu beleuchten.

6.1.4 TTK ist essentiell für die Metastasierung des PDAC

Die Bildung von Metastasen ist ein großes Problem in der Onkologie, da dies aufgrund der breiten Streuung von Tumorzellen im Organismus zu massiv eingeschränkten Behandlungsoptionen führt und oft auch der Grund für die meisten Schmerzen und Leiden der Patienten darstellt. Daher geht die Diagnose von Metastasen meist mit einer stark verschlechterten Prognose einher (Dominguez et al. 2008).

Besonders das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist für seine frühe Metastasierung bekannt, was dazu führt, dass bei Diagnose die meisten Patienten schon Metastasen aufweisen (Singh et al. 2011).

Für die Bildung von Metastasen müssen Zellen die Fähigkeit besitzen, unabhängig von anderen Zellen und deren Wachstumsfaktoren, eigene Kolonien ausbilden zu können. Dies kann man sehr gut mit dem hier durchgeführten Soft-Agar-Assay untersuchen.

Eine Herunterregulation von IRAK1 konnte keinen signifikanten Effekt auf die substratunabhängige Koloniebildungsfähigkeit der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien erzielen. Auch wenn IRAK1 laut aktueller Literatur über die Aktivierung von NF- κ B zur Bildung von Metastasen beiträgt, konnte ein solcher Effekt hier nicht verzeichnet werden.

Erstaunlicherweise führte jedoch eine Herunterregulation der Kinase TTK zu einem durchgehend signifikanten Verlust der substratunabhängigen Koloniebildungsfähigkeit aller getesteten Tumorzelllinien von bis zu 88,5%. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TTK eine essentielle Rolle in der Bildung von Metastasen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas spielt, was bisher noch nie in der Literatur beschrieben wurde.

6.1.5 TTK-Hemmung führt zur Apoptoseinduktion

Das Ziel einer „targeted-therapy“ soll im Idealfall nicht nur eine Proliferations- und Metastasierungshemmung sein, sondern sie sollte auch die Tumorzelle ganz vernichten, folglich eine Apoptose induzieren.

Dies wurde im letzten Experiment untersucht. Nach Herunterregulation von TTK oder IRAK1 konnte in den Pankreaskarzinomzelllinien 8988t und Panc1 eine Apoptose mithilfe des Enzyms PARP1 nachgewiesen werden, während die untransfizierten Zellen und die der siKontrolle nahezu unbeschadet blieben.

In der Suit028-Zelllinie konnte jedoch nur nach Herunterregulation von TTK eine Apoptose nachgewiesen werden.

Die Hek293-Zelllinie zeigte in beiden Versuchen konträre Ergebnisse: in Versuch 1 blieb sie nach Herunterregulation der Kinasen IRAK1 oder TTK vollkommen unbeschadet während in Versuch 2 eine leicht verstärkte Apoptose unter TTK- oder IRAK1-Knock-down zu erkennen war.

Es ist jedoch zu konstatieren, dass auch in diesem Versuch die Herunterregulation von TTK einen eindeutigen Effekt auf die Apoptoseinduktion von Tumorzellen zeigt, der unter Herunterregulation von IRAK1 geringer ausfällt.

TTK scheint also eine wichtige Rolle im Überleben einer Pankreaskarzinomzelle zu spielen, was in der aktuellen Literatur bisher auch noch nicht beschrieben wurde. Hier wurde

lediglich die Relevanz von TTK beim Ablauf der Mitose und des weiteren Zellzyklus beschrieben. Die Kinase TTK scheint aber noch viel mehr Funktionen in der Zelle selbst sowie in der Karzinogenese auszuüben. Man könnte auch vermuten, dass die Kinase TTK in Zellen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas mutiert ist, da sie dort aber nicht in der Hek293-Zelllinie (wo sie verstärkt exprimiert ist) einen wichtigen Beitrag zur Metastasierung, zum Zellüberleben sowie zur Apoptosehemmung leistet.

6.2 Kritische Auseinandersetzung mit den Methoden dieser Arbeit

Die Aussagekraft dieser Arbeit ist abhängig von der Effizienz des Knock-downs mittels passender siRNA. Um diese Effizienz zu steigern wurde hier mit siRNA-Pools, bestehend aus vier verschiedenen siRNAs, die an unterschiedlichen Stellen der mRNA der gesuchten Kinase angreifen konnten, gearbeitet. Daraus folgt jedoch, dass man zwar eine höhere Chance hat eine Repression der Kinase zu erreichen, jedoch müssen noch weitere Versuche gemacht werden, um herauszufinden, ob diese Repression nur mithilfe des siRNA-Pools funktioniert oder ob eine der vier gepoolten siRNAs alleine den gleichen Effekt aufweist. Für die Untersuchung der Funktion dieser Kinasen hat aber die Methode, mit siRNA-Pools zu arbeiten, völlig ausgereicht.

Die Herunterregulation der Kinasenexpression hat in den ersten 60 Versuchen funktioniert, wie Abbildung 5.2 zeigt. Auch für die ersten Migrationsassays konnte ein Knock-down auf RNA-Ebene gezeigt werden. Bei den weiteren Untersuchungen habe ich jedoch auf einen zusätzlichen Beweis der Knock-down-Effizienz verzichtet, da man hier eindeutige Auswirkungen der Herunterregulation der Kinasenexpression auf das Ergebnis des Versuchs erkennen konnte. Vielleicht hätte man zur vollständigen und besseren Beweisführung auch hier nochmals eine qRT-PCR zur Quantifizierung des Knock-downs machen können.

