

Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München

Klinik und Poliklinik für Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. Helmut Friess

Identifizierung von Neuroinvasion-fördernden Mutationen im Pankreaskarzinom mittels
PiggyBac-Transposon-Mutagenese

Pavel Stupakov

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

Vorsitzende: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan

2. Prof. Dr. Radu Roland Rad

Die Dissertation wurde am 30.04.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 01.12.2020 angenommen.

Teile der vorgelegten Dissertation wurden in der wissenschaftlichen Buchserie

Methods in Molecular Biology

unter folgendem Titel

„3D Cancer Migration Assay with Schwann Cells“

eingereicht und publiziert.

Abkürzungsverzeichnis

3D-Migration-Assay	dreidimensionales Migration-Assay
B	Back-Front
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cDNA	komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
CT	Computertomographie
CX3CL1	Fraktalkin (<i>CX3C chemokine ligand 1</i>)
CX3CR1	Fraktalkin-Rezeptor (<i>CX3C chemokine receptor 1</i>)
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Spinalganglien (<i>dorsal root ganglia</i>)
ECM	extrazellulärer Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ENI	Endoneural-Invasion
ERCP	endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie
EUS	endoskopischer Ultraschall
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FMI	<i>forward migration index</i>
FOXO1	<i>forkhead box protein O1</i>
GALNT2	N-acetylgalactosaminyltransferase 2
GNDF	<i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HGSC	<i>high-grade serous carcinoma</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LSB	<i>Laemmli sample buffer</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Migration-Front
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MP	<i>Plexus mesentericus</i>
NGF	Nervenwachstumsfaktors (<i>nerve growth factor</i>)
NI	neurale Invasion
NP	normales (gesundes) Pankreas
PB	<i>piggyBac</i>
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas
Pdx1-Cre	<i>pancreas-specific Cre driver</i>
PNI	Perineural-Invasion
QiSeq	<i>quantitative insertion-site sequencing</i>
QRT-PCR	<i>real-time LightCycler® quantitative polymerase chain reaction</i>
RIPA-Puffer	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SB	<i>Sleeping Beauty</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

sgRNA	<i>Single Guide RNA</i>
ST3GAL6	beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
sTn-Antigen	Sialil-Tn-Antigen
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>

Inhalt

1.	Einleitung	6
1.1	Das Pankreaskarzinom	6
1.2	Pankreatische Neuropathie und Schmerzen	9
	Neurale Invasion (NI) im Pankreaskarzinom (PDAC)	9
1.3	Transposon-vermittelte Mutagenese	14
2.	Das Ziel der vorliegenden Studie	17
3.	Material und Methoden	19
3.1.	Reagenzien	19
3.2.	Primer	23
3.3.	Geräte	24
3.4.	Software	25
3.5.	Mäuse, Zelllinien und PiggyBac-Transposon-System	25
3.6.	Dreidimensionales (3D-) Migration-Assay	27
3.7.	CRISPR-Cas9-basierte Herunterregulation <i>Galnt2</i> und <i>St3Gal6</i>	29
3.8.	Western Blot.....	31
3.9.	Real-Time LightCycler [®] Quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (QRT-PCR).....	33
3.10.	Patienten und Gewebe	33
3.11.	Immunhistologie.....	34
3.12.	Statistische Auswertung und Analyse	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Zellen mit mutierten <i>Galnt2</i> und <i>St3Gal6</i> sind spezifisch zu Spinalganglien der Maus im 3D-Migration Assay migriert	36
4.2.	Nach Herunterregulation von <i>Galnt2</i> und <i>St3Gal6</i> weisen murine Pankreaskarzinomzellen spezifische Neuroaffinitäten auf	43
4.3.	In humanen Pankreaskarzinomproben war <i>GALNT2</i> - und <i>ST3GAL6</i> -Verlust mit starker NI assoziiert	51
5.	Diskussion	55
6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	61
7.	Quellenverzeichnis	63
8.	Danksagung.....	79

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt die vierthäufigste Krebs-assoziierte Letalitätsursache in Deutschland dar, mit einer 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 9%. Männer und Frauen sind nahezu gleichhäufig betroffen mit 6,6 % bei Männern und 8,1 % bei Frauen. Im Laufe der Zeit, hat sich keine wesentliche Besserung in der Prognose des Pankreaskarzinoms gezeigt (Kaatsch P. et al., 2015; Siegel et al., 2012). In über 80% der Fälle handelt es sich um ein duktales Adenokarzinom (PDAC) des Pankreas (Morohoshi et al., 1983; Warshaw et al., 1992; Ghaneh et al., 2008). Dieses tritt vorwiegend im Pankreaskopf (65%), seltener im Korpus (15%), Schwanz (10 %) oder multifokal (10 %) auf (Ghaneh et al., 2008). Unabhängig von der Lokalisation wird das Pankreaskarzinoms häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Eine Lokalisation im Pankreaskopf führt im Vergleich zu anderen Lokalisation zu einer früheren Entstehung klinischer Symptome wie Schmerzen, Gelbsucht, oder obstruktive Pankreatitis und geht damit mit einer besseren Prognose einher (Ghaneh et al., 2008).

Als Risikofaktoren für das PDAC konnten Nikotinabusus (Fuchs et al., 1996, Coughlin et al., 2000, Becker et al., 2014), chronische Pankreatitiden, Fettleibigkeit, Diabetes (Becker et al., 2014) und Alkoholkonsum (Becker et al., 2014) identifiziert werden. Auch genetische Veränderungen sowie *BRCA2*-, *PALB2*- oder *p16*-Mutationen werden mit dem Pankreaskarzinom assoziiert (Becker et al., 2014).

Unter den nicht-invasiven Untersuchungsmethoden ist heutzutage die kontrastmittelunterstützte Computertomographie (CT) die Methode der Wahl (Nishiharu et al., 1999; Catalano et al., 2003; Minniti et al., 2003; Li et al., 2004; Ghaneh et al., 2008). Entscheidend hierfür ist sowohl seine Effektivität in der Erkennung des Pankreaskarzinoms (Catalano et al., 2003; Minniti et al., 2003), als auch die Entscheidungshilfe bezüglich der

möglichen Resektabilität des Tumors (Nishiharu et al., 1999; Catalano et al., 2003; Minniti et al., 2003; Phoa et al., 2005; Dewitt et al., 2006). Im Vergleich bietet die endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (ERCP) weniger Diagnostikmöglichkeiten (Nishiharu et al., 1999; Catalano et al., 2003; Minniti et al., 2003; Li et al., 2004; Ghaneh et al., 2008) und hat ihren Stellenwert heutzutage überwiegend in der Gewebegewinnung und Stent-Insertion (Ghaneh et al., 2008). Kleine und unzugängliche Tumore können im Rahmen dessen mit dem endoskopischen Ultraschall (EUS) diagnostiziert werden. Falls notwendig, kann der EUS die CT-Kontrastmitteluntersuchung komplementieren (Di Stasi et al., 1998; Gress et al., 2001; Agarwal et al., 2004; Dewitt et al., 2006). Der Tumormarker, das Carbohydrate-Antigen (CA) 19-9, hat eine Sensitivität von 79 % und ermöglicht eine Spezifität von 82 % bei Patienten mit einem PDAC (Warshaw et al., 1992; Goonetilleke et al., 2007; Ghaneh et al., 2008; Goh et al., 2017).

Ein Problem, das im Zusammenhang mit dem PDAC-Screening keine ausreichende Resonanz gefunden hat, ist die Assoziation zwischen PDAC und dem Auftreten von Diabetes mellitus. Diese Verbindung wurde vor allem in Studien aus den USA untersucht, in denen Forscher die Häufigkeit von Diabetes mellitus speziell in frühem PDAC untersucht haben. Laut ihren Beobachtungen können Patienten mit PDAC frühzeitig identifiziert werden, wenn jeder Patient mit einem neu diagnostizierten Diabetes Mellitus auch auf PDAC untersucht wird (Demir et al., 2015). Eine gute Prognose hängt von der Früherkennung und der vollständigen Entfernung des Tumors ab (Wagner et al., 2004; Riediger et al., 2006). Eine vollständige Resektion des Tumors ist die einzige Behandlungsmethode, die eine Aussicht auf Heilung verspricht (Shore et al. 2003). Für eine vollständige Entfernung ist es wichtig, dass die *Arteria mesenterica superior* sowie der *Plexus coeliacus* intakt bleiben und keine Fernmetastasen vorhanden sind (Alexakis et al., 2004; Li et al., 2004; Ghaneh et al., 2008; Loos et al., 2008). Auch wenn die *Arteria mesenterica superior* nicht intakt bleibt, ist der Eingriff möglich

(Alexakis et al., 2004; Tseng et al., 2004; Loos et al., 2008), allerdings mit einer höheren Morbidität und Mortalität assoziiert (Mollberg et al., 2011).

Das am häufigste verwendete operative Verfahren beim PDAC ist die partielle Pankreatikoduodenektomie nach Kausch-Whipple (Lin et al., 1999; Seiler et al., 2000; Tran et al., 2004; Seiler et al., 2005). Während der Operation muss der Tumor mit einem ausreichenden Abstand zum gesunden Gewebe entfernt werden, da eine vollständige Resektion des Tumors mit tumorfreien Absätzungsrändern (R0-Status) einer der wichtigsten Prognosefaktoren darstellt (Demir et al., 2015). Eine vollständiger Entfernung des Pankreas oder eine radikale Entfernung der Lymphknoten bei fortgeschrittenen metastasierten Pankreaskarzinomen verbessert die Prognose hingegen nicht. Zusätzlich ist eine radikale Operation mit einer erhöhten Morbiditätsrate verbunden (Pedrazzoli et al., 1998; Alexakis et al., 2004; Farnell et al., 2005).

Gegen Chemotherapeutika zeigt das PDAC eine hohe Resistenz (Shore et al., 2003). Jedoch konnte im Vergleich zu keiner Behandlung, sowohl für 5-Fluoruracil (5-FU) (Bakkevold et al. 1993) als auch für 5-FU-basierte Kombinationsschemata (Neoptolemos et al., 2003) ein besseres Outcome gezeigt werden. Es kann damit einen palliativen Therapieversuch unterstützen (Mallinson et al., 1980; Palmer et al., 1994). Ein wichtiger Durchbruch war die Erkenntnis, dass Gemcitabin die wichtigsten Symptome eines PDAC (Gewichtsverlust und Tumor-assoziierte Schmerzen) mäßigen und die Überlebensrate im Vergleich zu Bolus 5-FU durchaus verbessern kann (Burris et al., 1997). Im Jahr 2011 konnte gezeigt werden, dass in einer palliativer Situation eine Chemotherapie nach dem FOLFIRINOX ((**FOL**)säure, (**F**)luoruracil, (**IRI**)niotecan und (**OX**)aliplatin)-Schema im Vergleich zum Gemcitabine-Schema die Überlebensrate verbessern kann (Conroy et al., 2011; Ying et al., 2012). Bei inoperablen, fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen wird aktuell FOLFIRINOX oder eine kombinierte Chemotherapie mit Gemcitabine und nab-Paclitaxel zur Symptomlinderung verwendet.

Ein weiteres wichtiges Behandlungsziel stellt die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten dar. Die häufigsten Beschwerden sind Schmerzen, Gewichtsverlust und Stenosen/Okklusionen der Gallen- und Pankreaswege (bei Tumorlokalisierung im Pankreaskopf). Eine Linderung der Schmerzsymptomatik kann mit Opiate oder einer Blockades des *Plexus coeliacus* erreicht werden (Brown et al., 1987; Wong et al., 2004). Zur Linderung der Verschlüsse oder Verengungen der Gallen- und Pankreaswege wird eine ERCP mit Einlage eines Stents (Prat et al., 1998; Maire et al., 2006; Ghaneh et al., 2008) oder biliodigestive Anastomose (auch in Kombination mit Gastroenterostomie) empfohlen (Huser et al., 2009; Assfalg et al., 2011).

1.2 Pankreatische Neuropathie und Schmerzen

Das PDAC zeichnet sich durch prominente intrapancreatische neuropathische Veränderungen und damit einhergehenden abdominellen Schmerzen aus. Neuronale Veränderungen im PDAC werden typischerweise durch die intra- und extrapancreatische perineurale Invasion von Tumorzellen verursacht und werden in bis zu 100% der echten dukalen Adenokarzinome nachgewiesen (Nakao et al., 1996; Hirai et al., 2002; Liu et al., 2002; Ceyhan et al., 2009).

Neurale Invasion (NI) im Pankreaskarzinom (PDAC)

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurden die ersten NI von Tumorzellen beschrieben (Cruveilhier et al., 1835). Die ersten Versuche, eine pathomechanische Erklärung für die NI zu finden, gehen auf das Jahr 1905 zurück (Ernst, 1905). Hier brachte Ernst die perineurale Invasion mit dem Wachstum von Chondrosarkomzellen in perineuralen Lymphgefäßen in Verbindung (Ernst, 1905). In den frühen 1930er Jahren kam als alternative Grundtheorie die „Neurotropie“ auf. In diesem Zusammenhang wurde zunächst von Jentzer beschrieben, dass Tumorzellen Nerven als zusätzlichen Pfad für Invasion verwenden. Nach Jentzer kommt es nicht nur zu einem bloßen Eindringen von Tumorzellen ins Nervengewebe, sondern um eine Verbreitung der

Tumorzellen entlang der Nerven um entfernte Ziele zu erreichen (Jentzer, 1930). Aus diesem Grund betonte er, dass dieses Phänomen nicht „Neurophilie“, sondern „Neurotropismus“ genannt werden sollte (Jentzer, 1930). Da die nachfolgenden Studien die Anwesenheit von perineuralen Lymphgefäßen nicht beweisen konnten (Larson et al., 1966), ist die Theorie des Neurotropismus gegenwärtig die am weitesten verbreitete Erklärung für das Auftreten einer NI bei menschlichen Krebsarten, einschließlich PDAC, erhalten geblieben (Demir et al., 2010).

Die Untersuchungen von Dale Bockman haben dazu beigetragen, die Natur der NI besser verstehen zu können. Durch elektronenmikroskopische Untersuchung des Pankreas stellte er fest, dass Tumorzellen sich keineswegs auf das Perineurium beschränken, sondern tiefer in das Endoneurium eindringen und eine enge Beziehung zu endoneuralen Strukturen, einschließlich Axonen und Schwann-Zellen, herstellen können (Bockman et al., 1994). Bockman beschrieb 1994 den „neuronalen Schaden“. Hierbei wird das Perineurium unterbrochen, die Integrität des Nerven wird verzerrt, und durch das Eindringen von PDAC-Zellen bekommen die Axone ein stark ödematöses Aussehen (Bockman et al., 1994). Bockman war es auch, der die Schlüsselrolle des *transforming growth factor alpha* (TGF- α) in der NI identifizierte. Es zeigte sich, dass invidierte Nerven eine hohe Immunreaktivität für TGF- α aufwiesen. PDAC-Zellen zeigten wiederum eine hohe Expression des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), einem natürlichen Rezeptor für TGF- α . Folglich können die Nerven im PDAC eine Quelle der Wachstumsfaktoren für Tumorzellen sein. Dieses Konzept dominiert weiterhin und ebnete den Weg für weitere Studien (Demir et al., 2010). Außerdem rückte zunehmend die Korrelation zwischen der intrapancreatischen Expression des Nervenwachstumsfaktors (NGF) mit der Häufigkeit der perineuralen Invasion und dem Grad der Schmerzempfindlichkeit bei PDAC-Patienten in den Fokus der Forschung (Zhu et al., 1999). In zwei darauffolgenden Studien konnte ebenfalls der Zusammenhang zwischen einer erhöhter intrapancreatischen Expression von NGF und seinem Rezeptor TrkA mit vermehrten Bauch- oder Rückenschmerzen aufgezeigt werden (Zhang et al., 2005; Dang et al., 2006).

Wenn man über die NI im PDAC spricht, sollte man die anatomischen Eigenarten des Pankreas im Hinterkopf behalten. Der Pankreas ist ein retroperitoneal gelegenes Organ, das von mehreren neuralen Strukturen u.a. Plexus umgeben ist (Demir et al., 2010). Eine extrapancreatische neuronale Plexus-Invasion ist in etwa 80 % der Fälle anzutreffen und steht in Abhängigkeit zur Lokalisation des Tumors: Tumoren des Pankreaskopfes neigen dazu, in Richtung des *Plexus coeliacus* und entlang dem *Plexus hepaticus* zu wachsen (Nakao et al., 1996; Yi et al., 2003; Makino et al., 2008). Körper- und Schwanztumoren breiten sich ebenfalls in Richtung des *Plexus coeliacus* aus, sowie auf den *Plexus splenicus* (Nakao et al., 1996; Yi et al., 2003; Makino et al., 2008). Basierend auf diesen Beobachtungen haben die Autoren eine weitgehend radikale Chirurgie zur Verbesserung der Überlebenschancen befürwortet (Kayahara et al., 1995; Nakao et al. 1996; Yi et al., 2003). Während einige Studien bessere Überlebensraten für Patienten, die sich einer radikalen Resektion unterzogen, prognostizierten (Kayahara et al., 1995), ergaben andere Studien keine Verringerung der lokalen Rezidivraten und keine verbesserte Überlebenschance als Ergebnis dieses Verfahrens (Nakao et al., 2001; Levy et al., 2006).

In einer Studie von Kayahara et al. wurden die aufeinanderfolgenden Abschnitte chirurgisch resezierter PDAC-Proben untersucht, um den Mechanismus und die Art der Ausbreitung der NI besser verstehen zu können. Auf diese Weise konnten fünf Hauptmuster des Tumorzellwachstums entlang der Nerven identifiziert werden: eine direkte Invasion der Nerven, ein kontinuierliches Tumorzellenwachstum im perineuralen Raum, Verzweigung der wachsenden Tumormasse entlang neuraler Zweige, Bildung eines vordersten Wachstumskegels von Tumorzellen und eine direkte Invasion zusammenhängender Lymphknoten (Kayahara et al., 2007). Hiermit konnte bewiesen werden, dass die NI ein kontinuierliches Wachstum von PDAC-Zellen entlang der Nerven in Richtung des extrapancreatischen neuralen Plexus aufweisen. Hier ist allerdings zu beachten, dass die Prävalenz des kontinuierlichen Tumorzellwachstums entlang der Nerven nicht unbedingt als der einzige Mechanismus für die Ausbreitung der NI in ein

PDAC betrachtet werden sollte (Demir et al., 2010). Interessanterweise konnte in einer Studie gezeigt werden, dass in fast mehr als 50 % aller untersuchten PDAC-Proben NI auch im gesunden Pankreasgewebe angetroffen wurde (Takahashi et al., 1992; Takahashi et al., 1997).

Bei einer Untersuchung von insgesamt 546 Patienten mit verschiedenen Tumoren im Pankreasbereich zeigte sich, dass die Tumorzellen nicht nur ins Perineurium, sondern auch ins Endoneurium wachsen können (Ceyhan et al., 2009). Es wurde der Begriff der Perineural- (PNI) und Endoneural-Invasion (ENI) eingeführt. Die Studie hat weiterhin gezeigt, dass duktile Adenokarzinome die stärkste NI aufweisen. Außerdem hatten die Patienten mit einer ENI stärkere Schmerzen als Patienten mit PNI. Zudem zeigte sich, dass Nerven, die von Tumorzellen durchdrungen wurden, eine viel geringere Menge an sympathischen und cholinergen Nervenfasern enthielten (Ceyhan et al., 2009). Demir et al zeigte 2010, dass Gewebeextrakte eines PDAC und PDAC-Zell-Überstände in vivo ein axonales Wachstum, eine erhöhte Neuritendichte und eine perikaryonale Hypertrophie von Neuronen induzieren können (Demir et al., 2010). Die starke Verbindung zwischen pankreatischen neuroplastischen Veränderungen und Schmerzen bei Patienten mit PDAC weist auf einen „neuropathischen“ Mechanismus der Schmerzen im PDAC hin (Treede et al., 2008).

In der Studie von Marchesi wurde die Bedeutung des neuronaler Chemokins Fraktalkin (CX3CL1) in der neuralen Invasion im PDAC gezeigt. Dabei kam heraus, dass die neuronale Immunreaktivität für den Rezeptor von Fraktalkin (CX3CL1) signifikant höher ist als bei perineural invasiven Läsionen von PDAC. Insgesamt wurde bewiesen, dass der CX3CR1-Rezeptor für den PDAC-Neurotropismus eine Rolle spielt und als eigenständiger Risikofaktor für ein frühes lokales Rezidiv sein kann (Marchesi et al., 2008). Die Spinalganglien (dorsal root ganglia/DRG) von Mäusen mit Verlust von GDNF sind für Tumorzellen nicht attraktiv und die systemische Blockade des RET-Tyrosinkinase-Rezeptors, der ein Ziel für GDNF ist, kann NI zum Rückenmark und Lähmung bei Mäusen verhindern (Gil et al., 2010). Ein anderes GDNF-

Familienmitglied, nämlich Armin, hat eine ähnliche Wirkung, da es die Invasivität von PDAC-Zellen signifikant erhöht und in PDAC-Gewebe überexprimiert wurde (Ceyhan et al., 2006).

Das räumlichen und zeitlichen Eindringens von Tumorzellen in den Nerv wurde von Demir et al aufgezeigt (Demir et al., 2010). In diesem Versuch wurden PDAC-Zellen zusammen mit Ratten-DRG- oder *Plexus mesentericus* (MP)-Zellen in einem dreidimensionalen (3D) extrazellulären Matrix (ECM) -basierten Migrationstest kultiviert. Aufgrund einer anfänglichen physikalischen Trennung, erlaubt das Modell die genaue Darstellung der Reaktion jedes Zelltyps auf die Co-Kultur-Bedingungen. Weiterhin umfasst das Modell einen vordefinierten Migrationspfad für PDAC-Zellen (ECM-Brücken), der die Bildung eines Signalmolekülgradienten für jeden chemotaktischen Faktor sicherstellt. Dieses Modell ermöglicht es, die morphologischen Veränderungen der Tumorzellen und Neuronen sowie die spezifische Migration von Tumorzellen zu Neuronen zu untersuchen. In selbiger Studie konnten auch quantitative Veränderungen in der Expression von Neurotrophinen, in ihren Rezeptoren und den Mitgliedern der *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF)-Familie untersucht werden. Während die Mehrheit dieser Faktoren keine signifikanten Expressionsänderungen zeigte, stieg der Nervenwachstumsfaktor (NGF) während des gesamten Migrationsprozesses über 120 Stunden kontinuierlich an (Ceyhan et al., 2008). Das Experiment bestätigte die Bedeutung von NGF in der NI und demonstrierte die Anwendbarkeit des 3D-Migration Assays für funktionelle Untersuchungen der NI.