Ein Schwachpunkt dieser Arbeit stellt die Hek293-Zelllinie dar. Sie wurde ausgewählt, da sie schon zum Pilotexperiment des NMI Reutlingen zusammen mit der Zelllinie Panc1 herangezogen wurde. Weiterhin ist sie eine epitheliale Zelllinie, die sich gut kultivieren und transfizieren lässt. Jedoch stammt diese Zelllinie aus embryonalen Nierengewebe und nicht aus dem Pankreas (Graham et al. 1977). Diese Zelllinie wurde künstlich transformiert, sodass sie als Modell einer gesunden epithelialen Zelllinie nur bedingt tauglich ist. Hierbei wäre die HPDE-Zelllinie (Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells) aufgrund ihres Ursprungs besser geeignet gewesen (Ouyang et al. 2000). Diese Zelllinie ist aber sehr schwierig zu kultivieren und zu transfizieren. Zusätzlich soll sie Fehler im p53-Signalweg aufweisen (Ouyang et al. 2000).

Zur Auswertung des Migrationsassays ist anzumerken, dass diese sehr schwierig und untersucherabhängig war. Verschiedene Begutachter identifizierten unterschiedliche Gebilde als vollständig migrierte Zellen, wodurch Verzerrungen bei der Auswertung der

Bilder entstanden. Diese Verzerrungen versuchte ich möglichst zu vermeiden, indem ich die Zellen nach meinem eigenen Schema, nach Absprache mit anderen Laboranten, die Erfahrung mit diesem Assay hatten, zählte.

Ein von einem ehemaligen Doktoranden meiner Arbeitsgruppe entworfenes Programm zum Zählen von fotografierten Zellen erwies sich in diesem Fall als nicht brauchbar, da es nicht zwischen teils migrierten und vollständig migrierten Zellen unterschied. Somit blieb nur das manuelle Auszählen migrierter Zellen mittels des Programms ImageJ. Daher könnte man die Aussagekraft des hier durchgeführten Migrationsassays in Frage stellen.

6.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden erstmals die humanen Kinasen IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC auf ihren möglichen Einsatz als Ziel einer „targeted-therapy“ des duktales Adenokarzinoms des Pankreas hin untersucht.

Die ersten Versuche zeigten, dass die Kinasen SGK1, TBK1 und PRKDC sich nicht als Ziel einer „targeted-therapy“ eignen würden.

Jedoch waren die Ergebnisse zu den Kinasen IRAK1 und TTK umso interessanter: Die Ergebnisse der Überlebensassays der untersuchten Zelllinien lassen vermuten, dass IRAK1 einen geringen Einfluss auf das Überleben und die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen hat. Diese Vermutung lässt sich durch eine verstärkte Apoptoserate nach Herunterregulation von IRAK1 in zwei von drei getesteten Pankreaskarzinomzelllinien bestärken. Jedoch hat IRAK1 keinen Einfluss auf eine Metastasierung und nur einen geringen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen.

Die Herunterregulation der Kinase TTK hingegen führte in jedem der Versuche, ausgenommen des Migrationsassays, zu dem gewünschten Ergebnis: Eine Repression der Kinase TTK führte zu einer verminderten Zellvitalität, zu einer stark verminderten Koloniebildungsfähigkeit und zur Apoptose in jeder untersuchten Pankreaskarzinomzelllinie, wobei die benigne Vergleichszelllinie nahezu unbeschadet blieb.

Damit scheint TTK eine essentielle Rolle in der Proliferation, der Metastasierung und der Hemmung der Apoptose in Pankreaskarzinomzellen zu spielen. Um die Kinase TTK als mögliches Ziel einer „targeted-therapy“ gegen das Pankreaskarzinom in Betracht zu ziehen, sind noch weitere Untersuchungen sowie in vivo Experimente nötig.

6.4 Ausblick

Ergänzend zu dieser Arbeit sollten, wie oben genannt, noch weitere Untersuchungen zur Kinase TTK durchgeführt werden.

Als erstes müsste man den Pool aus vier siRNA's, mit dem hier gearbeitet wurde, einzeln untersuchen, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte ganz oder zum Teil auf „off-target“-Effekten einer der enthaltenen siRNAs beruhen. Dazu müssten mit jeder der vier gepoolten siRNA's einzeln die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wiederholt werden. Zusätzlich könnten damit die hier erhobenen Daten nochmals verifiziert werden.

Wenn auch diese Experimente zu dem gleichen Ergebnis führen und man eine siRNA des Pools als die Effektivste identifiziert hat, könnte man mit in vivo Experimenten fortfahren.

Hierzu würden sich etablierte und in der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung stehende Pankreaskarzinommodelle der Maus anbieten. Ein spezifischer Inhibitor der Kinase TTK wurde kürzlich in der Literatur beschrieben: Dieser heisst MPI-0479605 (von Myriad Pharmaceuticals, Salt Lake City, UT) und soll ein spezifischer Hemmstoff von TTK sein, der auch schon in der Maus getestet wurde (Tardif et al. 2011; Vijay Kumar et al. 2012). Ein weiterer Hemmstoff des Orthologs von TTK, genannt hMPS1 (human monopolar spindle 1) Kinase, wäre NMS-P715, ein selektiver Hemmstoff mit guter oraler Bioverfügbarkeit, der bisherigen Untersuchungen zufolge keinen Schaden an gesunden Zellen anrichtet (Colombo et al. 2010). Diese TTK-Hemmstoffe wurden bisher noch nicht mit dem Pankreaskarzinom in Zusammenhang gebracht, sondern teils für andere Erkrankungen getestet sowie lediglich als mögliche Therapie von ‚Krebs‘ in Betracht gezogen.

Somit könnte man einen Effekt auf das Pankreaskarzinom und die Nebenwirkungen der Herunterregulation von TTK in vivo testen.

Abschließend lässt sich sagen, dass TTK eine spannende Kinase in der Tumorforschung darstellt und ich hoffe, dass dies eine Grundlage für eine mögliche und effizientere Chemotherapie für Pankreaskarzinompatienten darstellen könnte.

7 Zusammenfassung

Die Diagnose eines Pankreaskarzinoms ist auch heute noch aufgrund von seiner frühen Metastasierung, der späten Diagnosestellung und insuffizienter Therapieoptionen mit einer infausten Prognose vergesellschaftet. Daher ist es wichtig an neuen Therapieansätzen zu forschen.

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene humane Kinasen, IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC auf ihre Funktion und ihren Einfluss in Zellen des duktales Adenokarzinom des Pankreas hin untersucht. Dabei wurde ein besonderer Wert auf karzinomspezifischen Eigenschaften wie verstärkte Proliferation, die Fähigkeit zu migrieren und Metastasen zu bilden, sowie die Hemmung der Apoptose gelegt. Ziel war es, eine Kinase zu finden, dessen Hemmung in der „targeted-therapy“ genutzt werden konnte.

Während die Kinasen TBK1 und PRKDC keinen wünschenswerten Einfluss auf die Proliferation zeigten und somit verworfen wurden, führte eine Herunterregulation von SGK1 zu einem negativen Effekt auf sowohl maligne wie auch auf benigne Zelllinien. Da dies auch nicht das Ziel einer „targeted-therapy“ ist, wurde auch diese Kinase als Kandidat verworfen.

Übrig blieben die Kinasen IRAK1 und TTK. Beide zeigten jeweils nach Herunterregulation eine Hemmung der Zellvitalität, wobei diese Hemmung nach Herunterregulation von TTK signifikant stärker ausfiel als unter Herunterregulation von IRAK1. Dass beide Kinasen für das Zellüberleben nötig zu sein scheinen, zeigte auch das Ergebnis des Apoptoseassays.

Festzustellen ist jedoch, dass TTK in allen Versuchen, außer dem Migrationsassay, den größten Effekt aufwies. Folglich scheint die Kinase TTK sowohl in der Proliferation und der Hemmung der Apoptose, als auch in der Fähigkeit Metastasen zu bilden eine wichtige Rolle zu spielen.

Dies macht TTK als Ziel einer „targeted-therapy“ gegen das duktales Adenokarzinom des Pankreas interessant und sollte daher weiter verfolgt werden.

8 Abstract

The diagnosis of pancreatic cancer still remains related with poor diagnosis, since it is known for its early metastasis and its inapparent growth without any sufficient therapy strategies. These facts implicate the need for more research concerning the treatment of pancreatic cancer.

In this thesis five different human kinases, IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 and PRKDC have been analyzed concerning their function and their importance in cell lines of pancreatic cancer.

Especially cancer specific characteristics like proliferation, the capability of migration and metastasis as well as the inhibition of apoptosis were examined.

The aim of this thesis was to identify a kinase, which could be inhibited by a targeted-therapy against pancreatic cancer.

While the inhibition of the kinases TBK1 and PRKDC did not show any desirable effects on proliferation, the repression of the kinase SGK1 resulted in the global inhibition of proliferation of all cell lines including also the benign cellline. This is the reason why these three kinases were excluded from the following experiments.

The repression of the kinase IRAK1 as well as the repression of the kinase TTK resulted in an inhibition of proliferation plus an induction of apoptosis, where the effect of TTK repression was greater than of IRAK1 repression. It should be noted that the kinase TTK showed the greatest effect in all experiments, except for the migration assay.

Consequently TTK seems to play a crucial role in proliferation, in inhibition of apoptosis as well as in the ability of metastasis of pancreatic cancer.

These findings suggest the kinase TTK as a potential target regarding a new chemotherapy-option against the ductal adenocarcinoma of pancreas, which should be further examined.

9 Literaturverzeichnis

Ahn, ChangHyeok; Kim, YooRi; Kim, SungSoo; Yoo, NamJin; Lee, SugHyung (2009): Mutational analysis of TTK gene in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. In: *Cancer Res Treat* 41 (4), S. 224–228.

Ammerpohl, Ole; Kalthoff, Holger (2007): The role of protein kinases in pancreatic carcinogenesis. In: *Clin Chim Acta* 381 (1), S. 56–62.

Andreotti, Gabriella; Silverman, DebraT (2012): Occupational risk factors and pancreatic cancer: a review of recent findings. In: *Mol Carcinog* 51 (1), S. 98–108.

Awasthi, Niranjana; Schwarz, Margaret A.; Schwarz, Roderich E. (2011): Antitumour activity of sunitinib in combination with gemcitabine in experimental pancreatic cancer. In: *HPB (Oxford)* 13 (9), S. 597–604.

Barbie, David A.; Tamayo, Pablo; Boehm, Jesse S.; Kim, So Young; Moody, Susan E.; Dunn, Ian F. et al. (2009): Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. In: *Nature* 462 (7269), S. 108–112.