1.3 Transposon-vermittelte Mutagenese

Transposon-vermittelte Mutagenese bei Mäusen hat sich als ein bedeutendes Werkzeug für die Onkogen-Forschung herauskristallisiert. Sie ermöglicht die Identifizierung der Onkogenen und führenden genetischen Veränderungen, die Tumorgenese führen (Friedrich et al., 2017). Jahrzehnte herrschte eine Ungewissheit über Gene und Signalwege, die für die Tumorentstehung verantwortlich sind. Dies hat sich mit dem Aufkommen von Array-basierten Technologien und der Next-Generation-Sequenzierung deutlich verändert. Trotz dieser Fortschritte wird deutlich, dass die Medizin weit davon entfernt ist, die Komplexität molekularer Prozesse, die die Tumorentstehung vorantreiben, zu verstehen. Ein *in vivo* Screening der Onkogene in der Maus hat sich als ein attraktiver Lösungsansatz hierfür herausgestellt. Es basiert auf einer zufälligen Mutagenese vieler Zellen eines Organismus, einer nachfolgenden klonalen Expansion und einer neoplastischen Transformation von Zellen, die krebserregende Mutationen in sich tragen. Die Wiederherstellung der Mutationen im daraus resultierenden Tumor ermöglicht dann die Entdeckung neuer Onkogene (Friedrich et al., 2017).

Vor der Entdeckung der Transposon-vermittelten Mutagenese wurden andere Methoden wie die chemische- und Strahlungsmutagenese, sowie die retrovirale Insertionsmutagenese verwendet. Nachteil der chemischen- oder Strahlungsmutagenese war hohe Hintergrundmutationsrate (Friedrich et al., 2017). Ein chemischer oder strahlenbasierter Mutageneseansatz besitzt aber auch einige Merkmale, die komplementär zur Insertionsmutagenese sind. Beispiele sind die Neigung zu spezifischen Mutationen in Abhängigkeit vom Mutagen, oder die Möglichkeit, Mutationstypen zu induzieren, die nicht durch Insertionsmutagenese modelliert werden können. Retrovirale Ansätze wurden bisher sehr erfolgreich als Werkzeug für die Onkogen-Entdeckung verwendet (Kool et al. 2009). Die universelle Anwendbarkeit der retroviralen Insertionsmutagenese wird einerseits dadurch limitiert, dass Retroviren auf der einen Seite Tropismen für hämatopoetische oder

Mammagewebe aufweisen. Im Gegensatz dazu kann die Transposonmutagenese in jedem Mausgewebe aktiviert werden (Friedrich et al., 2017). Auf der anderen Seite ist die Menge an Genen, die bei Retroviren verwendet werden können, aufgrund ihrer bevorzugten Integration „upstream“ von aktiv transkribierten Genen, begrenzt (Mitchell et al., 2004; Derse et al., 2007). Drittens können die in den retroviralen *long terminal repeats* (LTRs) enthaltenen Enhancer Gene über eine Distanz von mehreren hundert Kilobasen deregulieren (Neil et al., 2002).

Die Mutagenese mit Hilfe von Transposons ermöglicht eine genetische Untersuchung ohne die oben genannten Beschränkungen. Transposonen sind genetische Elemente, die ihre Positionen innerhalb des Genoms verändern können. Bei wirbellosen Lebewesen werden seit langem transponierbare Elemente für die Insertionsmutagenese verwendet (St. Johnston 2002; Thibault et al., 2004; Bessereau, 2006). In weiterentwickelten Organismen wurden Transposons vor Millionen Jahren deaktiviert. 1997 konnte das Tc1/Mariner-Typ Transposon „*Sleeping Beauty*“ (SB) erstmalig aus einem Fisch rekonstruiert werden (Ivics et al., 1997). Das Transposon-System „*piggyBac*“ (PB) wurde aus der Aschgraue Höckereule (*Trichoplusia ni*) rekonstruiert und konnte später in Säugetieren übertragen werden (Cary et al., 1989; Ding et al., 2005; Rad et al., 2010; Rad et al., 2015; Friedrich et al., 2017). PB und SB haben verschiedene Eigenschaften, Integrations-Präferenzen, Frachtkapazitäten und lokale Hopping-Tendenzen (Ding et al., 2005; Wang et al., 2008; Ivics et al., 2009; Liang et al., 2009; Li et al., 2011; Li et al., 2013). *PiggyBac* unterscheidet sich von *Sleeping Beauty* in mehrfacher Hinsicht, einschließlich seiner Fähigkeit, viel größere DNA-Fragmente zu bewegen, wodurch komplexe Transgene in das Transposon eingebaut werden können. Es hat auch eine schwächere Tendenz zum lokalen Hopping, was eine nützliche Eigenschaft für die genomweite Mutagenese darstellt (Ding et al., 2005; Wang et al., 2008; Ivics et al., 2009; Liang et al., 2009; Rad et al., 2015). Zudem hat es die Fähigkeit zu transponieren ohne Footprint-Mutationen zu erstellen und weist eine andere Integrationspräferenz auf (Ding et al., 2005; Wang et al., 2008; Ivics et al., 2009; Liang et al., 2009; Rad et al., 2015).

Die potenziellen Untersuchungsmöglichkeiten für das *piggyBac*-System sind umfangreich und beinhalten Entwicklungsprozess, Tumorentwicklung, Metastasen, Screening für Wirkungsmechanismen der Medikamenten, NI und vieles mehr. Die Möglichkeit, Tumor-Subtypen zu induzieren um histologische oder genetische Tumor-Subentitäten zu erhalten, bieten neue Möglichkeiten für tiefgehende molekulare Studien (Rad et al., 2015).

In der Natur kodieren DNA-Transposons eine Transposase innerhalb ihrer eigenen Sequenz, die als Erkennungsstelle für die Transposition dient (Friedrich et al., 2017). Durch das Ersetzen des Transposase-Gens erhält man eine Möglichkeit DNA-Transpositionen zu kontrollieren und in dem Molekularmechanismus zu nutzen (Ivics et al., 2009).

In zwei Studien von Roland Rad wurden die Möglichkeiten der Mutagenese des PB- und des SB-Systems aufgezeigt. In der ersten Studie wurden 63 hämatopoetische Tumore mit Hilfe von diesen zwei Transposon-Systemen erforscht (Rad et al., 2010). Hier konnte gezeigt werden, dass eine Transposon-Mutagenese eine konstitutive, gewebespezifische und zeitlich kontrollierte somatische Mutagenese induzieren kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PB auch allein verwendet werden kann. In der folgenden Studie wurde PB, sowie der pankreasspezifische Promotor *Pdx1-Cre*, ATP-Transposons und *Kras*-Mutagenese verwendet um die pankreasspezifische Mutagenese und die Tumorentstehung zu induzieren (Rad et al., 2015). Beide Studien zeigten somit die Bedeutung der PB-Mutagenese in der Pankreasforschung. Untersuchungen der Phänotypen der Mäuse im simultanen Vergleich mit den Transposon-Insertionsstellen, bieten neue Ansatzmöglichkeiten zur Entdeckungen neuer Gene, die eine Rolle bei der Untersuchung und Behandlung von Pankreaskarzinomen spielen können.

2. Das Ziel der vorliegenden Studie

Das Pankreaskarzinom weist ausgesprochen häufig eine nervale Invasion auf, die mit deutlich verschlechterter Gesamtüberlebensrate, erhöhter Lokalrezidivrate und neuropathischen Schmerzen bei PDAC-Patienten assoziiert sind. Einer der Hauptmechanismen für die Entstehung der NI ist die spezifische Affinität von Tumorzellen zu Neuronen, die mit Hilfe eines dreidimensionalen Migrationsassays reproduziert werden können. Dieses Assay ermöglicht die quantitative Erfassung der Neuroaffinität von PDAC-Zellen unter digitaler Time-Lapse-Mikroskopie. Die Mutationen und die genomischen Veränderungen, die NI prädisponieren, sind jedoch bis dato unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war im Rahmen genetischer Screenings durch Transposon-vermittelte Mutagenese neue nervale Invasion-assoziierte Genloci im PDAC zu identifizieren und diese auf ihre funktionelle Relevanz hin zu analysieren.

Folgende Schritte wurden hierbei durchgeführt:

- 1) Isoliert wurde eine genetisch vorcharakterisierte Gruppe von 22 unterschiedlichen murinen PDAC-Zelllinien. Diese wurde durch eine Kombination von *Kras*- und die PiggyBac-Transposon-vermittelte Mutagenese erstellt.
- 2) Anschließend erfolgte die Untersuchung auf Neuroaffinität im 3D-Migrationsassay. Dabei wurden die vermutlich Neuroinvasion-fördernden genetischen Veränderungen durch Vergleiche der Neuroaffinität der Zellen mit der bereits vorliegenden Datenbank der Transposon-Insertionsstellen identifiziert.
- 3) Die Expression dieser Gene wurde herunterreguliert.
- 4) Es erfolgte erneute Testung der Zelllinien auf ihre Neuroaffinität im 3D-Migrationsassay.
- 5) Kontrolle der Rolle der identifizierten Genen in NI mittels Vergleich dieser Ergebnisse mit den initial durchgeführten 3D-Migrationsassay aus Schritt 2.

- 6) Überprüfen der Expression von identifizierten Genen durch qRT-PCR und Immunhistochemie in den bereits vorhandenen Proben eines PDAC-Patientenkollektivs mit hoher und schwacher NI.

3. Material und Methoden

3.1. Reagenzien

Folgende Reagenzien, hier in alphabetischer Reihenfolge aufgezählt, wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

10 % Normal Goat Serum, 50062Z, Life Technologies, Thermo Scientific (Waltham, USA)

2-Mercaptoethanol, M3148, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

2-Propanol, 6752.1, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

6-Aminocaprinsäure ≥ 98.5 % (NT), 07260, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Ammonium persulfate, A3678, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Amphotericin B 250 $\mu\text{g/ml}$, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Ampicillin, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Anti-GALNT2 antibody produced in rabbit, HPA011222-100UL, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Anti-Kaninchen-HRP-Antikörper, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Anti-Rabbit-Antikörper, A1416, Santa Cruz (Dallas, USA)

Anti-ST3GAL6 antibody produced in rabbit, HPA018792-100UL, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Anti-ST3GAL6 antibody produced in rabbit, SAB3500045-100UG, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Aqua destillata, Braun (Melsung, Deutschland)

ATP, R0441, Thermo Scientific (Waltham, USA)

B-27™ Supplement, 17504044, Gibco, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Bbs1-HF, R3539L, BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

Chloroform, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Collagenase, Type 2, LS004176, Worthington biochemical corporation (Lakewood, USA)

cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, 04693159001, Roche, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Dimethyl sulfoxide, 276855-100ml, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

DTT, 10 mM, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D8537, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D6046, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

ECL-anti-mouse IgG-Antikörper, NA931V, GE Healthcare UK Limited (Little Chalfont, UK)

ECM Gel, E1270, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

EnVision + System-HRP labelled polymer anti-rabbit, K4003, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Ethanol, Merck (Darmstadt, Deutschland)

Fetal Bovine Serum, F2442, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

GAPDH-Antikörper, sc-25778, Santa Cruz (Dallas, USA)

Glycin, 3908.3, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Hank's BSS (1x), H15-010, PAA (Pasching, Österreich)

Hämatoxylin, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

HCl, Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland)

HEPES buffer solution, 83264, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 00534239, Applied Biosystems by Thermo Scientific (Waltham, USA)

Immobilon®-P Polyvinylidene difluoride membranes, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Isolate II Plasmid Mini Kit, BIO-52056, Bioline (London, UK)

KAPA SYBR® for Light Cycler® 480, KK4610, Roche (Mannheim, Deutschland)

LB-Agar (Lennox), X965.1, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

LB-Medium (Luria/Miller), X968.1, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Lipofectamine™ LTX Reagent with PLUS™ Reagent, 15338100, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)

Methanol, 4627.5, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Milchpulver, T145.4, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Minimum Essential Medium Eagle, M7278, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Natriumchlorid, 3957.2, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Neurobasal™ Medium, 21103049, Gibco, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Nuclease-Free Water, AM9937, Ambion, Thermo Scientific (Waltham, USA)

NucleoBond® Xtra Combi Rack, REF 740415, Macherey-Nagel GmbH (Düren, Deutschland)

One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent *E. coli*, C7373-03, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Opti-MEM™, 31985062, Gibco, Thermo Scientific (Waltham, USA)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 26616, Thermo Scientific (Waltham, USA)

PBS Dulbecco, 0192F, Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)

Penicillin – Streptomycin, p0781, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

PhosSTOP™, 000000004906845001, Roche, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225, Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)

Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate, 32132, Thermo Scientific (Waltham, USA)

Plasmid pSPDACs9(BB)-2A-Puro, Zhang Lab (Michigan, USA)

Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase, E3101K, Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)

Plasmid-Safe™ Puffer 10x, Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)

Puromycin dihydrochloride from Streptomyces alboniger, P8833, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

QIAamp® DNA Mini Kit (50), 51304, QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)

RIPA Buffer, R0278, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

RNeasy® Plus Mini Kit (250), 74136, QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)

Roticlear®, A538.1, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Rotiphorese® Gel 30, 3029.1, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

RQ1 DNase 10X Reaction Buffer, M610A, Promega Corporation (Madison, USA)

RQ1 DNase Stop Solution, M199A, Promega Corporation (Madison, USA)

RQ1 RNase-Free DNase, M198A, Promega Corporation (Madison, USA)

S.O.C. Medium, 1855308, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

SDS, ultra pure, 2326.3, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

β-actin-Antikörper, sc-69879, Santa Cruz (Dallas, USA)

T4 DNA Ligase Reaction Buffer, B0202S, BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

T4 Polynucleotide Kinase, M0201S, BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

T7 DNA Ligase, M0318S, BioLabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

Tango Buffer (10X), Thermo Scientific (Waltham, USA)

TEMED, 2367.3, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Triton™ X-100, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Trizma® base, T1503, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Trizol Reagent, Ambion, Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Trypan blue, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Trypsin-EDTA solution, T3924, Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Tween® 20, 9127, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Wasserstoffperoxid 30%, 9681.1, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.2. Primer

Folgende Primer, hier in alphabetischer Reihenfolge aufgezählt, wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- guideRNA-Primer für CRISPR-Cas9 gegen *Galnt2*: Guide 96
 - 5'- CACCgCGCCTACTACATGTA^TCTCGG -3'
 - 5'- AAACCCGAGTACATGTAGTAGGCGc -3'
- guideRNA-Primer für CRISPR-Cas9 gegen *Galnt2*: Guide 97
 - 5'- CACCgTCGCCTACTACATGTA^TCTCG -3'
 - 5'- AAACCGAGTACATGTAGTAGGCGAc -3'
- guideRNA-Primer für CRISPR-Cas9 gegen *St3Gal6*: Guide 70
 - 5'- CACCGTACTATACTGTATACTGTG -3'
 - 5'- AAACCACAGTATACAGTATAGTAC -3'
- guideRNA-Primer für CRISPR-Cas9 gegen *St3Gal6*: Guide 86
 - 5'- CACCgCTCAGAAGATTGGCGAAAGC -3'
 - 5'- AAACGCTTTCGCCAATCTTCTGAGc -3'
- Primer für qRT-PCR gegen β -Aktin:
 - Forward 5'- CCGCGAGAAGATGACCCAG-3'
 - Reverse 5'- CCAGTGGTACGGCCAGAGG-3'
- Primer für qRT-PCR gegen *Galnt2* (Maus):
 - Forward 5'- CTGGACACCTTGGGACACTT-3'
 - Reverse 5'- TGCTTCACCGACTTCTCCTT-3'
- Primer für qRT-PCR gegen *St3Gal6* (Maus):
 - Forward 5'- AAGCCAGCTTTCGCCAAT-3'
 - Reverse 5'- AGCTCTGCACAGAAATGGGTA-3'

- U6 Primer:
 - Forward 5'- GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'

3.3. Geräte

Folgende Geräte, hier in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet, wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Gerät zum Mischen der Lösungen: Yellow line (Leipzig, Deutschland)

Inkubator: Eppendorf New Brunswick Galaxy 170 S (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Keyence Biorevo BZ-9000 System (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland)

Mikroskop mit Inkubator und Kammer für Time-Lapse-Microscopy: Zeiss AxioVision (Oberkochen, Deutschland)

Mikroskop: Zeiss PrimoVert (Oberkochen, Deutschland)

Mikrowelle: Siemens (München, Deutschland)

Nanodrop: Nanodrop 2000, Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland)

Pannoramic MIDI Slide Scanner (Budapest, Ungarn)

PCR Maschine: Mastercycler, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

pH-Messgerät: Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

Real-Time LightCycler[®] 480, Roche (Basel, Schweiz)

Sartorius Dismembrator S (Göttingen, Deutschland)

Stromgerät für Western-Blot: Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

Vortexer: IKA Works, INC., MS 1 Minishaker (Wilmington, USA)

Waage: Kern EW (Balingen, Deutschland)

Waage: Sartorius analytic (Göttingen, Deutschland)

Western-Blot-Geräte: Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

Zentrifuge: Centrifuge 5415 R, Centrifuge 5424 R und Centrifuge 5810 R, Eppendorf
(Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

3.4. Software

Folgende Software, hier in alphabetischer Ordnung aufgelistet, wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

AxioVision SE64 Rel. 4.9

CaseViewer 2.2

Chemotaxis-Tool 1.2.

GraphPad Prism 5

ImageJ 1.4.3.67

LightCycler[®] 480 SW 1.5

Microsoft Office Excel 2007

Microsoft Office Word 2007

3.5. Mäuse, Zelllinien und PiggyBac-Transposon-System

Für das Projekt wurden Tumorzelllinien von den *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mäusen und Spinalganglien von C57BL/6-Mäusen verwendet. Die Tumorzellen wurden in einem Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 1000mg/L Glukose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B kultiviert. Für das Splitten wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 10ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline gewaschen. Danach wurde dieses entfernt und die Zellen mit 1ml Trypsin-EDTA 5 Minuten bei 37°C in einer feuchten und einer 5%igen CO₂ gesättigten Atmosphäre inkubiert. Nach weiteren 5 Minuten wurde Trypsin-EDTA mit 9ml Medium gestoppt. Die Zellen mit dem Medium und Trypsin-EDTA wurden in einem 50ml-Tube gesammelt. Die Proben wurden 5 Minuten bei

1500rpm und 4°C zentrifugiert. Das alte Medium mit Trypsin wurde wiederum abgesaugt und die Zellen mit 10ml frischem Medium resuspendiert.

Zu Beginn wurden zwei Arten von Mäusen – „Transposon-Mäuse“ und „Transposase-Mäuse“ – entwickelt (Rad et al., 2010; Rad et al., 2015). Die Fähigkeit, beide Komponenten unabhängig manipulieren zu können, schafft Flexibilität und Vielseitigkeit. Alle Transposons besaßen PB- und SB-invertierte terminale Repeats (ITRs), die die Mobilisierung mit Transposase ermöglichten. Die zwischen den ITRs eingeführten genetischen Elemente wurden so ausgewählt, dass sie sowohl Verlust als auch Gewinnung der Genfunktion abhängig von der Transposon-Orientierung und ihrer Position initiieren konnten. Der Verlust der Genfunktion konnte durch Transposon-Insertionen in Exons erreicht werden, was zu Frameshift oder vorzeitiger Beendigung führte. Da sich intragenische Insertionen in der Regel in Introns befinden – wegen der größeren Größe von Introns im Vergleich zu Exons, wurden Transposons so vorbereitet, dass sie auch Gen-Trapping-Funktionen hatten. Zu diesem Zweck wurden zwei Spleißakzeptoren und bidirektionale Polyadenylierungssignale in die Transposons eingeführt, wobei die Genunterbrechung intronischer Positionen unabhängig von der Orientierung des Transposons vermittelt wurde. Die ATP-Transposons enthielten zudem Promotor- und Splice-Donor-Sequenzen (Cytomegalovirus Enhancer und Hühner- β -Actin-Promotor [CAG]) zwischen den ITRs, die die Aktivierung der Genexpression bei der Insertion vor einer Gen-Translationsstartstelle induzieren konnten. Für gewebespezifische Aktivierung des Systems wurden *Rosa26^{LSL-PB}* Knock-in Mäuse vorbereitet, die PB-Transposase (Cre-/LoxP-abhängig) unter der Kontrolle des Rosa26-Promotors konditional exprimiert haben. In diesem Fall wurde Cre unter Kontrolle des pankreasspezifischen Promoters *Pdx1-cre* verwendet. Somit standen für das Projekt 22 Mäuse zur Verfügung. Da die Bauchspeicheldrüse ein schwach proliferierendes Organ ist, reicht die Transposon-Mutagenese allein nicht aus, um eine Tumorgenese zu induzieren. Die *Kras^{G12D}*-Mutation beschleunigt jedoch deutlich die Entwicklung des PDAC. Jede Maus besaß eine *Kras^{G12D}*-Mutation als Grundmutation, die die Tumorgenese im Pankreas

förderte, sowie verschiedene weitere Mutationen dank PB-Mutagenese. Um den Phänotyp zu bestimmen, der die spezifische Migration von Tumorzellen zu DRG und somit die NI im hier angewendeten 3D-Migrationsmodell fördert, wurden aus 22 Mäusen Tumorzellen isoliert und analysiert. Die Tumorzellen stammen aus der Nature genetics 2015 Arbeit (Rad et al., 2010; Rad et al., 2015) und wurden von den Kollegen der Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. Roland Rad übernommen.

Die Spinalganglien wurden aus neugeborenen C57BL/6-Mäusen zwischen dem ersten und vierzehnten postnatalen Tag durch Dekapitation und anteriorer Laminektomie aus der zervikalen/lumbalen Region isoliert. Nach der Isolation wurden die peripheren und zentralen Projektionen unter dem Mikroskop entfernt. DRG wurden daraufhin in eiskaltem *Minimal Essential Medium* (MEM) gesammelt. Dann wurde das Medium entfernt und DRG im *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) mit Collagenase Typ II (1 mg/ml) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die DRG wurden durch Spritzen mit abnehmendem Durchmesser zerrieben. Die Suspension wurde bei 93,9 xg für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und das alte Medium wurde aspiriert. Zum Schluss wurde DRG direkt im 100ul ECM-Gel resuspendiert, um als attraktives Element für Tumorzellen im 3D-Migration Assay verwendet werden zu können.