Berridge, M. V.; Tan, A. S. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. In: *Arch Biochem Biophys* 303 (2), S. 474–482..

Bharti, AlokC; Aggarwal, BharatB (2002): Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. In: *Biochem Pharmacol* 64 (5-6), S. 883–888.

Bhaumik, D.; Scott, G. K.; Schokrpur, S.; Patil, C. K.; Campisi, J.; Benz, C. C. (2008): Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. In: *Oncogene* 27 (42), S. 5643–5647.

Bosetti, Cristina; Bertuccio, Paola; Negri, Eva; La, VecchiaCarlo; Zeegers, MauriceP; Boffetta, Paolo (2012): Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. In: *Mol Carcinog* 51 (1), S. 3–13.

Brecht, I. B.; Schneider, D. T.; Kloppel, G.; von, SchweinitzD; Barthlen, W.; Hamre, M. R. (2011): Malignant pancreatic tumors in children and young adults: evaluation of 228 patients

identified through the Surveillance, Epidemiology, and End Result (SEER) database. In: *Klin Padiatr* 223 (6), S. 341–345.

Bruhn, Maressa A.; Pearson, Richard B.; Hannan, Ross D.; Sheppard, Karen E. (2010): Second AKT: the rise of SGK in cancer signalling. In: *Growth Factors* 28 (6), S. 394–408.

Brunet, A.; Park, J.; Tran, H.; Hu, L. S.; Hemmings, B. A.; Greenberg, M. E. (2001): Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). In: *Mol Cell Biol* 21 (3), S. 952–965.

Buchholz, Malte; Biebl, Anja; Neesse, Albrecht; Wagner, Martin; Iwamura, Takeshi; Leder, Gerhard et al. (2003): SERPINE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. In: *Cancer Res* 63 (16), S. 4945–4951.

Buse, P.; Tran, S. H.; Luther, E.; Phu, P. T.; Aponte, G. W.; Firestone, G. L. (1999): Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways. In: *J Biol Chem* 274 (11), S. 7253–7263.

Cao, Z.; Henzel, W. J.; Gao, X. (1996): IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. In: *Science* 271 (5252), S. 1128–1131.

Chen, Hong-Chen (2005): Boyden chamber assay. In: *Methods Mol Biol* 294, S. 15–22.

Clément, Jean-François; Meloche, Sylvain; Servant, Marc J. (2008): The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. In: *Cell Res* 18 (9), S. 889–899.

Collisson, Eric A.; Sadanandam, Anguraj; Olson, Peter; Gibb, William J.; Truitt, Morgan; Gu, Shenda et al. (2011): Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. In: *Nat Med* 17 (4), S. 500–503.

Colombo, Riccardo; Caldarelli, Marina; Mennecozzi, Milena; Giorgini, Maria Laura; Sola, Francesco; Cappella, Paolo et al. (2010): Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase. In: *Cancer Res* 70 (24), S. 10255–10264.

Cuneo, Kyle C.; Geng, Ling; Fu, Allie; Orton, Darren; Hallahan, Dennis E.; Chakravarthy, Anuradha Bapsi (2008): SU11248 (sunitinib) sensitizes pancreatic cancer to the cytotoxic effects of ionizing radiation. In: *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71 (3), S. 873–879.

Delhase, Mireille; Kim, Soo-Youl; Lee, Ho; Naiki-Ito, Aya; Chen, Yi; Ahn, Eu-Ree et al. (2012): TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (4), S. E177-86.

Dominguez, Ismael; Crippa, Stefano; Thayer, Sarah P.; Hung, Yin P.; Ferrone, Cristina R.; Warshaw, Andrew L.; Fernandez-Del Castillo, Carlos (2008): Preoperative platelet count and survival prognosis in resected pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *World J Surg* 32 (6), S. 1051–1056.

Dou, Zhen; Ding, Xia; Zereshki, Arzhang; Zhang, Ying; Zhang, Jie; Wang, Feng et al. (2004): TTK kinase is essential for the centrosomal localization of TACC2. In: *FEBS Lett* 572 (1-3), S. 51–56.

Dou, Zhen; Sawagechi, Akira; Zhang, Jie; Luo, Hong; Brako, Lawrence; Yao, Xue Biao (2003): Dynamic distribution of TTK in HeLa cells: insights from an ultrastructural study. In: *Cell Res* 13 (6), S. 443–449.

Elsasser, 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. In: *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 61 (5), S. 295–306.

Fabre, Kristin M.; Ramaiah, Lila; Dregalla, Ryan C.; Desaintes, Christian; Weil, Michael M.; Bailey, Susan M.; Ullrich, Robert L. (2011): Murine Prkdc polymorphisms impact DNA-PKcs function. In: *Radiat Res* 175 (4), S. 493–500.

Fisk, Harold A.; Mattison, Christopher P.; Winey, Mark (2003): Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (25), S. 14875–14880.

Fisk, Harold A.; Mattison, Christopher P.; Winey, Mark (2004): A field guide to the Mps1 family of protein kinases. In: *Cell Cycle* 3 (4), S. 439–442.

Frisch, S. M.; Francis, H. (1994): Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. In: *J Cell Biol* 124 (4), S. 619–626.

Fujimori, Akira; Hashimoto, Hiroshi; Araki, Ryoko; Saito, Toshiyuki; Sato, Shinji; Kasama, Yasuji et al. (2002): Sequence analysis of 193.4 and 83.9 kbp of mouse and chicken genomic DNAs containing the entire Prkdc (DNA-PKcs) gene. In: *Radiat Res* 157 (3), S. 298–305.

Fujioka, Shuichi; Sclabas, GuidoM; Schmidt, Christian; Frederick, WayneA; Dong, QiangG; Abbruzzese, JamesL et al. (2003): Function of nuclear factor kappaB in pancreatic cancer metastasis. In: *Clin Cancer Res* 9 (1), S. 346–354.

Garg, A.; Aggarwal, B. B. (2002): Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. In: *Leukemia* 16 (6), S. 1053–1068.

Giehl, K.; Skripczynski, B.; Mansard, A.; Menke, A.; Gierschik, P. (2000): Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: implications for cell proliferation and cell migration. In: *Oncogene* 19 (25), S. 2930–2942.

Goncalves, Adriana; Burckstummer, Tilmann; Dixit, Evelyn; Scheicher, Ruth; Gorna, Maria W.; Karayel, Evren et al. (2011): Functional dissection of the TBK1 molecular network. In: *PLoS One* 6 (9), S. e23971.

Gottipati, Sridevi; Rao, NavinL; Fung-Leung, Wai-Ping (2008): IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. In: *Cell Signal* 20 (2), S. 269–276.

Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *J Gen Virol* 36 (1), S. 59–74.

Grutzmann, Robert; Pilarsky, Christian; Ammerpohl, Ole; Luttges, Jutta; Bohme, Armin; Sipos, Bence et al. (2004): Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. In: *Neoplasia* 6 (5), S. 611–622.

Hartupee, Justin; Li, Xiaoxia; Hamilton, Thomas (2008): Interleukin 1alpha-induced NFkappaB activation and chemokine mRNA stabilization diverge at IRAK1. In: *J Biol Chem* 283 (23), S. 15689–15693.

Hassan, ManalM; Bondy, MelissaL; Wolff, RobertA; Abbruzzese, JamesL; Vauthey, Jean-Nicolas; Pisters, PeterW et al. (2007): Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. In: *Am J Gastroenterol* 102 (12), S. 2696–2707.

Huber, MargitA; Azoitei, Ninel; Baumann, Bernd; Grunert, Stefan; Sommer, Andreas; Pehamberger, Hubert et al. (2004): NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. In: *J Clin Invest* 114 (4), S. 569–581.

Husmann, Gabriele (2010): Krebs in Deutschland. 2005/2006 ; Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Aufl. Berlin, Saarbrücken: Robert Koch-Inst; GEKID.

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. In: *Jpn J Cancer Res* 78 (1), S. 54–62.

Jensen, L. E.; Whitehead, A. S. (2001): IRAK1b, a novel alternative splice variant of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), mediates interleukin-1 signaling and has prolonged stability. In: *J Biol Chem* 276 (31), S. 29037–29044.

Jensen, L. E.; Muzio, M.; Mantovani, A.; Whitehead, A. S. (2000): IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. In: *J Immunol* 164 (10), S. 5277–5286.

Karow, Thomas (2012): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis 2012; [+ Markierung der Prüfungsfakten des "Hammerexamens" bis 04/2011, + Therapieempfehlungen deutscher und internationaler Fachgesellschaften, + umfassende Dosierungen] / Thomas Karow ; Ruth Lang-Roth. Hg. v. Ruth Lang-Roth. Pulheim: [Selbstverl.].

Keleg, Shereen; Buchler, Peter; Ludwig, Roman; Buchler, Markus W.; Friess, Helmut (2003): Invasion and metastasis in pancreatic cancer. In: *Mol Cancer* 2, S. 14.

Korherr, Christian; Gille, Hendrik; Schafer, Rolf; Koenig-Hoffmann, Kerstin; Dixelius, Johan; Eglund, Kristi A. et al. (2006): Identification of proangiogenic genes and pathways by high-throughput functional genomics: TBK1 and the IRF3 pathway. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (11), S. 4240–4245.

Krell, Jonathan; Frampton, Adam E.; Jiao, Long R.; Stebbing, Justin (2012): Can pharmacogenomics guide effective anticancer therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma? In: *Pharmacogenomics* 13 (9), S. 977–979.

Lang, Florian; Perrotti, Nicola; Stournaras, Christos (2010): Colorectal carcinoma cells—Regulation of survival and growth by SGK1 (10). Online verfügbar unter http://ac.els-cdn.com/S1357272510001974/1-s2.0-S1357272510001974-main.pdf?_tid=7aa8363681b59aa493d0bd6fae3aa3f9&acdnat=1343639839_badc80aa9482e4e1668d7a8b71b88673, zuletzt geprüft am 30.07.2012.

Lazebnik, Y. A.; Kaufmann, S. H.; Desnoyers, S.; Poirier, G. G.; Earnshaw, W. C. (1994): Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. In: *Nature* 371 (6495), S. 346–347.

Lee, D.-F.; Hung, M.-C (2008): Advances in Targeting IKK and IKK-Related Kinases for Cancer Therapy. In: *Clinical Cancer Research* 14 (18), S. 5656–5662.

Lee, Suk-Hee; Kim, Chung-Hui (2002): DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint. In: *Mol Cells* 13 (2), S. 159–166.

Li, Yiwei; Vandenboom, TimothyG2nd; Wang, Zhiwei; Kong, Dejuan; Ali, Shadan; Philip, PhilipA; Sarkar, FazlulH (2010): miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. In: *Cancer Res* 70 (4), S. 1486–1495.