3.6. Dreidimensionales (3D-) Migration-Assay

Die Neuroaffinität von Tumorzellen wurde im 3D-Migration Assay ausgewertet. Der 3D-Migrationsassay mit DRG ist ein spezielles Co-Kultivierungssystem, das die Modellierung der neuronalen Invasion ermöglicht (Fangmann et al., 2018). Pankreastumorzellen und DRG-Neuronen werden hierzu gleichzeitig 48 Stunden lang kultiviert und dann für 24 Stunden fotodokumentiert, um Migrationsverhalten, Zellinteraktion und morphologische Veränderungen zu beobachten.

In einem Versuch wurde jeweils eine Zelllinie getestet. Nach dem Waschen mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* wurden die Zellen gesplittet und in einer Zählkammer mit Trypan blue gezählt. Anschließend wurde die erforderliche Menge der Zelllösungen nochmals zentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und die Zellen im ECM-Gel resuspendiert. Für einen Tropfen wurden 25µl ECM-Gel und 100.000 Zellen verwendet. In die Mitte einer 35mm-Petrischale wurde ein ECM-Geltropfen, mit enthaltender PDAC-Zellsuspension pipettiert. Mit Hilfe eines Millimetermaßstabs wurde im Abstand von 1mm zur Rechten des ersten Tropfen ein ECM-Geltropfen, der die DRG enthielt, angebracht. Um unspezifische zelluläre Interaktionen ausschließen zu können, wurde ein zusätzlicher zellfreier ECM-Gel-Tropfen in einem Abstand von 1 mm auf die linke Seite des ECM-Tropfens mit PDAC-Zellen pipettiert. Insgesamt wurden drei 35 mm-Petrischalen mit der gleichen Zelllinie vorbereitet. Alle drei Petrischalen wurden 10 Minuten bei 37 °C in einer feuchten, 5 % CO₂ gesättigten Atmosphäre inkubiert. Um eine Migration zu ermöglichen, wurden alle drei ECM-Gel-Tropfen durch 3µl ECM-Gelbrücke miteinander verbunden. So konnte ein chemoattraktiver Gradient hergestellt werden. Um die Polymerisation des ECM-Gels zu ermöglichen wurden anschließend alle drei Petrischalen weitere 15 Minuten bei 37 °C in einer feuchten, 5 % CO₂ gesättigten Atmosphäre inkubiert. Zum Schluss wurde jede Petrischale um ein 2 ml Medium (Neurobasal Medium, ein B-27-Supplement, 0,5 mM L-Glutatmin, 10% FCS) ergänzt und der Assay 48 Stunden lang bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre in 5 % CO₂ inkubiert. Zur ionischen Stabilisierung wurde zu dem Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit eine 50 µl HEPES-Pufferlösung (25µl pro ml) gegeben. Der Assay wurde anschließend unter dem Mikroskop mit Inkubator und Kammer für Time-Lapse-Microscopy für 24 Stunden gestellt und lang alle 15 Minuten abfotografiert. Jeder Versuch wurde drei Mal wiederholt.

Die Bilder des Migrationassay wurden mit Hilfe des AxioVision SE64 Rel in das JPG-Format exportiert und anschließend mit dem ImageJ Software (Version 1.4.3.67, NIH, USA) ausgewertet. Dabei erfolgte die manuelle Auswertung der Strecke der einzelnen Zellen. Pro

Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Das Manual-Tracking generierte numerische Daten, die mit Hilfe des Chemotaxis-Tools (Ibidi, München, Deutschland) in morphometrische Parameter umgewandelt wurden. Die *Euclidean Distance* (μm) zeigte den kürzesten Abstand zwischen der ersten und der letzten Zellposition an, das *Velocity* ($\mu\text{m}/\text{Min}$) dagegen die Geschwindigkeit der Zellmigration. Der *Forward-Migration-Index* (FMI) entspricht dem Verhältnis der euklidischen Distanz zur gesamten akkumulierten Migrationsdistanz einer Zelle. Daher zeigt die Erhöhung des FMI eine gezieltere Migration auf. Die FMI-Werte der 90 Zellen wurden in GraphPad Prism 5 eingetragen und statistisch ausgewertet.

3.7. CRISPR-Cas9-basierte Herunterregulation *Galnt2* und *St3Gal6*

Die Herunterregulation von *Galnt2* und *St3Gal6* erfolgte mit Hilfe des CRISPR-Cas9-Systems. Dabei wurde das Protokoll „Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system“ (Ran et al., 2013) eingehalten. Die sgRNA wurde in den pSPDACs9(BB)-Vektor zur Koexpression mit Cas9 kloniert. Das Produkt wurde im destillierten Wasser im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die sgRNA-Oligos wurden in pSPDACs9(BB) kloniert. Das Produkt der Ligationreaktion wurde mit PlasmidSafe-Exonuclease behandelt, um die verbleibende linearisierte DNA verdauen zu können. Für jedes Gen (*Galnt2* und *St3Gal6*) wurden zwei sgRNA verwendet. Hier entstanden zum einen zwei Plasmide für *Galnt2* (G96 und G97) sowie zwei Plasmide für *St3Gal6* (G70 und G86). Im Folgenden wurden die Plasmide in Stbl3 E.coli kloniert. Die Bakterien wurden im LB-Agar mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Am Tag nach der Inkubation konnten mehrere Kolonien auf jeder Platte verzeichnet werden. Zwei dieser Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aus jeder Platte extrahiert und über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im sterilen LB-Medium mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin inkubiert und geschüttelt. Am nächsten Tag konnte mit Hilfe von NucleoBond[®] Xtra Combi Rack die Plasmid-

DNA gemäß den Anweisungen des Herstellers aus den Kulturen isoliert werden. Die Menge der DNA-Plasmide konnte mit dem NanoDrop gemessen werden. Weiter erfolgte eine Sequenzierung bei Eurofins Genomics vom U6-Promotor mit dem U6-Fwd-Primer.

Zudem konnte eine Transfektion der Pankreaskarzinomzellen durchgeführt werden. Am ersten Tag wurden hierzu die Tumorzellen auf 6-Wellplatten gesetzt um ein 70%iges Konfluenz zu erreichen. Am zweiten Tag wurden dann die Zellen mit Hilfe von Lipofectamine[®] LTX & PLUS[™] Reagent transfektiert. Es erfolgte die Selektion der transfektierten Zellen mittels Behandlung mit Puromycin (2 ml frischem Medium und 250 µg Puromycin). Die minimale Menge von Puromycin, die zu 100 % nicht-transfizierte Zellen nach 48 Stunden abtötet, wurde zuvor auf 6-Wellplatten mit verschiedenen Konzentrationen von Puromycin getestet. Bei allen Zelllinien, die für die Transfektion verwendet wurden, stellte sich die 250 µg Puromycin im 2 ml Medium als geringste Menge dar. Die Zellen wurden 48 Stunden lang mit Puromycin bei 37 °C in einer feuchten, mit 5 % CO₂ gesättigten Atmosphäre inkubiert. Anschließend lag die Konfluenz bei den verschiedenen Zelllinien zwischen 20 % und 50 %. Nach dem Medium-Wechsel konnten die Zellen bei 37 °C in einer feuchten, mit 5 % CO₂ gesättigten Atmosphäre inkubiert werden, bis die Konfluenz ca. 80–90 % betrug. Nun wurden die Zellen für den Western Blot lysiert, um die Herunterregulation zu prüfen, und für das Migrationassay eingefroren.

Die Zellen wurden im *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* mit 20 % *Fetal Bovine Serum* und 10 % Dimethyl eingefroren. In einem Einfrierröhrchen befanden sich 1 Million Zellen in einem Milliliter Medium. Die Röhrchen wurden bei -80 °C eingefroren und nach 48 Stunden bei -150 °C gelagert. Für das Auftauen wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff aus dem Kühlschrank ins Labor transportiert, um dort in einer Wanne mit warmem Wasser aufzutauen und zu kultivieren.

3.8. Western Blot

Die *Galnt2*- und *St3Gal6*-Herrunterregulation wurde durch die Proteinmenge in den Zellen im Western Blot kontrolliert. Zellen mit einer Konfluenz von ca. 90 % in der 6-Wellplatte wurden mit 200 µl RIPA-Puffer lysiert. Die Proteinbestimmung wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit laut dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Spektralphotometrie ermöglichte die Bestimmung der Proteinmenge.

Für das Gel wurde eine Gelkammer zusammengebaut und ein 10 %-Trenngel vorbereitet. Um 20 ml zu erhalten, konnte 6,7 ml Rotiphorese®-Gel, 5 ml 4x LowerTris-Puffer, 8,1 ml destilliertes Wasser, 10 µl TEMED und 225 µl 10-prozentiges Ammonium persulfate pipettiert und gemischt werden. Auffüllung der Gelkammer bis zu ca. 2/3 der Füllmenge mit der Lösung für das Trenngel. Überschichtung und Aushärtung in der Gelkammer mit 2-Propanol. Aushärtung des Gels und Entfernung des 2-Propanol. Vorbereitung des 4-prozentigen Sammelgels. Für das Ergebnis von 20 ml wurden hier 2,7 ml Rotiphorese®-Gel, 5 ml 4x UpperTris-Puffer, 12,4 ml destilliertes Wasser, 40 µl TEMED und 60 µl 10-prozentiges Ammonium persulfate pipettiert und gemischt. Diese Lösung für das Sammelgel füllte den Rest der Gelkammer, woraufhin der Kamm eingesetzt wurde. Nach Aushärtung des Sammelgels, wurde die Kammer in eine Laufpuffer gefüllte Wanne gesetzt. Es erfolgte anschließend das vorsichtige ziehen des Kammes. Die Proben wurden im Wasser so verdünnt, dass es in 42 µl Lösung 20 µg Protein gab. Zugabe von 8 µl 6xLSB in jede 42 µl-Probe. Die Proben wurden 5 Minuten lang bei 95 °C inkubiert und geschüttelt. Daraufhin konnte die Proben 3 Minuten im Eis abgekühlt und mit den Proben das Gel geladen werden. In die erste Geltasche wurden 10 µl *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* pipettiert. Leere Taschen wurden mit 8 µl 6xLSB und 42 µl Wasser aufgefüllt. Dann wurde der Deckel auf die Wanne gesetzt und der Strom mit 30V, 25mA für 120 Minuten gestartet. Nach dieser Zeit konnte das Gel vorsichtig aus der Gelkammer herausgelöst werden und glitt dann im Kathodenpuffer. Für den Blot wurden Whatman-

Papierstücke vorbereitet und in den Puffer gelegt. Die Polyvinylidenedifluoridmembrane wurden auf Gelgröße zugeschnitten, in 100-prozentiger Ethanol äquilibriert und in den Anodenpuffer II gelegt. Vorbereitung der folgenden Blotstapel in einer Blotkammer: 6 Whatman aus Anodenpuffer I, 3 Whatman aus Anodenpuffer II, Membrane aus Anodenpuffer II und Gel sowie 6 Whatman aus dem Kathodenpuffer. Verschließen der Blotkammer und Anschließend des Strom mit 120 V, 60 mA für eine Stunde.

Nach dem Blot konnte die Membran vorsichtig in ein 50ml-Falcon-Tub mit 10ml 5-prozentiger Milch/PBST gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur auf Rollen inkubiert werden. Nach einer Stunde konnte zu der 10 ml 5-prozentiger Milch/PBST im Röhrchen der primäre Antikörper, in der vom Hersteller empfohlenen Menge, zugegeben werden. Inkubation des Röhrchen bei 4 °C auf einer Rolle über Nacht. Gleichzeitig wurden immer zwei gleiche Gele mit denselben Proben vorbereitet, somit konnten bei diesem Schritt parallel 2 Membranen untersucht werden: eine Membran wurde entweder mit GALNT2- oder St3Gal6-Antikörpern und die zweite mit dem Housekeeping (GAPDH-Antikörper oder β -ACTIN-Antikörper) behandelt. Nach der Inkubation wurde die Membran 3 Mal mit 5-prozentiger Milch/PBST je 10 Minuten gewaschen und in das Röhrchen mit der Membran 10 ml frische 5-prozentige Milch/PBST sowie die sekundären Antikörper in der vom Hersteller empfohlenen Menge zugegeben. Das Röhrchen konnte dann eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf Rollen inkubiert werden. Hinterher wurde die Membran wiederum 3 Mal für je 10 Minuten mit PBST gewaschen. Waschung der Membran mit destilliertem Wasser. Die Substrate A und B des *PierceTM ECL Plus Western Blotting Substrate* wurden im Verhältnis 40:1 gemischt und die Membran daraufhin mit dieser Mischung über 5 Minuten hinweg bei Raumtemperatur inkubiert. Legung der Membran in die Röntgenkassette. Im dunklen Raum wurde dann ein Film auf die Membran in der Kassette gegeben und für etwa eine Minute dort belassen. Nach der Entwicklung wurde der Marker eingezeichnet, der Film beschrieben, eingescannt und schließlich mit dem Programm ImageJ auf Densitometrie hin ausgewertet.

3.9. Real-Time LightCycler® Quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (QRT-PCR)

Die QRT-PCR wurde verwendet, um die Expression von *Galnt2* und *St3Gal6* in PiggyBac-mutierten Zellen sowie die Expression von *GALNT2* in Patientenproben zu messen. Mit Hilfe des RNeasy® Plus Mini Kits konnte nach dem Protokoll des Herstellers eine RNA-Isolation durchgeführt werden. Die RNA-Menge konnte mit dem Nanodrop gemessen werden. Vor dem Umschreiben der RNA in die cDNA wurde die RNA mit DNase-Verdau (RQ1 RNase-Free DNase, RQ1 DNase 10X Reaction Buffer) vorbehandelt. Die DNase konnte mit RQ1 DNase Stop Solution gestoppt werden. Daraufhin wurde die isolierte RNA mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* in cDNA umgeschrieben.

Die Expression von *Galnt2* und *St3Gal6* sowie die Expression des Referenz-Housekeeping-Gens *β-Actin* wurden in Zelllinien verglichen, die starke und schwache Neuroaffinität im 3D-Migration Assay aufgezeigt haben. Dazu wurde die Expression von *GALNT2* sowie die Expression des Referenz-Housekeeping-Gens *β-ACTIN* in der Patientengruppe (normales Pankreas vs. schwache NI im PDAC vs. starke NI im PDAC) abschließend gemessen. Dafür wurden das *Roche Real-Time LightCycler® 480* und das *Roche KAPA SYBR® for Light Cycler® 480* verwendet. Die Auswertung der Experimente erfolgte nach der Pfaffl-Methode (Pfaffl, 2001).

3.10. Patienten und Gewebe

Das Pankreasgewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen und für die PCR wurde von Patienten entnommen, bei denen es aufgrund eines Adenokarzinoms des Pankreaskopfes (n=14; das Gewebe wurde zuvor im Rahmen einer anderen Dissertation in unserem Labor auf die Stärke der NI untersucht, somit gab es 7 Proben des PDAC mit starker NI und 7 Proben des PDAC mit schwacher NI) entfernt werden musste. Alle Patienten wurden über die Entnahme des Gewebes zu Forschungszwecken aufgeklärt und willigten hierzu ein. Die

Durchführung der Gewebesammlung wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München überprüft und genehmigt (Nr. 1926/07). Das entnommene Pankreasgewebe wurde sofort nach Entnahme in vierprozentigem Paraformaldehyd fixiert und in einem automatisierten System in Paraffin eingebettet oder im RNA-Later eingefroren.

3.11. Immunhistologie

In Paraffin eingebettete 3µm dicke Gewebeschnitte von Patienten mit verschiedener Stärke der NI im PDAC wurden mit dem Antikörper gegen GALNT2 oder ST3GAL6 gefärbt, um die Proteinspiegel von N-acetylgalactosaminyltransferase 2 oder beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 zu vergleichen. Die Gewebeschnitte wurden zuerst in Roticlear entparaffinisiert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Nach der Rehydratisierung wurden die Proben im TBST-Puffer geschüttelt. Die Gewebeschnitte wurden anschließend 5 Minuten lang in Triton-X100 inkubiert, im TBST geschüttelt, danach 5 Minuten in dreiprozentigem Wasserstoffperoxid inkubiert und wiederum in destilliertem Wasser geschüttelt. Die Schnitte wurden dann 1 Stunde bei Raumtemperatur in 10-prozentigem normalen Ziegen Serum inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blocken. Nach der Inkubation wurde auf die Gewebeschnitte der anti-GALNT2- oder anti-ST3GAL6-Antikörper im Verdünnungsverhältnis 1:1500 mit dem Ziegen Serum zugegeben. Die Schnitte wurden dann über Nacht in der Wet-Box bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Proben 3 Mal je 10 Minuten mit TBST geschüttelt und danach – zur Detektion des Antikörpers – eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit dem EnVision+System-HRP inkubiert werden. Die Gewebeschnitte wurden 3 Mal je 5 Minuten lang mit TBST vermischt, woraufhin die Chromogenreaktion mit *Liquid DAB+Substrate Chromogen System* der Firma DAKO erfolgte. Nach einer Färbung mit Hämatoxylin wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe und in Roticlear dehydratisiert. Die digitale Aufnahme der Präparate erfolgte mit dem Panoramic MIDI Slide Scanner. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem CaseViewer untersucht und entsprechend

der Fragestellung (Tumorzellen in der Nähe von Nerven, Tumorzellen weg von Nerven) aufgenommen. Danach wurde die prozentual gefärbte Fläche der Tumorzellen mit ImageJ ermittelt. Die Ergebnisse wurden abschließend mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA) statistisch ausgewertet.

3.12. Statistische Auswertung und Analyse

Die statistische Auswertung und Analyse erfolgte durch das Programm GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse konnten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt werden. Es wurden zweiseitige p-Werte bestimmt, und ein statistisch signifikanter Unterschied ab einem p-Wert ≤ 0.05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Zellen mit mutierten *Galnt2* und *St3Gal6* sind spezifisch zu Spinalganglien der Maus im 3D-Migration Assay migriert

Das Hauptziel dieser Dissertation bestand darin, spezifische Mutationen zu detektieren, die die NI im PDAC induzieren oder verstärken können. Dafür wurde eine Auswertung genetisch unterschiedlicher Pankreaskarzinome in Mäusen durchgeführt. Verwendet wurde das *Pdx1-Cre; Rosa26^{LSL-PB}; Kras^{LSL-G12D/+}; ATP1* Mausmodell (Rad et al., 2010; Rad et al., 2015). Die Tumorigenese wurde durch die pankreasspezifische Expression der *Kras*-Mutation und durch genomweite PB-medierte Zufallsmutagenese vermittelt. Dabei war es dank Insertionsstellen-Sequenzierung (QiSeq, Ref. Friedrich et al) möglich, mit großer Präzision zu bestimmen, an welchen Stellen die ATP-Transposons inseriert wurden und somit welche Gene genau in jedem Tumor mutiert waren. Der Grundgedanke bestand darin, dass gerade die zusätzlichen Mutationen den Phänotyp des Tumors verändern und die Tumorbildung mit NI in einer oder mehreren Mäusen induzieren. Aus den Tumoren der Mäuse wurden für die Untersuchung Tumorzellen isoliert. Aus jeder Maus mit einem Pankreaskarzinom wurde jeweils eine Zelllinie isoliert. Insgesamt wurden für das Projekt 22 Zelllinien verwendet, die uns von der Arbeitsgruppe von Professor Roland Rad an der TU München zur Verfügung gestellt wurden.

Die Fähigkeit der Zellen zur NI hängt mit der spezifischen Neuroaffinität der Tumorzellen zusammen (Ceyhan et al., 2008). Zum Vergleich der Neuroaffinität wurde in allen Zelllinien ein 3D-Migration Assay durchgeführt, in welchem die Migration der Tumorzellen mit und ohne ECM-Gel in Richtung DRG verglichen wurde (Abb. 1).

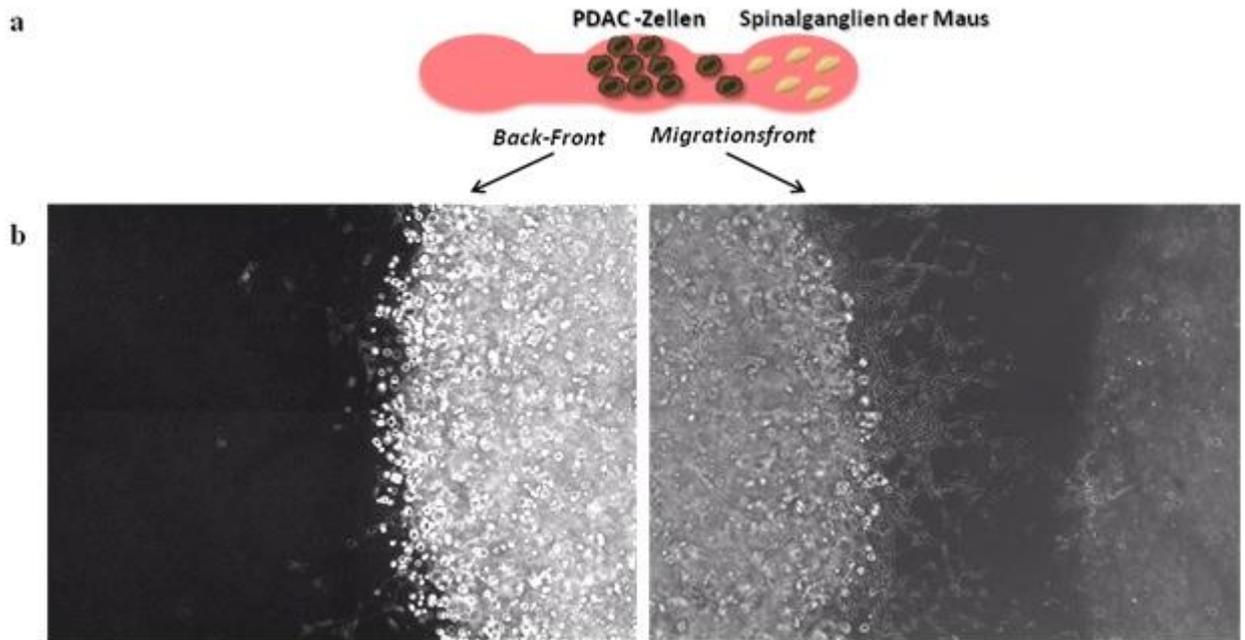


Abb. 1a. Schematische Abbildung des 3D-Migration Assays. In der Mitte befinden sich die Tumorzellen, die die Möglichkeit haben, nach rechts in DRG-Richtung oder in die andere Richtung mit leerem ECM-Gel (Kontrolle) zu migrieren.

Abb. 1b. Foto der Back- und Migration Front der Zellen, die eine hohe Neuroaffinität aufweisen; in der Migration Front sind deutlich mehr Zellen als in der Back-Front zu sehen.