Liu, Gang; Park, Young-Jun; Abraham, Edward (2008): Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) -1-mediated NF-kappaB activation requires cytosolic and nuclear activity. In: *FASEB J* 22 (7), S. 2285–2296.

Luftig, Micah; Prinarakis, Efthimios; Yasui, Teruhito; Tschritzis, Theodore; Cahir-McFarland, Ellen; Inoue, Jun-Ichiro et al. (2003): Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (26), S. 15595–15600.

Lynch, ShannonM; Vrieling, Alina; Lubin, JayH; Kraft, Peter; Mendelsohn, JulieB; Hartge, Patricia et al. (2009): Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. In: *Am J Epidemiol* 170 (4), S. 403–413.

Madden, M. E.; Sarras, MPJr (1988): Morphological and biochemical characterization of a human pancreatic ductal cell line (PANC-1). In: *Pancreas* 3 (5), S. 512–528.

Maitra, Anirban; Hruban, RalphH (2008): Pancreatic cancer. In: *Annu Rev Pathol* 3, S. 157–188.

Martin, L. K.; Li, X.; Kleiber, B.; Ellison, E. C.; Bloomston, M.; Zalupski, M.; Bekaii-Saab, T. S. (2012): VEGF remains an interesting target in advanced pancreas cancer (APCA): results of a multi-institutional phase II study of bevacizumab, gemcitabine, and infusional 5-fluorouracil in patients with APCA. In: *Ann Oncol*.

Meek, Katheryn; Gupta, Shikha; Ramsden, Dale A.; Lees-Miller, Susan P. (2004): The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. In: *Immunol Rev* 200, S. 132–141.

Miele, Evelina; Spinelli, Gian Paolo; Miele, Ermanno; Di Fabrizio, Enzo; Ferretti, Elisabetta; Tomao, Silverio; Gulino, Alberto (2012): Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. In: *Int J Nanomedicine* 7, S. 3637–3657.

Mihaljevic, AndreL; Michalski, ChristophW; Friess, Helmut; Kleeff, Jorg (2010): Molecular mechanism of pancreatic cancer--understanding proliferation, invasion, and metastasis. In: *Langenbecks Arch Surg* 395 (4), S. 295–308.

Mills, G. B.; Schmandt, R.; McGill, M.; Amendola, A.; Hill, M.; Jacobs, K. et al. (1992): Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. In: *J Biol Chem* 267 (22), S. 16000–16006.

Morgan, KatherineA; Adams, DavidB (2010): Solid tumors of the body and tail of the pancreas. In: *Surg Clin North Am* 90 (2), S. 287–307.

Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1-2), S. 55–63.

Niittymaki, Iina; Gylfe, Alexandra; Laine, Leena; Laakso, Marko; Lehtonen, Heli J.; Kondelin, Johanna et al. (2011): High frequency of TTK mutations in microsatellite-unstable colorectal cancer and evaluation of their effect on spindle assembly checkpoint. In: *Carcinogenesis* 32 (3), S. 305–311.

Nitsche, Claudia; Simon, Peter; Weiss, Fulrich; Fluhr, Gabriele; Weber, Eckhard; Gartner, Simone et al. (2011): Environmental risk factors for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. In: *Dig Dis* 29 (2), S. 235–242.

Niu, Jiangong; Li, Zhongkui; Peng, Bailu; Chiao, PaulJ (2004): Identification of an autoregulatory feedback pathway involving interleukin-1alpha in induction of constitutive NF-kappaB activation in pancreatic cancer cells. In: *J Biol Chem* 279 (16), S. 16452–16462.

Nothlings, Ute; Murphy, SuzanneP; Wilkens, LynneR; Henderson, BrianE; Kolonel, LaurenceN (2007a): Dietary glycemic load, added sugars, and carbohydrates as risk factors for pancreatic cancer: the Multiethnic Cohort Study. In: *Am J Clin Nutr* 86 (5), S. 1495–1501.

Nothlings, Ute; Wilkens, LynneR; Murphy, SuzanneP; Hankin, JeanH; Henderson, BrianE; Kolonel, LaurenceN (2007b): Body mass index and physical activity as risk factors for pancreatic cancer: the Multiethnic Cohort Study. In: *Cancer Causes Control* 18 (2), S. 165–175.

Oberstein, PauleE; Saif, MuhammadWasif (2011): First-line treatment for advanced pancreatic cancer. Highlights from the "2011 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium". San Francisco, CA, USA. January 20-22, 2011. In: *JOP* 12 (2), S. 96–100.

Oliver, F. J.; La Rubia, G. de; Rolli, V.; Ruiz-Ruiz, M. C.; Murcia, G. de; Murcia, J. M. (1998): Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. In: *J Biol Chem* 273 (50), S. 33533–33539.

Ou, Yi-Hung; Torres, Michael; Ram, Rosalyn; Formstecher, Etienne; Roland, Christina; Cheng, Tzuling et al. (2011): TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation. In: *Mol Cell* 41 (4), S. 458–470.

Ouyang, H.; Mou, Lj; Luk, C.; Liu, N.; Karaskova, J.; Squire, J.; Tsao, M. S. (2000): Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. In: *Am J Pathol* 157 (5), S. 1623–1631.