Nach einer 48-stündigen Inkubationszeit erfolgte eine 24-stündige Time-Lapse-Mikroskopie. Einige Zelllinien zeigten eine Migration nach 48 Stunden an; die Time-Lapse-Mikroskopie wurde für diese Zelllinien wiederholt. Die Zellmigration fand entweder in Richtung DRG oder in Richtung eines ECM-Gels statt. Diese Migration wurde in den FMI an der Migration-Front und an der Back-Front für alle Zelllinien grafisch dargestellt (Abb. 2). Dabei waren die Zelllinien mit einem hohen FMI an der Migration-Front und einem niedrigen FMI an der Back-Front von größtem Interesse. Um die Auswertung übersichtlicher zu gestalten, wurde eine zweite graphische Darstellung vorbereitet, die den Unterschied zwischen dem FMI an der Migration-Front und Back-Front zeigt (Abb. 3).

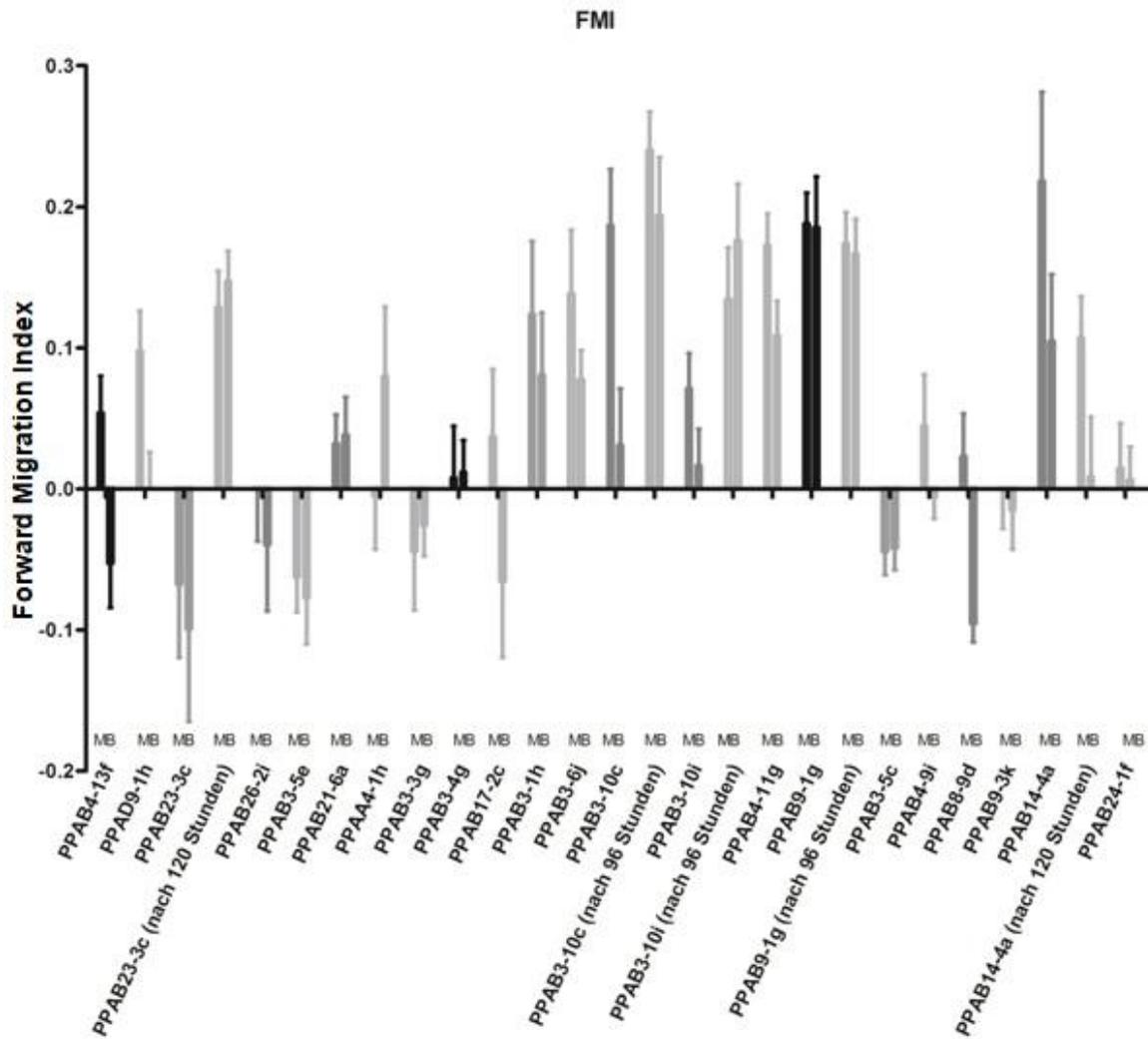


Abb. 2. Forward Migration Index für alle Zelllinien. M = Migration-Front, B = Back-Front. Falls eine Zelllinie mehr als einmal fotografiert wurde, ist die graphische Darstellung zweimal aufgeführt. In Klammern ist der Zeitpunkt angegeben, zu dem das Experiment zum zweiten Mal ins Time-Lapse-Mikroskop platziert wurde. An der x-Achse sind die Namen der Zelllinien angegeben.

Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

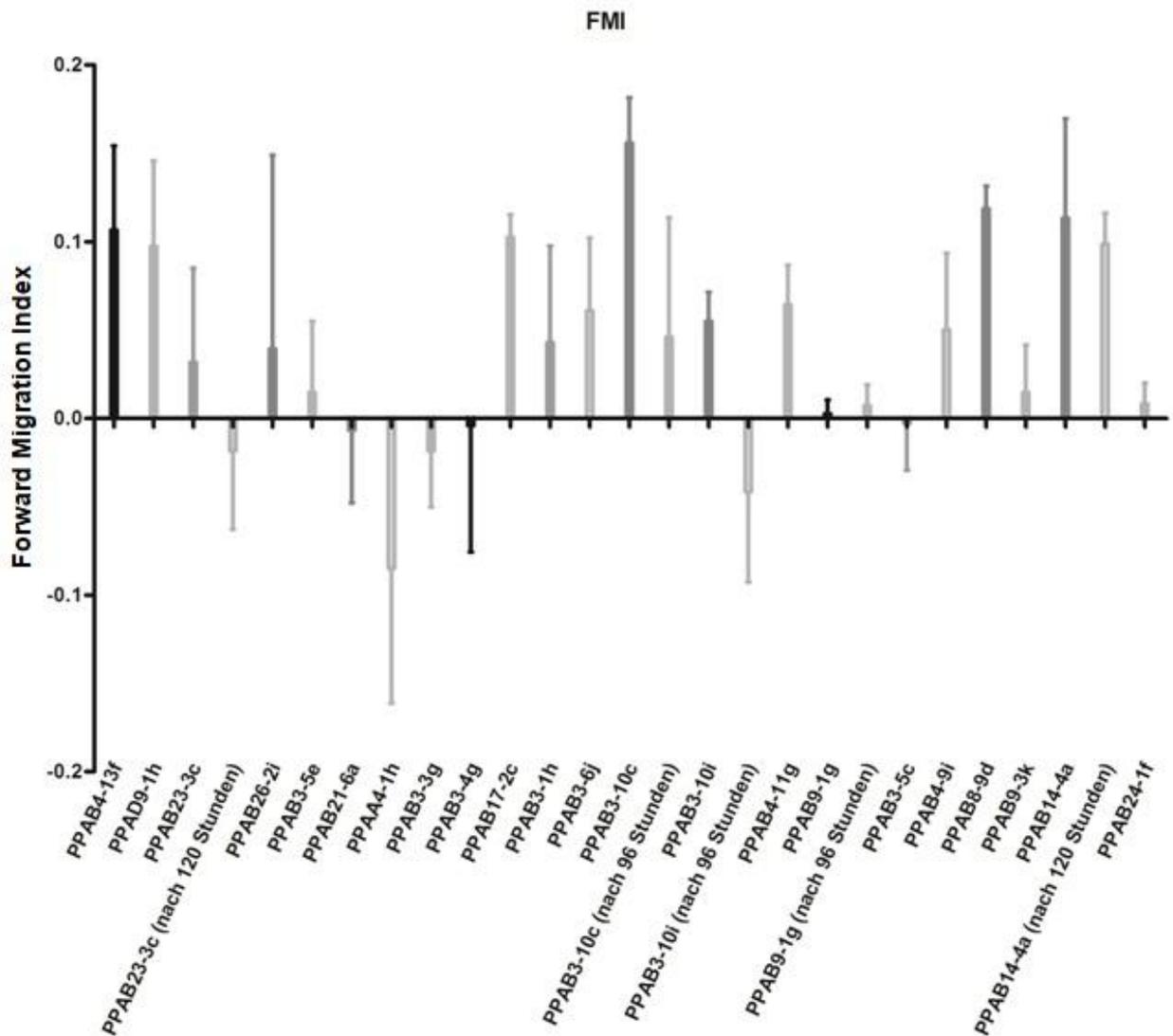


Abb. 3. Unterschied des FMI an der Migration-Front vs. Back-Front für alle Zelllinien. M = Migration Front, B = Back-Front. Falls eine Zelllinie mehr als einmal fotografiert wurde, ist die graphische Darstellung zweimal aufgeführt. In Klammern ist der Zeitpunkt angegeben, zu dem das Experiment zum zweiten Mal ins Time-Lapse-Mikroskop platziert wurde. An der x-Achse sind die Namen der Zelllinien angegeben.

Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

Zum Zwecke der Datenzuverlässigkeit wurden die Migrationstests für jene Zelllinien noch einmal wiederholt, die die größte und die kleinste Neuroaffinität aufwiesen. Für jede Wiederholung sind die Daten in zwei graphischen Darstellungen aufgezeigt (Abb. 4, Abb. 5).

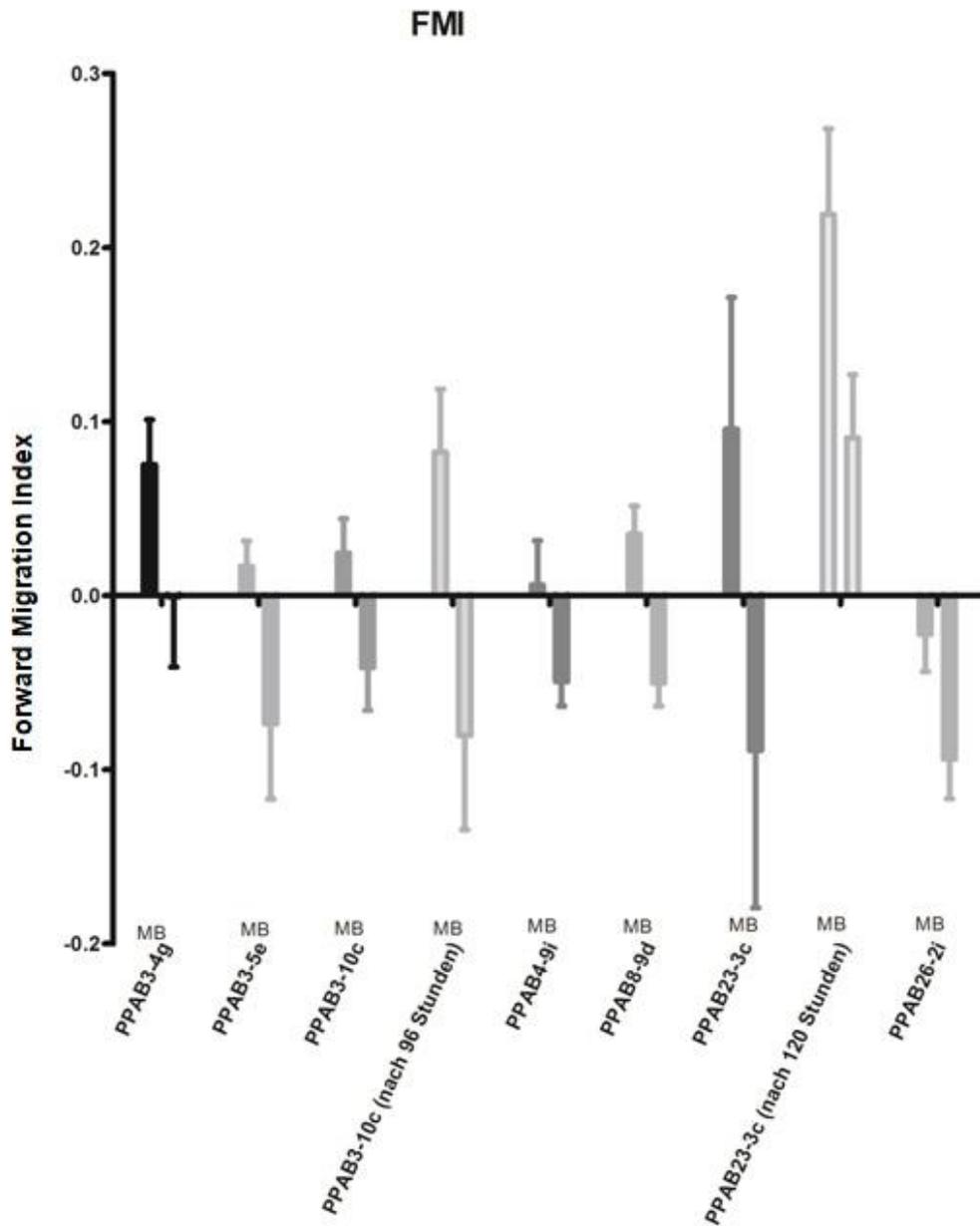


Abb. 4. *Forward Migration Index* für alle Zelllinien, bei denen in den vorhergehenden Experimenten jeweils die größte und die kleinste Neuroaffinität zum Vorschein kamen. M = Migration-Front, B = Back-Front. Falls eine Zelllinie mehr als einmal aufgenommen wurde, ist die graphische Darstellung zweimal aufgeführt. In Klammern ist der Zeitpunkt angegeben, zu dem das Experiment zum zweiten Mal ins Time-Lapse-Mikroskop platziert wurde. An der x-Achse sind die Namen der Zelllinien angegeben.

Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

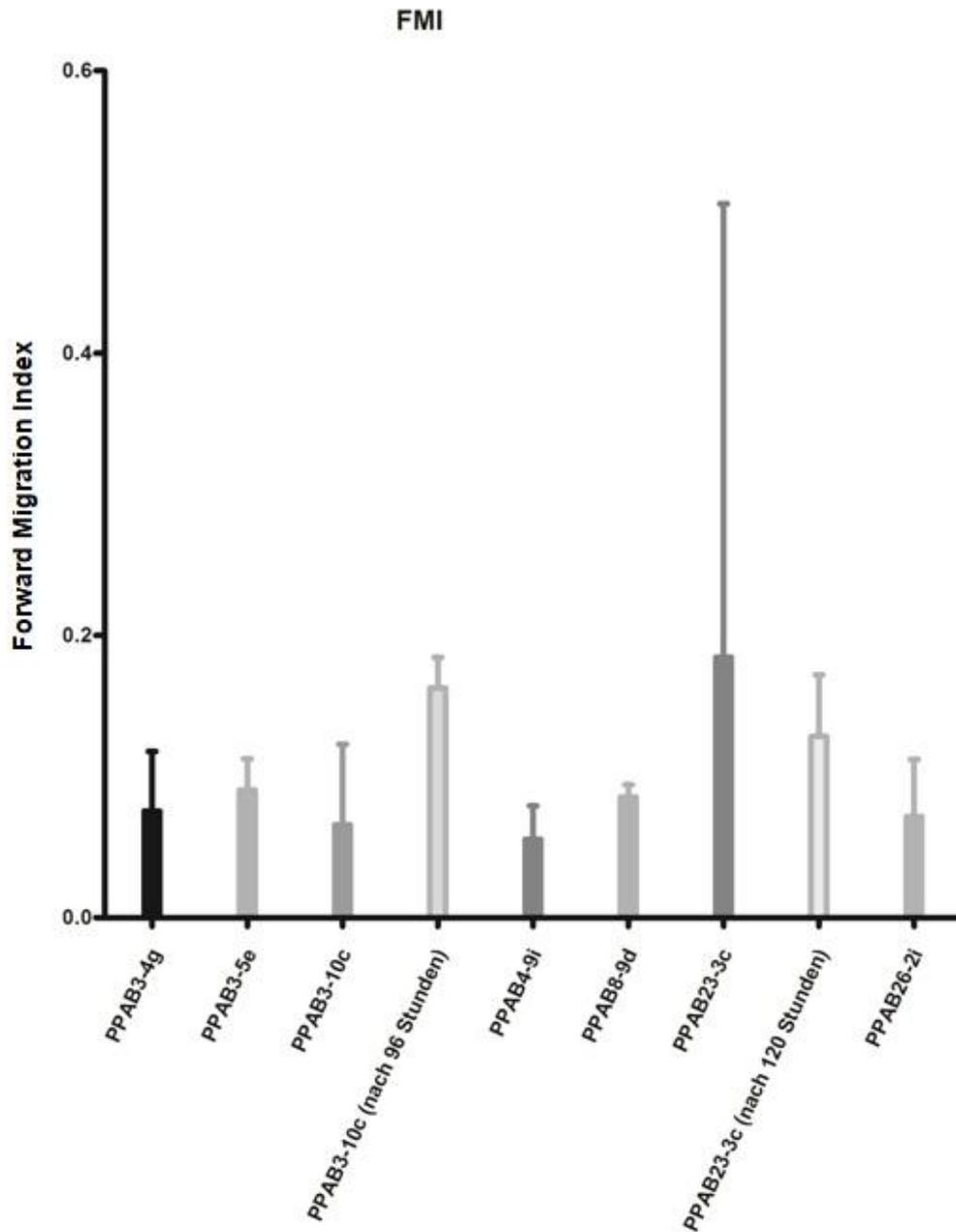


Abb. 5. Unterschieds des FMI an der Migration-Front versus Back-Front für die Zelllinien, bei denen in den vorhergehenden Experimenten die größte und die kleinste Neuroaffinität zum Vorschein kamen. M = Migration-Front, B = Back-Front. Falls eine Zelllinie mehr als einmal fotografiert wurde, ist die graphische Darstellung zweimal aufgeführt. In Klammern ist der Zeitpunkt angegeben, zu dem das Experiment zum zweiten Mal ins Time-Lapse-Mikroskop platziert wurde. An der x-Achse sind die Namen der Zelllinien angegeben.

Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt.

Für die Auswertung des Mutationsverhaltens wurden drei Zelllinien mit hoher Neuroaffinität und drei Zelllinien mit niedriger Neuroaffinität ausgewählt. Als Zelllinien mit einer hohen Neuroaffinität wurden PPAB3-10c, PPAB3-10i und PPAB14-4a ausgesucht, als Zelllinien mit einer niedrigen Neuroaffinität PPAB3-5c, PPAA4-1h sowie PPAB21-6a. Anschließend wurden die Ergebnisse der Sequenzierung bezüglich der Insertionsstellen der ATP-Transposons in diesen Zelllinien ausgewertet. Auffallend war, dass zwei der drei Zelllinien, die eine hohe Neuroaffinität aufwiesen, Insertionen von ATP-Transposons in zwei verschiedenen Genen hatten, die eine ähnliche Funktion ausführen: In der Zelllinie PPAB3-10i wurde aufgrund der Nukleotid-Sequenz eine inaktivierende Insertion des ATP-Transposons in das Gen *St3Gal6*, und in der Zelllinie PPAB14-4a in das Gen *Galnt2* detektiert. Beide Gene kodieren Enzyme, die für die Glykolysierung im Golgi-Apparat notwendig sind (Christiansen et al., 2014). Es stellt sich daher die Frage nach dem Einfluss der Dysfunktion der Glykosylierungsenzyme auf die NI im PDAC und wie der Knockout von *Galnt2* und *St3Gal6* die Neuroaffinität der Tumorzellen beeinflusst.

4.2. Nach Herunterregulation von *Galnt2* und *St3Gal6* weisen murine Pankreaskarzinomzellen höhere Neuroaffinität auf

Um die Zelllinien für den Knockout auszuwählen, wurde – wie bereits erwähnt – die qRT-PCR gegen *Galnt2* und *St3Gal6* mittels dreier Zelllinien durchgeführt, die eine hohe Neuroaffinität aufwiesen und anhand von drei Zelllinien, die eine niedrige Neuroaffinität zeigten (Abb. 6, Abb. 7).

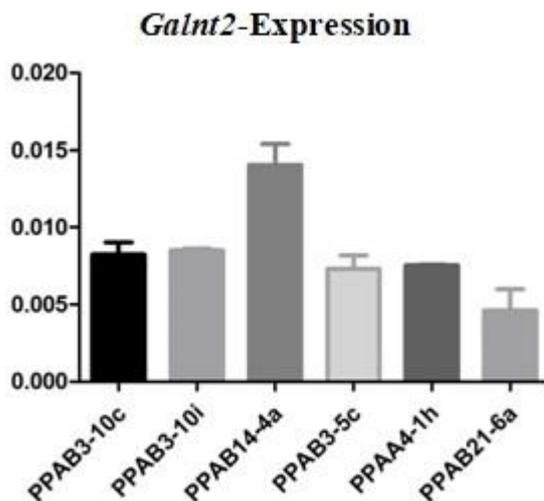


Abb. 6. *Galnt2*-Expression in Zelllinien von *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mausmodell. Normalisierung auf Housekeeping-Gen β -Actin. Ergebnis der quantitativen PCR gegen *Galnt2* wird gezeigt. An der x-Achse sind die Namen der Zelllinien angegeben.

In jedem Experiment wurde jede Probe zweimal getestet. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt.

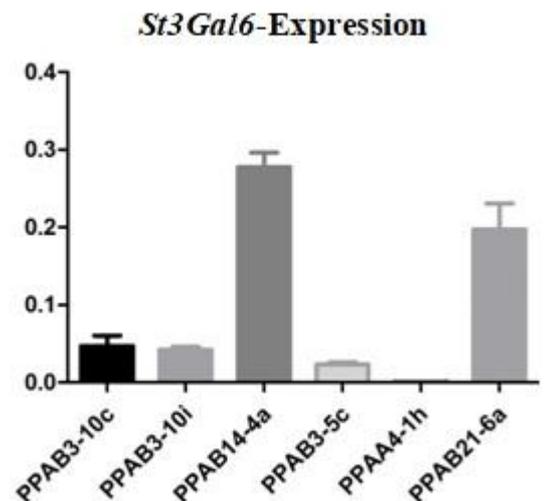


Abb. 7. *St3Gal6*-Expression in Zelllinien von *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mausmodell. Normalisierung auf Housekeeping-Gen β -Actin. Ergebnis der quantitativen PCR gegen *St3Gal6* wird gezeigt. An der x-Achse sind die Namen der Zelllinien angegeben.