Park, BaeKeun; Zhang, Honglai; Zeng, Qinghua; Dai, Jinlu; Keller, EvanT; Giordano, Thomas et al. (2007): NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. In: *Nat Med* 13 (1), S. 62–69.

Park, J.; Leong, M. L.; Buse, P.; Maiyar, A. C.; Firestone, G. L.; Hemmings, B. A. (1999): Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. In: *EMBO J* 18 (11), S. 3024–3033.

Pomerantz, J. L.; Baltimore, D. (1999): NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. In: *EMBO J* 18 (23), S. 6694–6704.

Rao, Navin; Nguyen, Steven; Ngo, Karen; Fung-Leung, Wai-Ping (2005): A novel splice variant of interleukin-1 receptor (IL-1R)-associated kinase 1 plays a negative regulatory role in Toll/IL-1R-induced inflammatory signaling. In: *Mol Cell Biol* 25 (15), S. 6521–6532.

Rassow, Joachim (2008): Biochemie. 50 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Sahoo, Sunati; Brickley, Deanna R.; Kocherginsky, Masha; Conzen, Suzanne D. (2005): Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. In: *Eur J Cancer* 41 (17), S. 2754–2759.

Schmandt, R.; Hill, M.; Amendola, A.; Mills, G. B.; Hogg, D. (1994): IL-2-induced expression of TTK, a serine, threonine, tyrosine kinase, correlates with cell cycle progression. In: *J Immunol* 152 (1), S. 96–105.

Sclabas, Guido M.; Fujioka, Shuichi; Schmidt, Christian; Evans, Douglas B.; Chiao, Paul J. (2003): NF-kappaB in pancreatic cancer. In: *Int J Gastrointest Cancer* 33 (1), S. 15–26.

Sharma, Sreenath V.; Settleman, Jeff (2010): Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and "oncogenic shock". In: *Biochem Pharmacol* 80 (5), S. 666–673.

Singh, Puneet; Srinivasan, Radhika; Wig, Jai Dev (2011): Major molecular markers in pancreatic ductal adenocarcinoma and their roles in screening, diagnosis, prognosis, and treatment. In: *Pancreas* 40 (5), S. 644–652.

Smith, G. C.; Divecha, N.; Lakin, N. D.; Jackson, S. P. (1999): DNA-dependent protein kinase and related proteins. In: *Biochem Soc Symp* 64, S. 91–104.

Stathis, Anastasios; Moore, Malcolm J. (2010): Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. In: *Nat Rev Clin Oncol* 7 (3), S. 163–172.

Tardif, Keith D.; Rogers, Aaron; Cassiano, Jared; Roth, Bruce L.; Cimbora, Daniel M.; McKinnon, Rena et al. (2011): Characterization of the cellular and antitumor effects of MPI-0479605, a small-molecule inhibitor of the mitotic kinase Mps1. In: *Mol Cancer Ther* 10 (12), S. 2267–2275.

Thomas, J. A.; Allen, J. L.; Tsen, M.; Dubnicoff, T.; Danao, J.; Liao, X. C. et al. (1999): Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. In: *J Immunol* 163 (2), S. 978–984.

Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI (2010). Unter Mitarbeit von Joachim Bertz. Berlin: Robert-Koch-Inst

Vijay Kumar, D.; Hoarau, Christophe; Bursavich, Matthew; Slattum, Paul; Gerrish, David; Yager, Kraig et al. (2012): Lead optimization of purine based orally bioavailable Mps1 (TTK) inhibitors. In: *Bioorg Med Chem Lett* 22 (13), S. 4377–4385.

Vrieling, Alina; Bueno-de-Mesquita, HBas; Boshuizen, HendriekC; Michaud, DominiqueS; Severinsen, MarianneT; Overvad, Kim et al. (2010): Cigarette smoking, environmental tobacco smoke exposure and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. In: *Int J Cancer* 126 (10), S. 2394–2403.

Waldegger, S.; Erdel, M.; Nagl, U. O.; Barth, P.; Raber, G.; Steuer, S. et al. (1998): Genomic organization and chromosomal localization of the human SGK protein kinase gene. In: *Genomics* 51 (2), S. 299–302.

Webster, M. K.; Goya, L.; Ge, Y.; Maiyar, A. C.; Firestone, G. L. (1993): Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. In: *Mol Cell Biol* 13 (4), S. 2031–2040.

Wei, Jen-Hsuan; Chou, Yi-Fan; Ou, Yi-Hung; Yeh, Yen-Hsiu; Tyan, Shiaw-Wei; Sun, Te-Ping et al. (2005): TTK/hMps1 participates in the regulation of DNA damage checkpoint response by phosphorylating CHK2 on threonine 68. In: *J Biol Chem* 280 (9), S. 7748–7757.

Yang, Zu-Yao; Yuan, Jin-Qiu; Di, Meng-Yang; Zheng, Da-Yong; Chen, Jin-Zhang; Ding, Hong et al. (2013): Gemcitabine plus erlotinib for advanced pancreatic cancer: a systematic review with meta-analysis. In: *PLoS One* 8 (3), S. e57528.

You, Lei; Chen, Ge; Zhao, Yu-pei (2010a): Core signaling pathways and new therapeutic targets in pancreatic cancer. In: *Chin Med J (Engl)* 123 (9), S. 1210–1215.

You, Lei; Chen, Ge; Zhao, Yu-pei (2010b): Core signaling pathways and new therapeutic targets in pancreatic cancer. In: *Chin Med J (Engl)* 123 (9), S. 1210–1215.