In jedem Experiment wurde jede Probe zweimal getestet. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt.

Für den *Galnt2*-Knockout wurden die Zelllinien PPAB14-4a und PPAB21-6a ausgesucht, da sie die höchste und die niedrigste *Galnt2*-Expression aufwiesen. Für den *St3Gal6*-Knockout wiederum wurden die Zelllinien PPAB3-10c und PPAB21-6a ausgesucht. Die Zelllinie PPAB21-6a zeigte eine schwache Neuroaffinität und die höchste *St3Gal6*-Expression unter den Zelllinien mit einer schwachen Neuroaffinität. Die Zelllinie PPAB3-10c dagegen war die Zelllinie mit der höchsten Neuroaffinität unter allen 22 Zelllinien und wies einen der

niedrigsten Grade der *St3Gal6*-Expressionen auf. Der *Galnt2*- und *St3Gal6*-Knockout erfolgte mit Hilfe von CRISPR-Cas9 (Abb. 8).

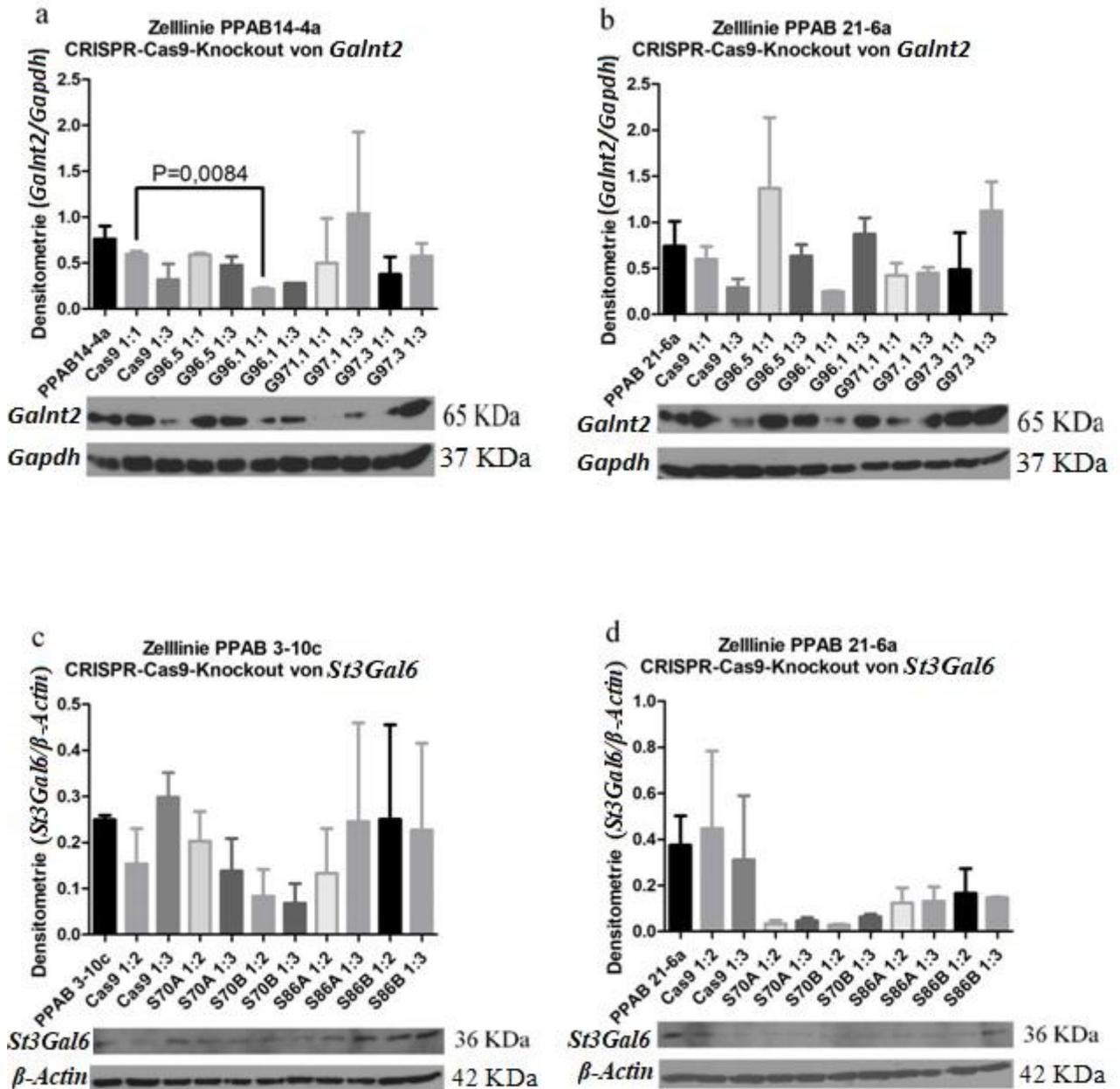


Abb. 8. Western Blot bei den Proben nach dem Knockout unter Verwendung von CRISPR-Cas9. **a.** CRISPR-Cas9-Knockout von *Galnt2* in der Zelllinie PPAB14-4a **b.** CRISPR-Cas9-Knockout von *Galnt2* in der Zelllinie PPAB21-6a **c.** CRISPR-Cas9-Knockout von *St3Gal6* in der Zelllinie PPAB3-10c und **d.** CRISPR-Cas9-Knockout von *St3Gal6* in der Zelllinie PPAB21-6a. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der *t*-Test durchgeführt.

PPAB14-4a, PPAB21-6 und PPAB3-10c – Kontrollzelllinien

Cas9 – Kontrollzelllinie, Transfektion mit pSPDACs9(BB) Kontroll-Plasmid ohne sgRNA

G96.1 und G96.5, G97.1 und G97.3, S70A und S70B, S86A und S86B – Paare der Zelllinien, Transfektion mit sgRNA von zwei verschiedenen *E.coli*-Kolonien von der selben sgRNA

1:1, 1:2 und 1:3 geben das Verhältnis des Transfektionsreagenten und des Puffers bei der Transfektion an.

Für Migrationsexperimente nach dem Knockout wurden Zelllinien ausgesucht, die mit folgenden Plasmiden transfiziert wurden: G96.1, G97.1 und Cas9, jeweils im Verhältnis 1:1, für Zellen mit dem *Galnt2*-Knockout; S70B, S86A und Cas9, jeweils im Verhältnis 1:2, für Zellen mit dem *St3Gal6*-Knockout. Da sich die ST3GAL6-Antikörper im Western Blot nicht spezifisch genug erwiesen, wurden die Zelllinien mit dem *St3Gal6*-Knockout für die Verifizierung des Knockouts sequenziert (Abb. 9, Abb. 10).

a

PPAB21-6a Cas9 1:2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
318 bits(172)	6e-85	176/179(98%)	0/179(0%)	Plus/Plus

Features: [type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase](#)
[type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase isoform X1](#)

```

Query 14      GCTTGACCCNCTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATTGTTAAATGGGAGGGGGGTAGA 73
Sbjct 58493577 GCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATTGTTAAATGGGAGGGGGGTAGA 58493636
Query 74      CTAGTTGAGAAGTCATGTTTGCATAGTAAAACTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTTCC 133
Sbjct 58493637 CTAGTTGAGAAGTCATGTTTGCATAGTAAAACTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTTCC 58493696
Query 134     CCACAGTATACAGTATAGTACATAATAGAGGAAGATGGAACTCAGGAATA TGSACACCA 192
Sbjct 58493697 CCACAGTATACAGTATAGTACATAATAGAGGAAGATGGAACTCAGGAATA TGCACACCA 58493755
  
```

b

PPAB21-6a S70B 1:2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
261 bits(141)	6e-67	174/191(91%)	1/191(0%)	Plus/Plus

Features: [type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase](#)
[type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase isoform X1](#)

```

Query 10      GTGCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATTGTTAAATGGGAGGGGGGTA 69
Sbjct 58493575 GTGCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATTGTTAAATGGGAGGGGGGTA 58493634
Query 70      GACTAGTTGAGAAGTCATGTTTGCATAGTAAAACTNAAACTTACCAATAGCCATTTGTT 129
Sbjct 58493635 GACTAGTTGAGAAGTCATGTTTGCATAGTAAAACTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTT 58493694
Query 130     CCCCACA-TTACACTATATTATATAAAGAGGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGTGGGGT 188
Sbjct 58493695 CCCCAGTTTACAGTATAGTACATAATAGAGGAAGATGGAACTCAGGAATA TGGCCACC 58493754
Query 189     @G@E@C@C@T@T@ 199
Sbjct 58493755 AGATACCCCTT 58493765
  
```

C

PPAB21-6a S86A 1:2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
241 bits(130)	4e-61	140/147(95%)	0/147(0%)	Plus/Plus

Features: [type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase](#)
[type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase isoform X1](#)

```

Query 23      GACTATTCAAGCTCCTTGCCACATTTCTTACACATGCAGGGCTACCATGTACCAAAGTT 82
Sbjct 58488742 GACTATTCAAGCTCCTTGCCACATTTCTTACACATGCAGGGCTACCATGTACCAAAGTT 58488801
Query 83      TGCATGAAAAGGACAAAGAGTGTG          TGACTACNAAAGACNCCTTGNAATGTTGG 142
Sbjct 58488802 TGCATGAAAAGGACAAAGAGTGTG          TGACTACGAAGACACCTTGCAATGTTCA 58488861
Query 143     CTGGCTACAGT            169
Sbjct 58488862 ATGGCTACAGT            58488888
  
```

Abb. 9. CRISPR-Cas9-Knockout von *St3Gal6* in der Zelllinie PPAB21-6a. Sequenzierung der Zelllinie PPAB21-6a nach dem *St3Gal6*-Knockout. **a.** Cas9-Kontroll-Plasmid: 179bp sequenziert, zwei nicht identifizierte Nucleotide, eine Nichtübereinstimmung, Sequenzierung bis zu den ersten 10bp sgRNA. **b.** S70B 1:2 Plasmid: 63bp sequenziert (blau markiert), angefangen vom viertletzten Nucleotid des sgRNA-Gebiets (rot markiert), 16 Nichtübereinstimmungen, eine Deletion (orange markiert). **c.** S86A 1:2 Plasmid: 147bp sequenziert, nach 15bp sgRNA-Sequenzierung unterbrochen, drei Nichtübereinstimmungen, vier unbestimmte Nucleotide.

a

PPAB3-10c Cas9 1:2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
366 bits(198)	1e-98	198/198(100%)	0/198(0%)	Plus/Plus

Features: [type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase](#)
[type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase isoform X1](#)

```

Query 12      GCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATGTTAAATGGGAGGGGGGTAGA 71
Sbjct 58493577 GCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATGTTAAATGGGAGGGGGGTAGA 58493636
Query 72      CTAGTTGAGAAGTCA TGTTGCATAGTAAAATCTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTTCC 131
Sbjct 58493637 CTAGTTGAGAAGTCA TGTTGCATAGTAAAATCTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTTCC 58493696
Query 132     CCACAGTATACAGTATAGTACATAATAGAGGAAGATGGAACCTCAGGAATATGGCCACCAG 191
Sbjct 58493697 CCACAGTATACAGTATAGTACATAATAGAGGAAGATGGAACCTCAGGAATATGGCCACCAG 58493756
Query 192     ATACCCCTTCATGGCTGG 209
Sbjct 58493757 ATACCCCTTCATGGCTGG 58493774
  
```

b

PPAB3-10c S70B 1:2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
279 bits(151)	2e-72	178/191(93%)	1/191(0%)	Plus/Plus

Features: [type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase](#)
[type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase isoform X1](#)

```

Query 12      GTGCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATTGTTAAATGGGAGGGGGGTA 71
Sbjct 58493575 GTGCTTGACCCACTAGGCCATCTCCCTACAAATTTTAAATTGTTAAATGGGAGGGGGGTA 58493634
Query 72      GACTAGTTGAGAAGTCATGTTTGCATAGTAAAATCTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTT 131
Sbjct 58493635 GACTAGTTGAGAAGTCATGTTTGCATAGTAAAATCTGAAACTTACCAATAGCCATTTGTT 58493694
Query 132     CCCCACA-TATACAGTATAGACATAAAAAGAGGGGGAGGGGACTCTGGGGTATGGGCCCC 198
Sbjct 58493695 CCCCACA-TATACAGTATAGTACATAATAGAGGAAGATGGAACTCAGGAATA-TGGCCACC 58493754
Query 191     CGATACCCTTT 201
Sbjct 58493755 AGATACCCTTT 58493765
  
```

c

PPAB3-10c S86A 1:2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
237 bits(128)	6e-60	139/148(94%)	0/148(0%)	Plus/Plus

Features: [type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase](#)
[type 2 lactosamine alpha-2,3-sialyltransferase isoform X1](#)

```

Query 22      GACTATTC AAGCTCCTTGCCCACTTTCTTACACATGCAGGGTCTACCATGTACCAAAGTT 81
Sbjct 58488742 GACTATTC AAGCTCCTTGCCCACTTTCTTACACATGCAGGGTCTACCATGTACCAAAGTT 58488801
Query 82      TGCATGAAAAGGACAAAAGAGTGTGAAAAAGATGACTNGNAAAGACNCTTGNNAAATGTTCN 141
Sbjct 58488802 TGCATGAAAAGGACAAAAGAGTGTGAAAAAATGACTACGAAGACACCTTGCAAAATGTTCA 58488861
Query 142     ATGGCTACNG-----g 169
Sbjct 58488862 ATGGCTACAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 58488889
  
```

Abb. 10. CRISPR-Cas9-Knockout von *St3Gal6* in der Zelllinie PPAB3-10c. Sequenzierung der Zelllinie PPAB3-10c nach dem *St3Gal6*-Knockout. **a.** Cas9-Kontroll-Plasmid: 198 Nucleotide sequenziert. **b.** S70B 1:2 Plasmid: 63bp sequenziert (blau markiert), angefangen vom viertletzten Nucleotid des sgRNA-Gebiets (rot markiert), 12 Nichtübereinstimmungen, eine Deletion (orange markiert). **c.** S86A 1:2 Plasmid: 148bp sequenziert, nach 14bp sgRNA-Sequenzierung unterbrochen, zwei Nichtübereinstimmungen, sieben unbestimmte Nucleotide.

Die Zelllinien PPAB14-4a G96.1 1:1, PPAB14-4a G97.1 1:1 und PPAB21-6a G96.1 1:1 sowie PPAB21-6a G97.1 1:1 wurden nach dem *Galnt2*-Knockout im Vergleich mit PPAB14-4a Cas9 1:1 und PPAB21-6a Cas9 1:1 im 3D-Migration Assay zur Kontrolle des *Galnt2*-Einflusses auf die Neuroaffinität der Pankreaskarzinomzellen getestet.

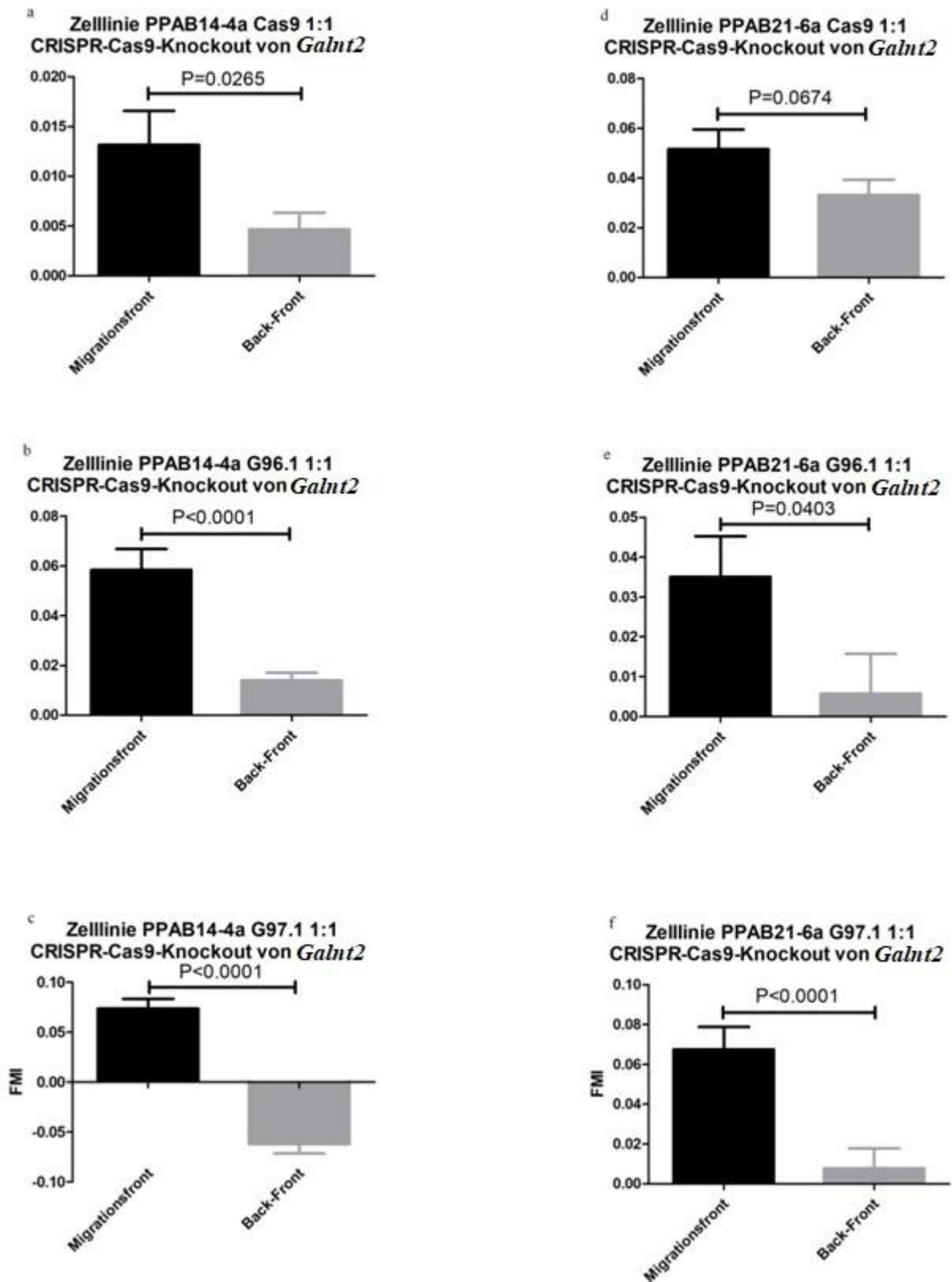


Abb. 11. Erhöhung der Affinität der Tumorzellen vom *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mausmodell zu DRG nach dem *Galnt2*-Knockout. Nach dem *Galnt2*-Knockout unter Verwendung verschiedener sgRNA, G96.1 bzw. G97.1, erhöhte sich die Migration von Pankreaskarzinomzellen zu DRG in beiden Zelllinien, sowohl in PPAB14-4a als auch in PPAB21-6a, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit Cas9-Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. *Pro Migration Front* wurden 30 Zellen ausgewertet. *Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden,*

gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der *t*-Test durchgeführt.

Nach dem *Galnt2*-Knockout unter Verwendung verschiedener sgRNA, G96.1 bzw. G97.1, erhöhte sich die Migration der Pankreaskarzinomzellen zu DRG im Vergleich zu Cas9-Kontrolle in beiden Zelllinien, sowohl in PPAB14-4a als auch in PPAB21-6a (Abb. 11, Abb. 12).

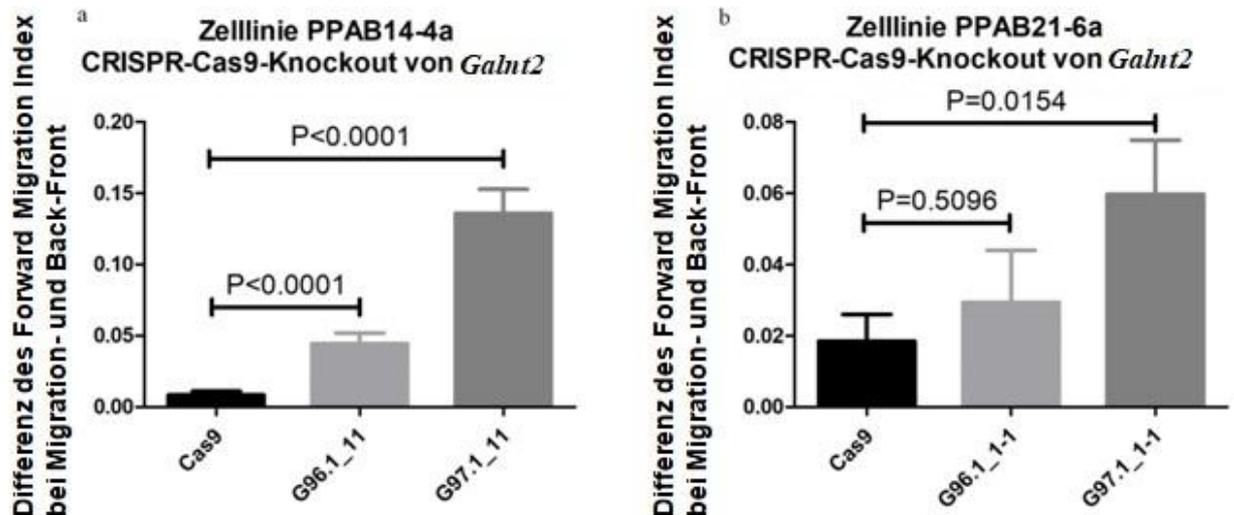


Abb. 12. Erhöhung der Affinität der Tumorzellen vom *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mausmodell zu DRG nach dem *Galnt2*-Knockout. Differenz des FMI bei Migration-Front und Back-Front wird gezeigt. Unter Verwendung verschiedener sgRNA, G96.1 bzw. G97.1, erhöhte sich die Migration von Pankreaskarzinomzellen zu DRG in beiden Zelllinien, sowohl in PPAB14-4a als auch in PPAB21-6a, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit Cas9-Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. Cas9 – Kontrollzelllinie, Transfektion mit pSPDACS9(BB) Kontroll-Plasmid ohne sgRNA; G96.1_11, G97.1_11 - Zelllinien, Transfektion mit sgRNA G96.1_11 oder G97.1_11. Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der *t*-Test durchgeführt.

Die Zelllinien PPAB3-10c S70B 1:2, PPAB3-10c S86A 1:2 und PPAB21-6a S70B 1:2 sowie PPAB21-6a S86A 1:2 wurden nach dem *St3Gal6*-Knockout im Vergleich mit PPAB3-10c Cas9 1:2 und PPAB21-6a Cas9 1:2 im 3D-Migration Assay zur Kontrolle des Einflusses von *St3Gal6* auf die Neuroaffinität der Pankreaskarzinomzellen getestet.

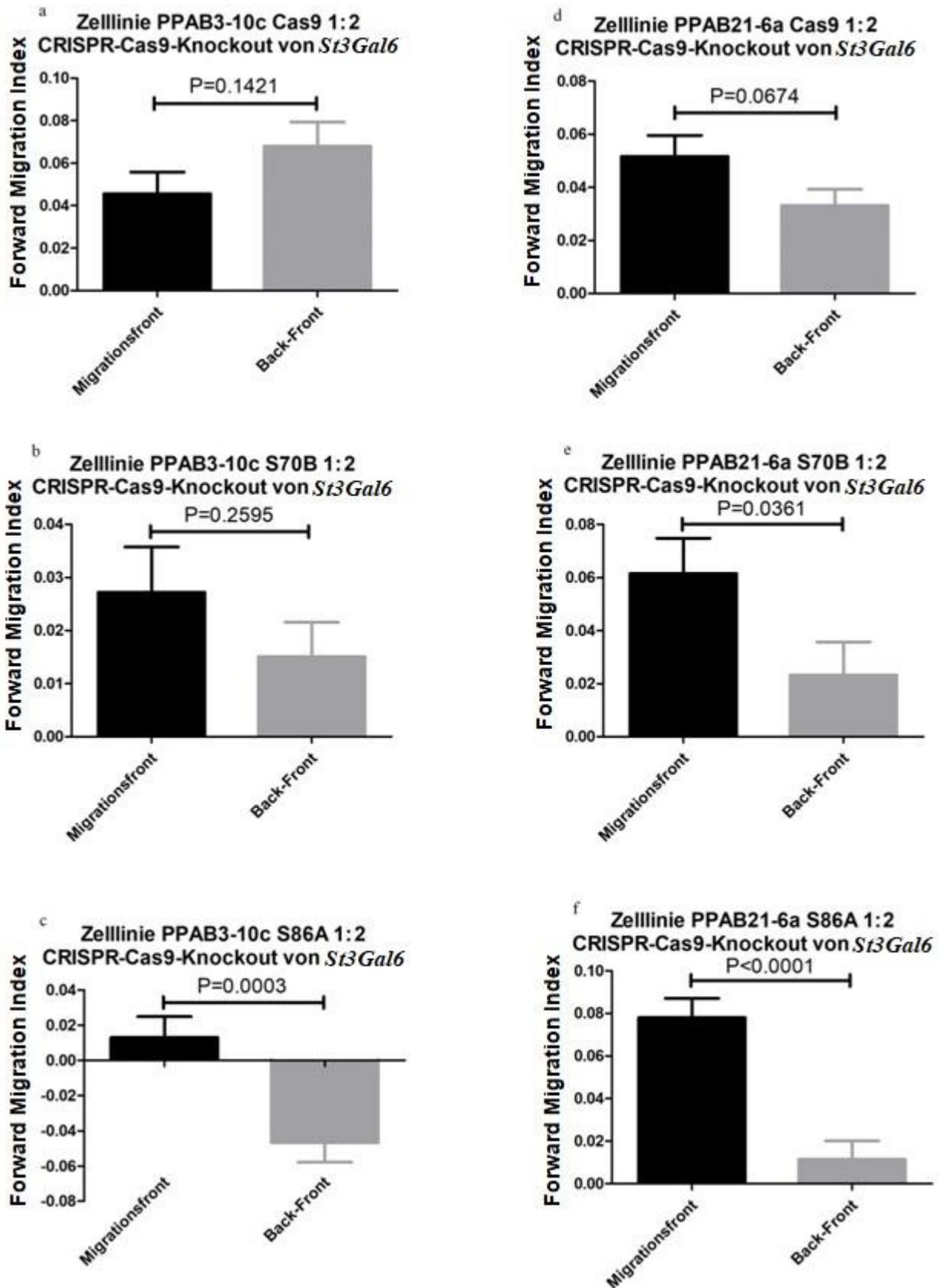


Abb. 13. Erhöhung der Affinität der Tumorzellen vom *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mausmodell zu DRG nach dem *St3Gal6*-Knockout. Nach dem *St3Gal6*-Knockout unter Verwendung verschiedener sgRNA, S70B bzw. S86A, erhöhte sich die Migration der Pankreaskarzinomzellen zu DRG in beiden Zelllinien, sowohl in PPAB3-10c als auch in PPAB21-6a, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit Cas9-Kontroll-Plasmid transfiziert

wurden. Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test durchgeführt.

Nach dem *St3Gal6*-Knockout unter Verwendung verschiedener sgRNA, S70B bzw. S86A, erhöhte sich die Migration der Pankreaskarzinomzellen zu DRG in beiden Zelllinien, sowohl in PPAB3-10c als auch in PPAB21-6a (Abb. 13, Abb. 14).

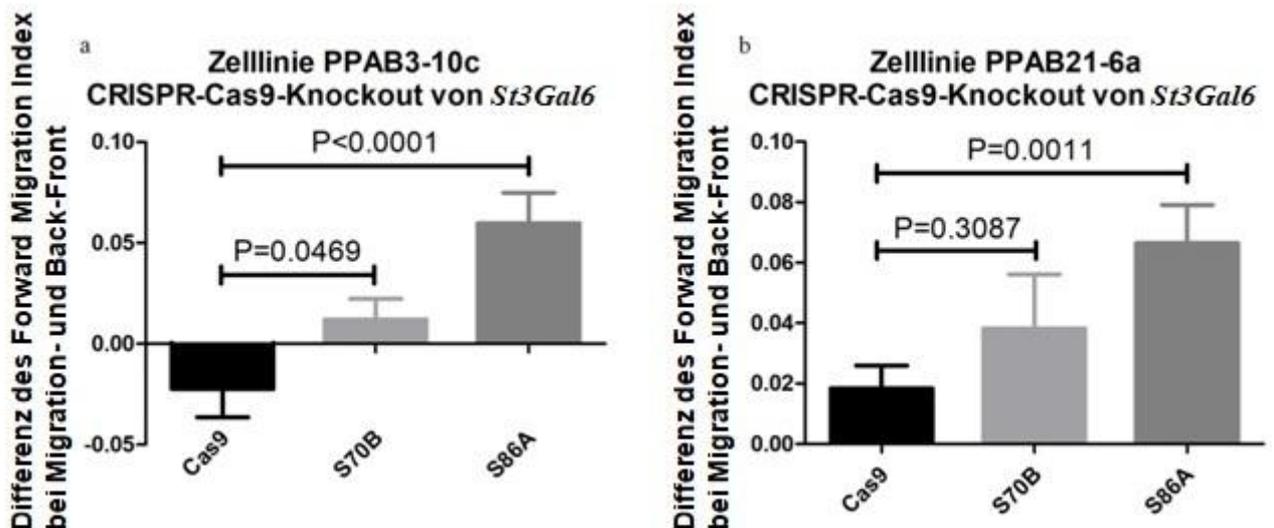


Abb. 14. Erhöhung der Affinität der Tumorzellen vom *Pdx1-Cre;Rosa26^{LSL-PB};Kras^{LSL-G12D/+};ATP1* Mausmodell zu DRG nach dem *St3Gal6*-Knockout. Differenz des FMI bei Migration-Front und Back-Front wird gezeigt. Nach dem *St3Gal6*-Knockout unter Verwendung verschiedener sgRNA, S70B bzw. S86A, erhöhte sich die Migration von Pankreaskarzinomzellen zu DRG in beiden Zelllinien, sowohl in PPAB3-10c als auch in PPAB21-6a, im Vergleich mit den Kontrollzellen, die mit Cas9-Kontroll-Plasmid transfiziert wurden. Cas9 – Kontrollzelllinie, Transfektion mit pSPDACS9(BB) Kontroll-Plasmid ohne sgRNA; S70B, S86A - Zelllinien, Transfektion mit sgRNA S70B oder S86A Pro Migration Front wurden 30 Zellen ausgewertet. Da pro Versuch drei Migrationassays durchgeführt wurden, gab es insgesamt Ergebnisse für 90 Zellen, jeweils für Migration- und Back-Front. Jeder Versuch wurde dreimal wiederholt. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test durchgeführt.

Somit zeigten die Pankreaskarzinomzellen in unserem 3D-Migration Assay nach dem Knockout der Glykosylierungsgene *Galnt2* und *St3Gal6* eine größere Neuroaffinität und eine größere Migration zu DRG.

4.3. In humanen Pankreaskarzinomproben war *GALNT2*- und *ST3GAL6*-Verlust mit starker NI assoziiert

Für die Überprüfung des Einflusses des Expressionsgrades der Glykosylierungsgene *GALNT2* und *ST3GAL6* auf die NI im humanen PDAC wurden insgesamt 74 Paraffinschnitte

von den Patienten vorbereitet, die ein resektables PDAC hatten und diesbezüglich im Klinikum rechts der Isar der TU München operiert wurden. Die histologischen Präparate der PDAC dieser Patientengruppe wurden unter Verwendung der Antikörper anti-GALNT2 und anti-ST3GAL6 gefärbt und anschließend gescannt. Mit Hilfe des Programms CaseViewer wurden die besonders interessanten Seiten (Tumorzellen in der Nähe von Nerven, Tumorzellen weg von Nerven) aufgenommen. Hier wurde dann die Densitometrie mittels ImageJ-Software durchgeführt. Für die NI-fähigen Tumorzellen war ein niedrigerer Färbungsgrad von anti-GALNT2 und anti-ST3GAL6 typisch. Es stellte sich heraus, dass die Bereiche der Präparate ohne NI die Färbestärke eine größere Streuung aufwies. Die Ergebnisse der Densitometrie sind aus den graphischen Darstellungen für anti-GALNT2 und anti-ST3GAL6 ersichtlich (Abb. 15 a, b).

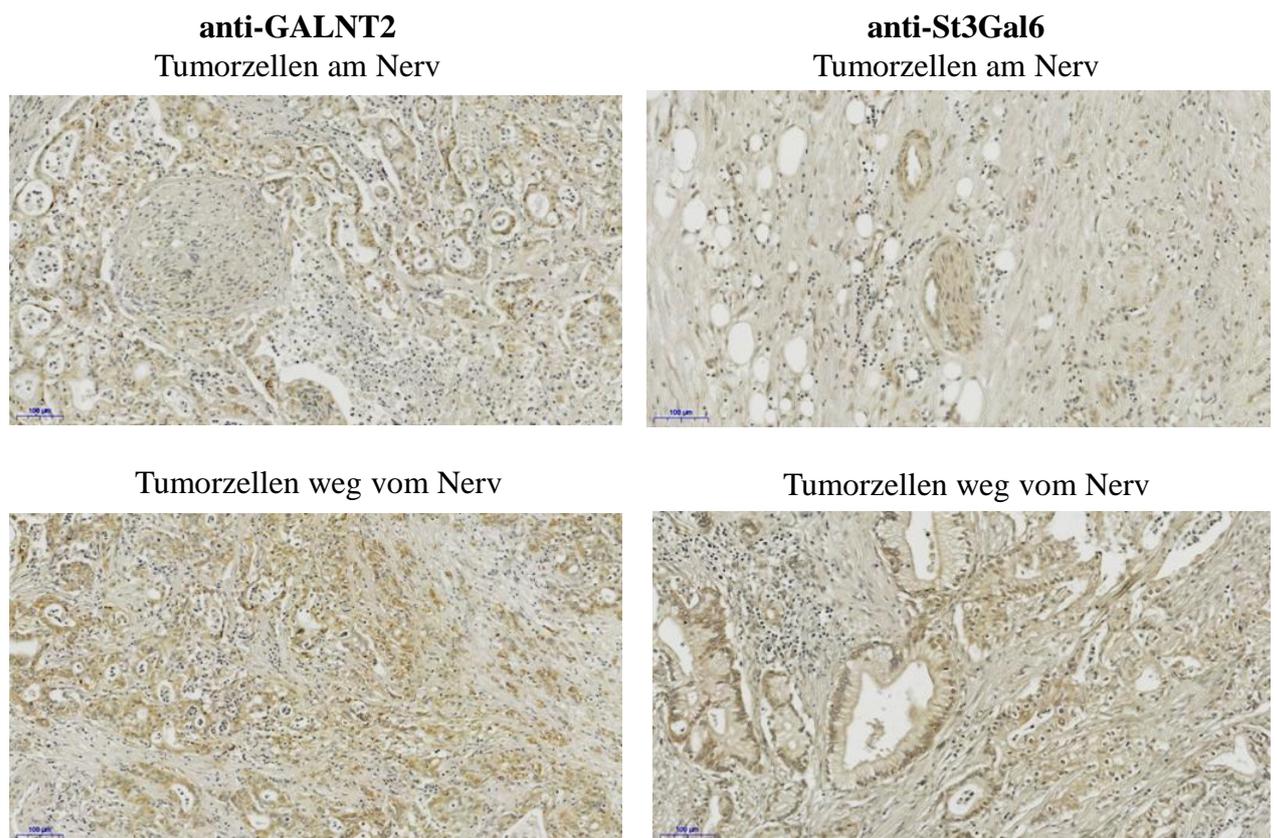


Abb. 15 a. Für die Tumorzellen nah am Nerv ist niedrigere Färbedensität in anti-GALNT2 und anti-ST3GAL6 Färbung typisch, im Vergleich zu Tumorzellen weg vom Nerv. Färbung von anti-GALNT2 bzw. anti-ST3GAL6 auf den Bereichen der histologischen Präparate „Tumorzellen am Nerv“ und „Tumorzellen weg vom Nerv“.

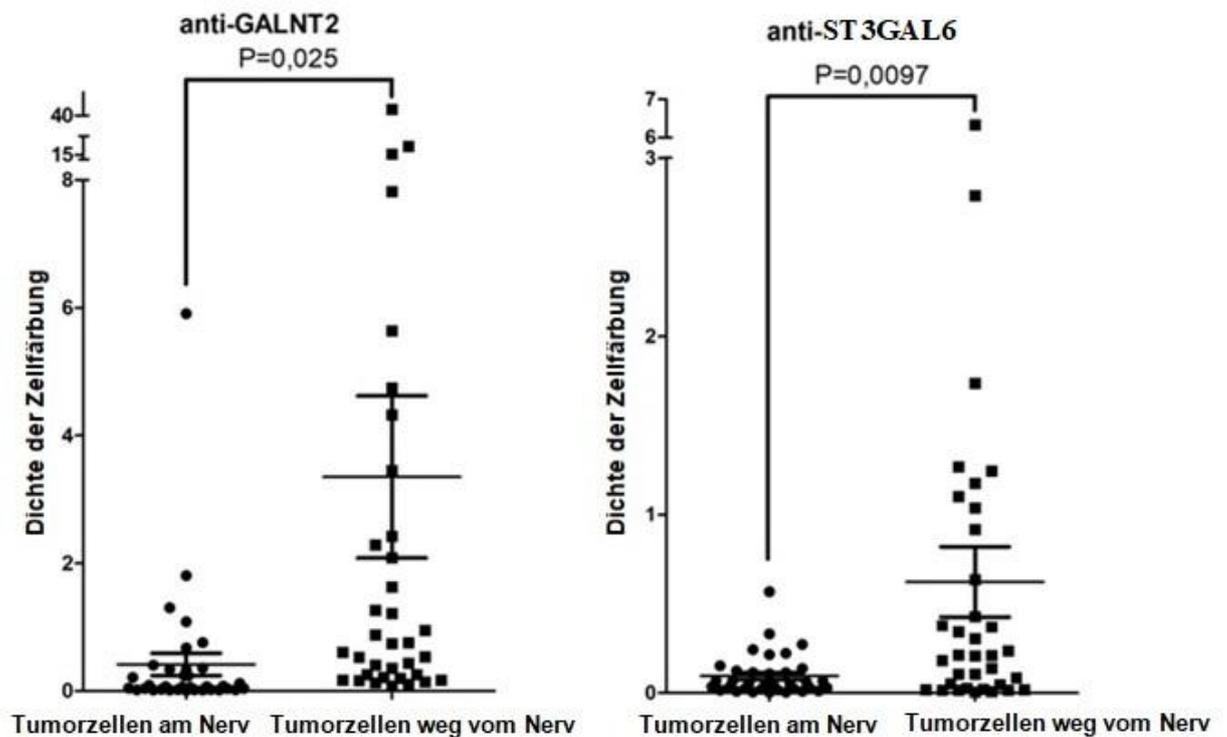


Abb. 15 b. Für die Tumorzellen nah am Nerv ist niedrigere Färbedensität in anti-GALNT2 und anti-ST3GAL6 Färbung typisch, im Vergleich zu Tumorzellen weg vom Nerv. Densitometrie der Färbung von anti-GALNT2 bzw. anti-ST3GAL6 auf den Bereichen der histologischen Präparate „Tumorzellen am Nerv“ und „Tumorzellen weg vom Nerv“. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test durchgeführt.

Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob der Expressionsgrad der Galactosyltransferasen mit dem Grad der NI im PDAC korreliert. Dafür wurden aus den Proben von 21 Patienten drei Gruppen zusammengestellt: Patienten mit einer hohen NI, Patienten mit einer niedrigen NI sowie Patienten mit einem normalen Pankreasgewebe. Aus diesen Proben wurde RNA isoliert und unter Verwendung der Reverse-Transkriptase mit cDNA umgeschrieben. Mit den gewonnenen Proben wurde eine qRT-PCR zur Messung der *GALNT2*-Expression durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen den Färbungsergebnissen: Für das humane PDAC mit der NI war eine niedrigere *GALNT2*-Expression und für das normale Pankreasgewebe eine größere Streuung der *GALNT2*-Expression typisch. Dabei unterschied sich die *GALNT2*-Expression bei den Proben mit einer hohen und niedrigen NI kaum (Abb. 16).

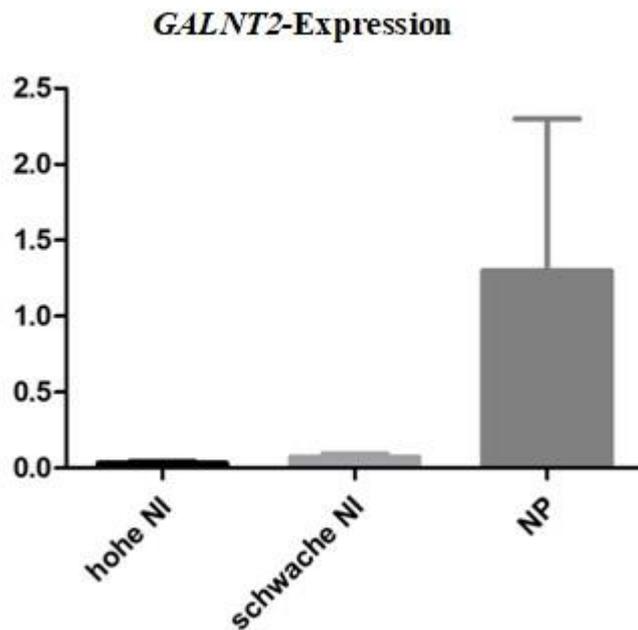


Abb. 16. Für das humane PDAC ist eine niedrigere GALNT2-Expression typisch, im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe. Es zeigt sich kaum Unterschied in der GALNT2-Expression bei den humanen PDAC-Proben mit einer hohen und niedrigen NI. GALNT2-Expression im PDAC mit einer hohen NI, mit einer niedrigen NI und in einem normalen Pankreasgewebe wird gezeigt. Normalisierung auf Housekeeping-Gen β -ACTIN. Für Gruppen „hohe NI“ und „schwache NI“ wurden jeweils 8 Proben und für Gruppe „NP“ wurden 5 Proben von insgesamt 21 verschiedenen Patienten verwendet.

hohe NI – Gruppe der Proben mit histologisch nachgewiesener hohe Nervale Invasion; *schwache NI* - Gruppe der Proben mit histologisch nachgewiesener schwache Nervale Invasion; *NP* - Gruppe der Proben mit normalem Pankreasgewebe.

5. Diskussion

Die Prognose für Patienten mit einem Pankreaskarzinom hat sich in den letzten 50 Jahren nur wenig verbessert. Diese Patienten haben ab der Diagnosestellung noch immer eine mediane Lebenserwartung von nur sechs bis acht Monaten; die 5-Jahres-Überlebensrate bleibt bei ca. 5% (Liu et al., 2002; Kayahara et al., 2007; Demir et al., 2010). Zusätzlich zu dieser äußerst negativen Prognose ist das PDAC mit einer neuralen Invasion assoziiert, deren Inzidenz in einigen Serien 100% erreicht (Liu et al., 2002; Demir et al., 2010). Die Invasion der Tumorzellen in den intrapancreatischen Nerven stellt einen wichtigen Prognosefaktor dar, der nicht nur die Gesamtüberlebensrate, sondern auch die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs beeinflusst (Chatterjee et al., 2012; Zhang et al., 2012). Dabei bleiben die Ursachen der NI bis heute unklar. Die Transposon-vermittelte Mutagenese kann mit Hilfe des Transposonsystems *piggyBac* für die Entdeckung der Krebsgene bei Mäusen verwendet werden (Rad et al., 2010; Rad et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde dem Ziel nachgegangen, die Insertionsmutagenese zur Entdeckung der NI-fördernden genetischen Veränderungen in PDAC einzusetzen.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die Kombination der *Kras*-Mutagenese und des Transposon-Systems *piggyBac* für die Screening der Onkogene verwendet werden kann. Auf ähnliche Weise wurden die Onkogene des Kolonkarzinoms entdeckt (Takeda et al., 2015), ebenso die Gene, die die Seidensynthese beim Seidenspinner ermöglichen (Feng et al., 2018), Gene der potentiellen molekularen Differenzierungsregulatoren der Stammzellen von Mäuseföten (Wang et al., 2018) und schließlich auch Suppressorgene zur Beseitigung der Wachstumsstörungen von Hefezellen (Mutumwinka et al., 2018). Nichtsdestotrotz unterliegt die Insertionsmutagenese einer Reihe von Einschränkungen. Die Insertionsmutagenese kann einige der durch Sequenzierung nachweisbaren Veränderungen nicht nachahmen. (Rad et al., 2010; Friedrich et al., 2017). Die Insertionsmutagenese und andere Herangehensweisen zur Analyse des

Karzinomgenoms vervollständigen einander maßgeblich; jede von ihnen hat ihre eigene Vor- und Nachteile.