Yu, Y.; Okayasu, R.; Weil, M. M.; Silver, A.; McCarthy, M.; Zabriskie, R. et al. (2001): Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. In: *Cancer Res* 61 (5), S. 1820–1824.

Zentrum für Krebsregisterdaten (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. Online verfügbar unter

http://www.rki.de/cln_226/nn_203956/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/kid2012,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2012.pdf, zuletzt aktualisiert am 08.02.2012, zuletzt geprüft am 05.03.2012.

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CHK2	Proteinkinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ERK	extracellular-signal regulated kinase
FCS	fetal calf serum
HCL	Salzsäure
Hek293	Human embryonic kidney cell line
hMps1	human monopolar spindle protein 1 (=Ortholog zu TTK)
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	nuclear factor kappa B
p53	Protein 53
PARP1	Poly-(ADP-Ribose-) Polymerase
PBS	Phosphate-buffered saline

PCR	polymerase chain reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
Rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
siRNA	small interfering RNA
TACC2	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2
TAK1	TGF-beta activated kinase 1
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline Tween 20
TNF	Tumor necrosis factor
Tollip	Toll interacting protein
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
VEGF	vascular endothelial growth factor

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1.7	Antikörper
Tabelle 4.1.8	Primer
Tabelle 4.1.9	siRNA
Tabelle 4.5.2	Superscript Mastermix
Tabelle 4.5.3.1	Mastermix für qRT-PCR
Tabelle 4.5.3.2	Beispiel für ein Pipettierschema für das Expressionsverhältnis von IRAK1, TTK und SGK nach siRNA-Knockdown in 3 Versuchen
Tabelle 4.6.4	Western-Blot Puffer

10.3 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1: Der K-RAS Signalweg
- Abbildung 2.2: Panc-1 siRNA screening auf Caspase 3/7 Aktivierung vom NMI Reutlingen für das PakaNostra-Projekt.
- Abbildung 2.3.1: Aufbau des IRAK1-Gens.
- Abbildung 2.3.2: Signalkaskade von IRAK1
- Abbildung 2.4: Schema der Funktion von TTK während der Mitose
- Abbildung 5.1.1: Relative Expression der Kinasen IRAK1, SGK1, TTK, TBK1 und PRKDC in verschiedenen Panreaskrinomzelllinien und Hek293
- Abbildung 5.1.2: Vergleich der relativen Expression der verschiedenen Kinasen in den genannten Tumorzelllinien und Hek293
- Abbildung 5.2: Knockdown-Effizienz der siRNAs
- Abbildung 5.3: Einfluss des Knockdowns auf die Zellvitalität der einzelnen Zelllinien
- Abbildung 5.3: Einfluss des Knockdowns auf die Zellvitalität der einzelnen Zelllinien
- Abbildung 5.4: Ergebnisse des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzelllinien nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK mittels siRNA
- Abbildung 5.4: Ergebnisse des Migrationsverhaltens der Pankreaskarzinomzelllinien nach Herunterregulation von IRAK1 und TTK mittels siRNA.
- Abbildung 5.5: Einfluss der Herunterregulation der Kinasen IRAK1 und TTK auf die Koloniebildungsfähigkeit der Pankreaskarzinomzellen.
- Abbildung 5.6: Einfluss des Knockdowns der Kinasen IRAK1 und TTK auf die Expression apoptotischer Marker

10.4 Verzeichnis akademischer Lehrer

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bien, Bösner, Brehm, Buchholz, Burbelko, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del-Rey, Dettmeyer, Dietrich, Dinges, Dominguez, Donner-Banzhoff, Eggert, Eilers, Ellenrieder, Elsässer, Fendrich, Feuser, Freitag, Frink, Fuchs-Winkelmann, Funck, Geks, Görg, Gress, Gundermann, Hahn, Hegele, Hertl, Hofer, Höffken, Hoffmann, Hofmann, Hörle, Hoyer, Hundt, Jacob, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kanngießler, Käuser, Kill, Kirschbaum, Klose, Knorrenschild, Koczulla, Köhler, König, Koolmann, Kortus-Götze, Krämer, Kroh, Krüger, Kuhlmann, Kühne, Kühnert, Kunsch, Langer, Lemke, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Löser, Maier, Maisch, Maschuw, Maurer, Michl, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Renz, Richter, Rolfes, Rominger, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schlosser, Schmidt, Schneider, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Swaid, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Waldmann, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zentgraf, Zettl, Ziring

10.5 Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Th. M. Gress für die Möglichkeit, in seinem Institut für meine Doktorarbeit forschen zu dürfen.

Weiterhin gilt ein ganz besonderer Dank meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Malte Buchholz für das Thema meiner Doktorarbeit, seine großartige Hilfe bei allen Fragen und seine ständige Erreichbarkeit.

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Labors und meiner Arbeitsgruppe, besonders Harald Schmidt und Lisa Fiedler, die mir immer eine große Hilfe bei der Bedienung von Laborgeräten und beim Verständnis von Versuchsanleitungen waren.

Weiterhin danke ich meinen Eltern und meinem Ehemann, Benjamin Würzer, für ihre ständige Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

Danke!

10.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung der Kinasen IRAK1, TTK, SGK1, TBK1 und PRKDC im Pankreaskarzinom“ in der Klinik für Innere Medizin Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel unter Leitung von Prof. Dr. med. Th. M. Gress mit Unterstützung durch PD Dr. rer. nat. Malte Buchholz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den