Eine Hauptentdeckung dieser Dissertation ist die Ermittlung des Einflusses der Expression der Glykosylierungsgene *GALNT2* und *ST3GAL6* auf die neurale Invasion im Pankreaskarzinom. *GALNT2* ist ein Enzym, das die O-Glykosylierung des Mucins initiiert. *ST3GAL6* dagegen ist ein Enzym, das die Sialinsäure aus der aktivierten Cytidin 5'-monophospho-N-Acetylneuraminsäure in die N- oder O-verknüpften Zuckerketten der Glykoproteine überträgt. Nach dem *Galnt2*- und *St3Gal6*-Knockout erhöhte sich die Neuroaffinität in Zellen, die sowohl niedrige als auch hohe Neuroaffinität in 3D-Migratioassay aufweisen. In qRT-PCR wurde auch die Verringerung der *GALNT2*-Expression in den Proben des PDAC mit einer hohen und einer niedrigen NI im Vergleich zu dem normalen Pankreasgewebe aufgezeigt. Dabei gelang es nicht, einen gesetzmäßigen Zusammenhang zwischen der Ausprägung der NI und der *GALNT2*-Expression im qRT-PCR festzustellen, die Proben mit einer hohen und einer niedrigen NI hatten die vergleichbare *GALNT2*-Expression. Nach der Färbung von anti-*GALNT2* und anti-*ST3GAL6* hatten die Bereiche der histologischen Präparate, die die Tumorzellen mit der NI beinhalteten, eine niedrigere Färbeintensität im Vergleich zu den Präparatbereichen mit den Tumorzellen ohne NI. Möglicherweise ist die fehlende Korrelation zwischen den PCR-Ergebnissen aus dem Gesamttumor und der Neuroinvasivität auf die starke Heterogenität der Zellen im Gesamttumor (Stromazellen neben Tumorzellen) zurückzuführen. Biologisch relevanter sind damit die Ergebnisse auf Proteinebene bzw. die aus den Färbungen.

In der Literatur wurde der Einfluss von *GALNT2* auf die Migrationsfähigkeit und Metastasierung durchaus beschrieben. So unterdrücke *GALNT2* die bösartigen Phänotypen in den Zellen des Adenokarzinoms des Magens durch die Auswirkung auf *Human Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass der

GALNT2-Knockdown die Phosphorylierung von EGFR verstärkt und die Expression des Antigens Tn in EGFR verringert. Die Inhibierung der EGFR-Aktivität mit Gefitinib verringerte die Migrations- und Invasionsfähigkeit (Hu et al., 2018). *GALNT2* unterdrückt also die bösartigen Phänotypen im Adenokarzinom des Magens auch durch die Modifizierung der MET-Aktivität (Hämatopoetischer Wachstumsfaktor). Diese Unterdrückung verstärkte das Zellwachstum, die Migration und die Invasion in vitro, ebenso wie die Metastasierung des Tumors in vivo. Der *GALNT2*-Knockdown verstärkte die MET-Phosphorylierung und verringerte die Expression des Antigens Tn auf MET (Liu et al., 2016). Eine Arbeit von Wu demonstrierte, dass *GALNT2* ein kritischer Mediator des hepatozellulären Karzinoms (HCC) ist, der auch durch die Veränderung der Aktivität des Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) wirkt. Die *GALNT2*-Expression ist im HCC oft verringert, was mit einer vermehrten Fähigkeit zur Invasion assoziiert wird. Die Wiederherstellung der *GALNT2*-Expression in den HCC-Zellen unterdrückt das EGFR-induzierte Wachstum, die Migration und die Invasion der Zellen in vitro und in vivo (Wu et al., 2011). Interessant ist, dass im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle die Erhöhung (und nicht die Verringerung) der *GALNT2*-Expression die Migration und die Invasion der Tumorzellen durch die Regulation der Glykosylierung und EGFR-Aktivität verstärkt (es wurde nicht die NI, sondern die allgemeine Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration erforscht). Es wurde demnach eine Erhöhung der *GALNT2*-Expression an der Migration-Front festgestellt (Lin et al., 2014). Es wurde nachgewiesen, dass *Galnt2* während der Embryogenese der Maus im Nervengewebe exprimiert wird. Die erhöhte *Galnt2*-Expression korreliert mit dem histologischen Grad der Tumordifferenzierung sowie mit dem jüngeren Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, einem früheren klinischen Stadium. Eine Mehrfaktorenanalyse zeigte, dass die *Galnt2*-Expression ein unabhängiger prognostischer Faktor für eine bessere Überlebensrate bei Patienten mit einem Neuroblastom ist. Die erhöhte *Galnt2*-Expression unterdrückte das *IGF-1*-induzierte Zellenwachstum sowie die Migration und die Invasion der Neuroblastomzellen, während der *Galnt2*-Knockdown diese Eigenschaften

verstärkte (Ho et al., 2014). In der *in silico*-Analyse wurde eine Veränderung der *GALNT2*-Expression in den Mustern der serösen Tumore des Ovar (HGSC) im Vergleich zum normalen Gewebe der Eierstöcke festgestellt (Sheta et al., 2017).

Es gibt auch Daten über den Einfluss von *ST3GAL6* auf die Fähigkeit zur Migration und Metastasierung. Die *ST3GAL6*-Expression war im Kolonkarzinom verringert. Sie vermittelten die Sialisierung, inhibierten die Aktivierung der Übermittlung der Signale PI3K/AKT/mTOR und führten somit zur nukleären Translokation von FOXO1 in den Kolonkarzinomzellen (Hu et al., 2019). Die *ST3GAL6*-Expression verringerte auch die Proliferation und Metastasierung und förderte die Apoptose der Kolonkarzinomzellen *in vitro*. Die Erhöhung der *ST3GAL6*-Expression verringerte deutlich die Onkogenese und Metastasierung der Kolonkarzinomzellen in die Lunge und die Leber *in vivo* (Hu et al., 2019). Die Expression selbst war im HCC deutlich verringert (Souady et al., 2011). Die veränderte *ST3GAL6*-Expression korreliert mit der Proliferation, der Migration und der Fähigkeit der Zellen zur Invasion in HCC. Auf diese Weise konnte das Wachstum, die Migration und die Invasion der Zellen gefördert und die Wirkung von miR-26a über den Signalweg PI3K/AKT/mTOR im HCC vermittelt werden (Sun et al., 2017). Einige Arbeiten weisen auch den Einfluss der *ST3GAL6*-Expression auf die Proliferation und die Migration der Zellen des Mammakarzinoms sowie die Fähigkeit zur Metastasierung des Mammakarzinoms nach (Julien et al., 2011; Rengasamy et al., 2017).

Im Fall der Dysfunktion der O-Glykosylierung über den normalen Weg kommt es zur Expression des Tn-Antigens, welches in den meisten humanen Karzinomen aller Typen aufgefunden wird. Eine wichtige Rolle bei der Bildung des Tn-Antigens spielt die T-Synthase. Für die Entstehung einer aktiven Form der T-Synthase ist ein einzigartiges molekuläres Chaperon „COSMC“ erforderlich. Das COSMC verhindert der Proteasom-abhängigen Degradation der neu synthetisierten T-Synthase vor. Der Expressionsverlust der aktiven T-Synthase oder des *COSMC* kann zur Expression des Tn-Antigens führen zusätzlich zu

sialylierten Version des Antigens sialyl-Tn. Die Membranglycoproteine, die das Tn-Antigen tragen, können wegen der Degradation oder falscher Kompaktierung dysfunktional sein (Ju et al., 2014). Das Tn-Antigen stellt ein mit dem PDAC assoziiertes Glykan dar, das in 75–90% des PDAC gefunden wurde. Die Rolle der Expression des Tn-Antigens im PDAC ist nicht ausreichend erforscht. In der Arbeit von Hofmann wurde in zwei humanen PDAC-Zelllinien der Einfluss der COSMC-vermittelten Expression des Tn-Antigens im PDAC auf die onkogenen Eigenschaften gezeigt (Hofmann et al., 2015). Die Expression des Tn-Antigens auf den O-glykosylierten Proteinen in den Pankreaskarzinomzellen wurde durch den *COSMC*-Knockdown induziert. Nach dem *COSMC*-Knockdown wurde die Apoptose verringert, während die Migration erhöht war, was die Wichtigkeit der Expression des Tn-Antigens in Bezug auf die Metastasierung und auf das antiapoptische Verhalten der PDAC-Zellen betont (Hofmann et al., 2015). Die Aktivierung eines ungewöhnlichen Weges der Glykosylierung in den Tumorzellen kann zur Expression des Sialil-Tn(sTn)-Antigens führen. Das sTn ist ein verkürztes O-Glykan, das die Sialinsäure α 2,6 enthält, die mit GalNAc α -O-Ser/Thr verknüpft ist, und wird mit einem ungünstigen Ausgang und einer schlechten Prognose bei Krebskranken assoziiert (Radhakrishnan et al., 2014, Munkley, 2016). Die Biosynthese des sTn-Antigens hängt mit der Sialyltransferase-Expression sowie mit dem Verlust der Heterozygotie des Gens *COSMC* zusammen. Die Neo- oder Überexpression von sTn entsteht bei vielen Tumortypen, unter anderem beim Magen-, Dickdarm-, Mamma-, Lungen-, Speiseröhren-, Prostata- und Endometriumkarzinom. Dabei findet sich sTn-Antigen auf verschiedenen Glykoproteinen. Es beeinflusst so die Funktion des Proteins und ist an der Entwicklung des Tumors beteiligt (Munkley, 2016). In Bezug auf das Kolonkarzinom wurden interessante Daten gewonnen: Die Expression des Tn-Antigens induzierte eine typische Aktivierung der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Es wurde entdeckt, dass die Anzahl an *H-RAS*, das bekanntlich die EMT steuert, in Tn-positiven Zellen relevant erhöht war, während der *H-RAS*-Knockdown die durch das Tn-Antigen induzierte EMT-Aktivierung unterdrückt. Darüber hinaus wiesen die Zellen, die

kein Tn-Antigen exprimieren, eine Herunterregulation der *H-RAS*-Expression und eine darauffolgende Inhibierung des EMT-Prozesses auf (Liu et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in der vorliegenden Dissertation gelang, die Möglichkeit der Verwendung der Insertionsmutagenese für die Entdeckung der NI-relevanten Genveränderungen im PDAC aufzuzeigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenso erreicht, den Einfluss von *GALNT2* und *ST3GAL6* auf die neurale Invasion im PDAC nachzuweisen und eine spezifische Migration der PDAC-Zellen mit dem *Galnt2*- und *St3Gal6*-Knockout zu DRG zu zeigen, was wiederum den Einfluss dieser beiden Gene nicht nur auf die allgemeine Migrationsfähigkeit, sondern auch auf die Veränderung der Neuroaffinität und auf die Fähigkeit zur NI im PDAC anschaulich macht. Solche Glykosylierungsstörungen üben Einfluss auf die Anreicherung der Tn- und sTn-Antigene sowie auf die Funktionsstörung der Signalwege aus. Der Grad der Glykosylierungsstörungen korreliert mit dem Bösartigkeitsgrad des Tumors, mit seiner Wachstumsgeschwindigkeit, mit der Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten betonen den Einfluss der Glykosylierungsstörungen auf die Fähigkeit der PDAC-Zellen zur NI und bieten einen Nährboden zur Erforschung der Glykosylierung im Rahmen der NI; ein nächster Schritt könnte die Erforschung eines genetisch induzierten Mausmodells des PDAC mit dem *Galnt2*-, *St3Gal6*-, oder *Cosmc*-Knockout sein.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist aggressive Tumorerkrankung mit absoluter 5-Jahres-Überlebensrate von 9%. Höhe Lokalrezidivrate und chronische Schmerzen auf Grund der neuralen Invasion sind die Eigenschaften des PDAC. NI trifft in 100% Fälle des Pankreaskarzinoms und ist ein der Faktoren der schlechten Prognose. Der genetische Hintergrund der NI im PDAC ist nicht bekannt. In Zusammenhang mit der vorliegenden medizinischen Dissertation wurde erstmals die Insertionsmutagenese zum Zweck des Screenings auf die NI-förderten genetischen Veränderungen in PDAC verwendet. Die PiggyBac-Transposon-Mutagenese zusammen mit der Aktivierung des Onkogens *Kras* ermöglichte die Herstellung einer genetisch unterschiedlichen Gruppe von Mäusen mit PDAC im *Pdx1-Cre; Rosa26^{LSL-PB}; Kras^{LSL-G12D/+}; ATP1* Mausmodell. Es erfolgte die Isolation der PDAC-Zellen von den Mäusen, die Testung ihrer Affinität zur DRG im 3D-Migrationassay und der Vergleich der Insertionsstellen der Transposons in Zellen mit hoher und schwacher Neuroaffinität. Die Tumorzellen mit den Insertionsstellen von Transposons in den Glykosylierungsgenen *Galnt2* und *St3Gal6* zeigten die höchste Neuroaffinität in unserem 3D-Migrationassay.

Weitere Experimente in der Zellkultur haben die Rolle der Glykosylierungsgenen *Galnt2* und *St3Gal* in NI bestätigt. Mit Hilfe von CRISPR/Cas9 konnten die Glykosylierungsgene *Galnt2* und *St3Gal6* in PDAC-Tumorzelllinien vom *Pdx1-Cre; Rosa26^{LSL-PB}; Kras^{LSL-G12D/+}; ATP1* Mausmodell herunterreguliert werden. Die PDAC-Zellen mit dem Knockout von *Galnt2* und *St3Gal6* haben höhere Neuroaffinität im 3D-Migrationassay gezeigt.

Die Ergebnisse konnten in den humanen PDAC-Proben bestätigt werden. In Gewebe von Patienten mit PDAC konnte die Färbeintensität mittels Densitometrie nach immunhistochemischer Färbung gegen GALNT2 oder ST3GAL6 in Bereichen „Tumorzellen am Nerv“ und „Tumorzellen weg vom Nerv“ verglichen werden. Die PDAC-Zellen, die NI aufweisen, zeigten eine geringere Färbeintensität von GALNT2 und ST3GAL6. Eine

Untersuchung der *GALNT2*-, *ST3GAL6*-Expression in humanen PDAC-Proben brachte das Ergebnis, dass das Expressionsniveau von beiden Glykosylierungsgenen im PDAC niedriger als im NP ist.

In der vorliegenden medizinischen Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Insertionsmutagenese für das Screening auf die NI-assoziierten Onkogene verwendet werden kann. Das Verständnis des Mechanismus hinter der Wirkung der Glykosylierungsstörungen auf die NI im PDAC kann für die Behandlung und die Verbesserung der Prognose beim PDAC verwendet werden.

7. Quellenverzeichnis

- Agarwal, B., Abu-Hamda, E., Molke, K. L., Correa, A. M., Ho, L. (2004). Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 99(5), 844-850.
- Alexakis, N., Halloran, C., Raraty, M., Ghaneh, P., Sutton, R., Neoptolemos, J. P. (2004). Current standards of surgery for pancreatic cancer. *Br J Surg*, 91(11), 1410-1427.
- Assfalg, V., Hüser, N., Michalski, C., Gillen, S., Kleeff, J., Friess, H. (2011). "Palliative interventional and surgical therapy for unresectable pancreatic cancer." *Cancers (Basel)* 14;3(1): 652-61.
- Bakkevold, K. E., Arnesjo, B., Dahl, O., Kambestad, B. (1993). "Adjuvant combination chemotherapy (AMF) following radical resection of carcinoma of the pancreas and papilla of Vater – results of a controlled, prospective, randomised multicentre study." *Eur J Cancer* 29A(5): 698-703.
- Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H., Lucas, A. L. (2014). Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*, 20(32), 11182-11198.
- Bessereau, J. L. (2006). "Transposons in *C. elegans*." *WormBook*: 1-13.
- Bockman, D. E., Buchler, M., Beger, H. G. (1994). Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Gastroenterology*, 107(1), 219-230.
- Brown, D. L., Bulley, C. K., Quiel, E. L. (1987). Neurolytic celiac plexus block for pancreatic cancer pain. *Anesth Analg*, 66(9), 869-873.
- Burris, H. A., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., Cripps, M. C., Portenoy, R. K., Storniolo, A. M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F. A., Stephens, C. D., Von Hoff, D. D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit

- with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, 15(6), 2403-2413.
- Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E., Fraser, M. J. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 172(1), 156-169.
- Catalano, C., Laghi, A., Fraioli, F., Pediconi, F., Napoli, A., Danti, M., Reitano, I., Passariello, R. (2003). Pancreatic carcinoma: the role of high-resolution multislice spiral CT in the diagnosis and assessment of resectability. *Eur Radiol*, 13(1), 149-156.
- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., Muller, M. W., Giese, T., Buchler, M. W., Giese, N. A., Friess, H. (2009). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177-186 e171.
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Muller, M. W., Giese, N. A., Friess, H., Schafer, K. H. (2008). Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 374(3), 442-447.
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Muller, M. W., Buchler, M. W., Friess, H., Schafer, K. H. (2009). Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*, 104(10), 2555-2565.
- Ceyhan, G. O., Giese, N. A., Erkan, M., Kerscher, A. G., Wente, M. N., Giese, T., Buchler, M. W., Friess, H. (2006). The neurotrophic factor artemin promotes pancreatic cancer invasion. *Ann Surg*, 244(2), 274-281.
- Chatterjee, D., Katz, M. H., Rashid, A., Varadhachary, G. R., Wolff, R. A., Wang, H., Lee, J. E., Pisters, P. W., Vauthey, J. N., Crane, C., Gomez, H. F., Abbruzzese, J. L., Fleming, J. B., Wang, H. (2012). Histologic grading of the extent of residual carcinoma following

- neoadjuvant chemoradiation in pancreatic ductal adenocarcinoma: a predictor for patient outcome. *Cancer*, *118*(12), 3182-3190.
- Christiansen, M. N., Chik, J., Lee L., Anugraham M., Abrahams J. L., Packer N. H. (2014). "Cell surface protein glycosylation in cancer." *Proteomics* *14*: 525–546.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Pere-Verge, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., Ducreux, M., Groupe Tumeurs Digestives of U., Intergroup, P. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*, *364*(19), 1817-1825.
- Coughlin, S. S., Calle, E. E., Patel, A. V., Thun, M. J. (2000). Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes Control*, *11*(10), 915-923.
- Cruveilheir, J. (1835). "Maladie des nerfs." *Anatomie Pathologique du Corps Humain*, 2nd ed. p. 3.
- Dang, C., Zhang, Y., Ma, Q., Shimahara, Y. (2006). Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, *21*(5), 850-858.
- Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Liebl, F., D'Haese, J. G., Maak, M., Friess, H. (2010). Neural invasion in pancreatic cancer: the past, present and future. *Cancers (Basel)*, *2*(3), 1513-1527.
- Demir, I. E., Friess, H. (2015). Pancreatic cancer - lessons from the past decade. *Indian J Med Paediatr Oncol*, *36*(2), 73-76.
- Derse, D., Crise, B., Li, Y., Princler, G., Lum, N., Stewart, C., McGrath, C. F., Hughes, S. H., Munroe, D. J., Wu, X. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 integration target

- sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J Virol*, 81(12), 6731-6741.
- Deshmukh, S. D., Willmann, J. K., Jeffrey, R. B. (2010). "Pathways of extrapancreatic perineural invasion by pancreatic adenocarcinoma: evaluation with 3D volume-rendered MDCT imaging." *AJR Am J Roentgenol* 194(3): 668-674.
- Dewitt, J., Devereaux, B. M., Lehman, G. A., Sherman, S., Imperiale, T. F. (2006). Comparison of endoscopic ultrasound and computed tomography for the preoperative evaluation of pancreatic cancer: a systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4(6), 717-725; quiz 664.
- Di Stasi, M., Lencioni, R., Solmi, L., Magnolfi, F., Caturelli, E., De Sio, I., Salmi, A., Buscarini, L. (1998). Ultrasound-guided fine needle biopsy of pancreatic masses: results of a multicenter study. *Am J Gastroenterol*, 93(8), 1329-1333.
- Ding, S., Wu, X., Li, G., Han, M., Zhuang, Y., Xu, T. (2005). Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 122(3), 473-483.
- Ernst, P. (1905). "Über das wachstum und die verbreitung bösartiger geschwülste insbesondere des krebsses in den lymphbahnen der nerven." *Beitr. Pathol. Anat.* 7, 29.
- Fangmann, L., Teller, S., Stupakov, P., Friess, H., Ceyhan, G. O., Demir, I. E. (2018). 3D Cancer Migration Assay with Schwann Cells. *Methods Mol Biol*, 1739, 317-325.
- Farnell, M. B., Pearson, R. K., Sarr, M. G., DiMagno, E. P., Burgart, L. J., Dahl, T. R., Foster, N., Sargent, D. J., Pancreas Cancer Working, G. (2005). A prospective randomized trial comparing standard pancreatoduodenectomy with pancreatoduodenectomy with extended lymphadenectomy in resectable pancreatic head adenocarcinoma. *Surgery*, 138(4), 618-628; discussion 628-630.
- Feng, X. B., Zheng, Z. W., Zhang, X., Gu, J., Feng, Q. L., Huang, L. H. (2018). Discovering genes responsible for silk synthesis in *Bombyx mori* by piggyBac-based random insertional mutagenesis. *Insect Sci.* 1-10.

- Friedrich, M. J., Rad, L., Bronner, I. F., Strong, A., Wang, W., Weber, J., Mayho, M., Ponstingl, H., Engleitner, T., Grove, C., Pfaus, A., Saur, D., Cadinanos, J., Quail, M. A., Vassiliou, G. S., Liu, P., Bradley, A., Rad, R. (2017). Genome-wide transposon screening and quantitative insertion site sequencing for cancer gene discovery in mice. *Nat Protoc*, *12*(2), 289-309.
- Fuchs, C. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., Hunter, D. J., Rimm, E. B., Willett, W. C., Speizer, F. E. (1996). A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med*, *156*(19), 2255-2260.
- Ghaneh, P., Costello, E., Neoptolemos, J. P. (2008). Biology and management of pancreatic cancer. *Postgrad Med J*, *84*(995), 478-497.
- Gil, Z., Cavel, O., Kelly, K., Brader, P., Rein, A., Gao, S. P., Carlson, D. L., Shah, J. P., Fong, Y., Wong, R. J. (2010). Paracrine regulation of pancreatic cancer cell invasion by peripheral nerves. *J Natl Cancer Inst*, *102*(2), 107-118.
- Glavey, S. V., Manier, S., Natoni, A., Sacco, A., Moschetta, M., Reagan, M. R., Murillo, L. S., Sahin, I., Wu, P., Mishima, Y., Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, Y., Morgan, G., Joshi, L., Roccaro, A. M., Ghobrial, I. M., O'Dwyer, M. E. (2014). "The sialyltransferase ST3GAL6 influences homing and survival in multiple myeloma." *Blood* *124*(11): 1765-1776.
- Goh, S. K., Gold, G., Christophi, C., Muralidharan, V. (2017). Serum carbohydrate antigen 19-9 in pancreatic adenocarcinoma: a mini review for surgeons. *ANZ J Surg*, *87*(12), 987-992.
- Goonetilleke, K. S., Siriwardena, A. K. (2007). Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol*, *33*(3), 266-270.

- Gress, F., Gottlieb, K., Sherman, S., Lehman, G. (2001). Endoscopic ultrasonography-guided fine-needle aspiration biopsy of suspected pancreatic cancer. *Ann Intern Med*, 134(6), 459-464.
- Hirai, I., Kimura, W., Ozawa, K., Kudo, S., Suto, K., Kuzu, H., Fuse, A. (2002). Perineural invasion in pancreatic cancer. *Pancreas*, 24(1), 15-25.
- Ho, W. L., Chou, C. H., Jeng, Y. M., Lu, M. Y., Yang, Y. L., Jou, S. T., Lin, D. T., Chang, H. H., Lin, K. H., Hsu, W. M., Huang, M. C. (2014). GALNT2 suppresses malignant phenotypes through IGF-1 receptor and predicts favorable prognosis in neuroblastoma. *Oncotarget*, 5(23), 12247-12259.
- Hofmann, B. T., Schluter, L., Lange, P., Mercanoglu, B., Ewald, F., Folster, A., Picksak, A. S., Harder, S., El Gammal, A. T., Grupp, K., Gungor, C., Drenckhan, A., Schluter, H., Wagener, C., Izbicki, J. R., Jucker, M., Bockhorn, M., Wolters-Eisfeld, G. (2015). COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 14, 109.
- Hu, J., Shan, Y., Ma, J., Pan, Y., Zhou, H., Jiang, L., Jia, L. (2019). LncRNA ST3Gal6-AS1/ST3Gal6 axis mediates colorectal cancer progression by regulating alpha-2,3 sialylation via PI3K/Akt signaling. *Int J Cancer*.
- Hu, W. T., Yeh, C. C., Liu, S. Y., Huang, M. C., Lai, I. R. (2018). The O-glycosylating enzyme GALNT2 suppresses the malignancy of gastric adenocarcinoma by reducing EGFR activities. *Am J Cancer Res*, 8(9), 1739-1751.
- Hüser N., Michalski C. W., Schuster, T., Friess, H., Kleeff, J. (2009). " Systematic review and meta-analysis of prophylactic gastroenterostomy for unresectable advanced pancreatic cancer." *Br J Surg* 96(7): 711-9.
- Ivics, Z., Hackett, P. B., Plasterk, R. H., Izsvak, Z. (1997). Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91(4), 501-510.

- Ivics, Z., Li, M. A., Mates, L., Boeke, J. D., Nagy, A., Bradley, A., Izsvak, Z. (2009). Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat Methods*, 6(6), 415-422.
- Jentzer, A. (1930). "Neurotropisme des cellules cancéreuses: Clinique et thérapeutique des cancers neurotropes." *Med. Wochenschr.* 60: 1050–1052.
- Ju, T., Aryal, R. P., Kudelka, M. R., Wang, Y., Cummings, R. D. (2014). The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomark*, 14(1), 63-81.
- Julien, S., Ivetic, A., Grigoriadis, A., QiZe, D., Burford, B., Sproviero, D., Picco, G., Gillett, C., Papp, S. L., Schaffer, L., Tutt, A., Taylor-Papadimitriou, J., Pinder, S. E., Burchell, J. M. (2011). Selectin ligand sialyl-Lewis x antigen drives metastasis of hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res*, 71(24), 7683-7693.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Haberland, J., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U. (2015). "Krebs in Deutschland 2011/2012." *Deutschen Nationalbibliografie*.
- Kayahara, M., Nagakawa, T., Ueno, K., Ohta, T., Tsukioka, Y., Miyazaki, I. (1995). "Surgical strategy for carcinoma of the pancreas head area based on clinicopathologic analysis of nodal involvement and plexus invasion." *Surgery* 117(6):616-23.
- Kayahara, M., Nakagawara, H., Kitagawa, H., Ohta, T. (2007). The nature of neural invasion by pancreatic cancer. *Pancreas*, 35(3), 218-223.
- Kool, J., Berns, A. (2009). "High-throughput insertional mutagenesis screens in mice to identify oncogenic networks." *Nat Rev Cancer* 9(6): 389-399.
- Larson, D. L., Rodin, A. E., Roberts, D. K., O'Steen, W. K., Rapperport, A. S., Lewis, S. R. (1966). Perineural lymphatics: myth or fact. *Am J Surg*, 112(4), 488-492.

- Levy, M. J., Topazian, M., Keeney, G., Clain, J. E., Gleeson, F., Rajan, E., Wang, K. K., Wiersema, M. J., Farnell, M., Chari, S. (2006). Preoperative diagnosis of extrapancreatic neural invasion in pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4(12), 1479-1482.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., Abbruzzese, J. L. (2004). Pancreatic cancer. *Lancet*, 363(9414), 1049-1057.
- Li, M. A., Pettitt, S. J., Eckert, S., Ning, Z., Rice, S., Cadinanos, J., Yusa, K., Conte, N., Bradley, A. (2013). The piggyBac transposon displays local and distant reintegration preferences and can cause mutations at noncanonical integration sites. *Mol Cell Biol*, 33(7), 1317-1330.
- Li, M. A., Turner, D. J., Ning, Z., Yusa, K., Liang, Q., Eckert, S., Rad, L., Fitzgerald, T. W., Craig, N. L., Bradley, A. (2011). Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res*, 39(22), e148.
- Liang, Q., Kong, J., Stalker, J., Bradley, A. (2009). Chromosomal mobilization and reintegration of Sleeping Beauty and PiggyBac transposons. *Genesis*, 47(6), 404-408.
- Lin, M. C., Huang, M. J., Liu, C. H., Yang, T. L., Huang, M. C. (2014). GALNT2 enhances migration and invasion of oral squamous cell carcinoma by regulating EGFR glycosylation and activity. *Oral Oncol*, 50(5), 478-484.
- Lin, P. W., Lin, Y. J. (1999). "Prospective randomized comparison between pylorus-preserving and standard pancreaticoduodenectomy." *Br J Surg* 86(5): 603-607.
- Liu, B., Lu, K. Y. (2002). "Neural invasion in pancreatic carcinoma." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 1(3): 469-476.
- Liu, S. Y., Shun, C. T., Hung, K. Y., Juan, H. F., Hsu, C. L., Huang, M. C., Lai, I. R. (2016). Mucin glycosylating enzyme GALNT2 suppresses malignancy in gastric adenocarcinoma by reducing MET phosphorylation. *Oncotarget*, 7(10), 11251-11262.

- Liu, Z., Liu, J., Dong, X., Hu, X., Jiang, Y., Li, L., Du, T., Yang, L., Wen, T., An, G., Feng, G. (2019). Tn antigen promotes human colorectal cancer metastasis via H-Ras mediated epithelial-mesenchymal transition activation. *J Cell Mol Med*, 23(3), 2083-2092.
- Loos, M., Kleeff, J., Friess, H., Buchler, M. W. (2008). Surgical treatment of pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1138, 169-180.
- Maire, F., Hammel, P., Ponsot, P., Aubert, A., O'Toole, D., Hentic, O., Levy, P., Ruszniewski, P. (2006). Long-term outcome of biliary and duodenal stents in palliative treatment of patients with unresectable adenocarcinoma of the head of pancreas. *Am J Gastroenterol*, 101(4), 735-742.
- Makino, I., Kitagawa, H., Ohta, T., Nakagawara, H., Tajima, H., Ohnishi, I., Takamura, H., Tani, T., Kayahara, M. (2008). Nerve plexus invasion in pancreatic cancer: spread patterns on histopathologic and embryological analyses. *Pancreas*, 37(4), 358-365.
- Mallinson, C. N., Rake, M. O., Cocking, J. B., Fox, C. A., Cwynarski, M. T., Diffey, B. L., Jackson, G. A., Hanley, J., Wass, V. J. (1980). Chemotherapy in pancreatic cancer: results of a controlled, prospective, randomised, multicentre trial. *Br Med J*, 281(6255), 1589-1591.
- Marchesi, F., Piemonti, L., Fedele, G., Destro, A., Roncalli, M., Albarello, L., Doglioni, C., Anselmo, A., Doni, A., Bianchi, P., Laghi, L., Malesci, A., Cervo, L., Malosio, M., Reni, M., Zerbi, A., Di Carlo, V., Mantovani, A., Allavena, P. (2008). The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 68(21), 9060-9069.
- Minniti, S., Bruno, C., Biasiutti, C., Tonel, D., Falzone, A., Falconi, M., Procacci, C. (2003). Sonography versus helical CT in identification and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Ultrasound*, 31(4), 175-182.

- Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., Ecker, J. R., Bushman, F. D. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, 2(8), E234.
- Mollberg, N., Rahbari N. N., Koch, M., Hartwig, W., Hoeger, Y., Büchler, M. W., Weitz, J. (2011). "Arterial resection during pancreatectomy for pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis." *Ann Surg* 254(6):882-93.
- Morohoshi, T., Held, G., Kloppel, G. (1983). Exocrine pancreatic tumours and their histological classification. A study based on 167 autopsy and 97 surgical cases. *Histopathology*, 7(5), 645-661.
- Munkley, J. (2016). "The Role of Sialyl-Tn in Cancer." *Int J Mol Sci* 17(3): 275.
- Mutumwinka, D., Zhao, S. B., Liu, Y. S., Mensah, E. O., Gao, X. D., Fujita, M. (2018). PiggyBac-based screening identified BEM4 as a suppressor to rescue growth defects in och1-disrupted yeast cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 82(9), 1497-1507.
- Nakao, A., Harada, A., Nonami, T., Kaneko, T., Takagi, H. (1996). Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas*, 12(4), 357-361.
- Nakao, A., Kaneko, T., Takeda, S., Inoue, S., Harada, A., Nomoto, S., Ekmel, T., Yamashita, K., Hatsuno, T. (2001). The role of extended radical operation for pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology*, 48(40), 949-952.
- Neil, J. C., Cameron, E. R. (2002). Retroviral insertion sites and cancer: fountain of all knowledge? *Cancer Cell*, 2(4), 253-255.
- Neoptolemos, J. P., Cunningham, D., Friess, H., Bassi, C., Stocken, D. D., Tait, D. M., Dunn, J. A., Dervenis, C., Lacaine, F., Hickey, H., Raraty, M. G. T., Ghaneh, P., Büchler, M. W. (2003). "Adjuvant therapy in pancreatic cancer: historical and current perspectives." *Ann Oncol* 14(5): 675-692.

- Nishiharu, T., Yamashita, Y., Abe, Y., Mitsuzaki, K., Tsuchigame, T., Nakayama, Y., Takahashi, M. (1999). Local extension of pancreatic carcinoma: assessment with thin-section helical CT versus with breath-hold fast MR imaging--ROC analysis. *Radiology*, 212(2), 445-452.
- Palmer, K. R., Kerr, M., Knowles, G., Cull, A., Carter, D. C., Leonard, R. C. (1994). Chemotherapy prolongs survival in inoperable pancreatic carcinoma. *Br J Surg*, 81(6), 882-885.
- Pedrazzoli, S., DiCarlo, V., Dionigi, R., Mosca, F., Pederzoli, P., Pasquali, C., Kloppel, G., Dhaene, K., Michelassi, F. (1998). Standard versus extended lymphadenectomy associated with pancreatoduodenectomy in the surgical treatment of adenocarcinoma of the head of the pancreas: a multicenter, prospective, randomized study. Lymphadenectomy Study Group. *Ann Surg*, 228(4), 508-517.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res.* 29(9): e45.
- Phoa, S. S., Tilleman, E. H., van Delden, O. M., Bossuyt, P. M., Gouma, D. J., Lameris, J. S. (2005). Value of CT criteria in predicting survival in patients with potentially resectable pancreatic head carcinoma. *J Surg Oncol*, 91(1), 33-40.
- Prat, F., Chapat, O., Ducot, B., Ponchon, T., Fritsch, J., Choury, A. D., Pelletier, G., Buffet, C. (1998). Predictive factors for survival of patients with inoperable malignant distal biliary strictures: a practical management guideline. *Gut*, 42(1), 76-80.
- Rad, R., Rad, L., Wang, W., Cadinanos, J., Vassiliou, G., Rice, S., Campos, L. S., Yusa, K., Banerjee, R., Li, M. A., de la Rosa, J., Strong, A., Lu, D., Ellis, P., Conte, N., Yang, F. T., Liu, P., Bradley, A. (2010). PiggyBac transposon mutagenesis: a tool for cancer gene discovery in mice. *Science*, 330(6007), 1104-1107.
- Rad, R., Rad, L., Wang, W., Strong, A., Ponstingl, H., Bronner, I. F., Mayho, M., Steiger, K., Weber, J., Hieber, M., Veltkamp, C., Eser, S., Geumann, U., Ollinger, R., Zukowska,

- M., Barenboim, M., Maresch, R., Cadinanos, J., Friedrich, M., Varela, I., Constantino-Casas, F., Sarver, A., Ten Hoeve, J., Prosser, H., Seidler, B., Bauer, J., Heikenwalder, M., Metzakopian, E., Krug, A., Ehmer, U., Schneider, G., Knosel, T., Rummele, P., Aust, D., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Ning, Z., Wessels, L., Schmid, R. M., Quail, M. A., Vassiliou, G., Esposito, I., Liu, P., Saur, D., Bradley, A. (2015). A conditional piggyBac transposition system for genetic screening in mice identifies oncogenic networks in pancreatic cancer. *Nat Genet*, 47(1), 47-56.
- Radhakrishnan, P., Dabelsteen, S., Madsen, F. B., Francavilla, C., Kopp, K. L., Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Olsen, J. V., Hansen, L., Bennett, E. P., Woetmann, A., Yin, G., Chen, L., Song, H., Bak, M., Hlady, R. A., Peters, S. L., Opavsky, R., Thode, C., Qvortrup, K., Schjoldager K. T.-B. G., Clausen, H., Hollingsworth, M. A., Wandall, H. H. (2014). "Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(39):E4066-75.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 8(11), 2281-2308.
- Rengasamy, M., Zhang, F., Vashisht, A., Song, W. M., Aguilo, F., Sun, Y., Li, S., Zhang, W., Zhang, B., Wohlschlegel, J. A., Walsh, M. J. (2017). The PRMT5/WDR77 complex regulates alternative splicing through ZNF326 in breast cancer. *Nucleic Acids Res*, 45(19), 11106-11120.
- Riediger, H., Makowiec, F., Fischer, E., Adam, U., Hopt, U. T. (2006). Postoperative morbidity and long-term survival after pancreaticoduodenectomy with superior mesenterico-portal vein resection. *J Gastrointest Surg*, 10(8), 1106-1115.
- Seiler, C. A., Wagner, M., Bachmann, T., Redaelli, C. A., Schmied, B., Uhl, W., Friess, H., Buchler, M. W. (2005). Randomized clinical trial of pylorus-preserving duodenopancreatectomy versus classical Whipple resection-long term results. *Br J Surg*, 92(5), 547-556.

- Seiler, C. A., Wagner, M., Sadowski, C., Kulli, C., Buchler, M. W. (2000). Randomized prospective trial of pylorus-preserving vs. Classic duodenopancreatectomy (Whipple procedure): initial clinical results. *J Gastrointest Surg*, 4(5), 443-452.
- Sheta, R., Bachvarova, M., Plante, M., Gregoire, J., Renaud, M. C., Sebastianelli, A., Popa, I., Bachvarov, D. (2017). Altered expression of different GalNAc transferases is associated with disease progression and poor prognosis in women with high-grade serous ovarian cancer. *Int J Oncol*, 51(6), 1887-1897.
- Shore, S., Raraty, M. G., Ghaneh, P., Neoptolemos, J. P. (2003). Review article: chemotherapy for pancreatic cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, 18(11-12), 1049-1069.
- Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 62(1), 10-29.
- Souady, J., Hulsewig, M., Distler, U., Haier, J., Denz, A., Pilarsky, C., Senninger, N., Dreisewerd, K., Peter-Katalinic, J., Muthing, J. (2011). Differences in CD75s- and iso-CD75s-ganglioside content and altered mRNA expression of sialyltransferases ST6GAL1 and ST3GAL6 in human hepatocellular carcinomas and nontumoral liver tissues. *Glycobiology*, 21(5), 584-594.
- St. Johnston, D. (2002). "The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*." *Nat Rev Genet* 3(3): 176-188.
- Sun, M., Zhao, X., Liang, L., Pan, X., Lv, H., Zhao, Y. (2017). Sialyltransferase ST3GAL6 mediates the effect of microRNA-26a on cell growth, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma through the protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer Sci*, 108(2), 267-276.
- Takahashi, T., Ishikura, H., Kato, H., Tanabe, T., Yoshiki, T. (1992). Intra-pancreatic, extra-tumoral perineural invasion (nex). An indicator for the presence of retroperitoneal neural plexus invasion by pancreas carcinoma. *Acta Pathol Jpn*, 42(2), 99-103.

- Takahashi, T., Ishikura, H., Motohara, T., Okushiba, S., Dohke, M., Katoh, H. (1997). Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol*, 65(3), 164-170.
- Takeda, H., Wei, Z., Koso, H., Rust, A. G., Yew, C. C., Mann, M. B., Ward, J. M., Adams, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. (2015). Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression. *Nat Genet*, 47(2), 142-150.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L., Ryner, L., Cheung, L. M., Chong, A., Erickson, C., Fisher, W. W., Greer, K., Hartouni, S. R., Howie, E., Jakkula, L., Joo, D., Killpack, K., Laufer, A., Mazzotta, J., Smith, R. D., Stevens, L. M., Stuber, C., Tan, L. R., Ventura, R., Woo, A., Zakrajsek, I., Zhao, L., Chen, F., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Winberg, M. L., Margolis, J. (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet*, 36(3), 283-287.
- Tran, K. T., Smeenk, H. G., van Eijck, C. H., Kazemier, G., Hop, W. C., Greve, J. W., Terpstra, O. T., Zijlstra, J. A., Klinkert, P., Jeekel, H. (2004). Pylorus preserving pancreaticoduodenectomy versus standard Whipple procedure: a prospective, randomized, multicenter analysis of 170 patients with pancreatic and periampullary tumors. *Ann Surg*, 240(5), 738-745.
- Treede, R. D., Jensen, T. S., Campbell, J. N., Cruccu, G., Dostrovsky, J. O., Griffin, J. W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., Serra, J. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*, 70(18), 1630-1635.
- Tseng, J. F., Raut, C. P., Lee, J. E., Pisters, P. W., Vauthey, J. N., Abdalla, E. K., Gomez, H. F., Sun, C. C., Crane, C. H., Wolff, R. A., Evans, D. B. (2004). Pancreaticoduodenectomy with vascular resection: margin status and survival duration. *J Gastrointest Surg*, 8(8), 935-949; discussion 949-950.

- Wagner, M., Redaelli, C., Lietz, M., Seiler, C. A., Friess, H., Buchler, M. W. (2004). Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg*, *91*(5), 586-594.
- Wang, W., Lin, C., Lu, D., Ning, Z., Cox, T., Melvin, D., Wang, X., Bradley, A., Liu, P. (2008). Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(27), 9290-9295.
- Wang, Y., Lei, T., Dai, Q., Ding, P., Qiu, T., Fang, Y. (2018). Identification of Potential Molecular Determinants of Murine Embryonic Stem Cell Differentiation by a Transposon-Based Approach. *Mol Biotechnol*, *60*(11), 791-798.
- Warshaw, A. L., Fernandez-del Castillo, C. (1992). "Pancreatic carcinoma." *N Engl J Med* *326*(7): 455-465.
- Wong, G. Y., Schroeder, D. R., Carns, P. E., Wilson, J. L., Martin, D. P., Kinney, M. O., Mantilla, C. B., Warner, D. O. (2004). Effect of neurolytic celiac plexus block on pain relief, quality of life, and survival in patients with unresectable pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA*, *291*(9), 1092-1099.
- Wu, Y. M., Liu, C. H., Hu, R. H., Huang, M. J., Lee, J. J., Chen, C. H., Huang, J., Lai, H. S., Lee, P. H., Hsu, W. M., Huang, H. C., Huang, M. C. (2011). Mucin glycosylating enzyme GALNT2 regulates the malignant character of hepatocellular carcinoma by modifying the EGF receptor. *Cancer Res*, *71*(23), 7270-7279.
- Yi, S. Q., Miwa, K., Ohta, T., Kayahara, M., Kitagawa, H., Tanaka, A., Shimokawa, T., Akita, K., Tanaka, S. (2003). Innervation of the pancreas from the perspective of perineural invasion of pancreatic cancer. *Pancreas*, *27*(3), 225-229.
- Ying, J. E., Zhu, L. M., Liu, B. X. (2012). Developments in metastatic pancreatic cancer: is gemcitabine still the standard? *World J Gastroenterol*, *18*(8), 736-745.
- Zhang, Y., Dang, C., Ma, Q., Shimahara, Y. (2005). Expression of nerve growth factor receptors and their prognostic value in human pancreatic cancer. *Oncol Rep*, *14*(1), 161-171.

Zhang, Y., Frampton, A. E., Cohen, P., Kyriakides, C., Bong, J. J., Habib, N. A., Spalding, D. R., Ahmad, R., Jiao, L. R. (2012). Tumor infiltration in the medial resection margin predicts survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*, 16(10), 1875-1882.

Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Graber, H. U., Korc, M., Buchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J Clin Oncol*, 17(8), 2419-2428.

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Güralp O. Ceyhan bedanken. Dank Dir, fühlte ich mich ab dem ersten Tag als Teil einer großen Familie. Du warst immer für mich da, hast mich aufgebaut, mir unter die Arme gegriffen und mich stets motiviert.

Auch allen anderen Mitglieder gegenüber der AG Ceyhan möchte ich meinen Dank aussprechen. Vielen Dank an Ulrike Bourquain für die herzliche Aufnahme, Einweisung und Betreuung im Labor. Ich danke außerdem Dr. Steffen Teller für die Betreuung, Ratschläge und stetige Hilfestellung. Ich danke Ceren Mutgan, Nadja Märitz und Paulo Pfitzinger für ihre Erläuterungen und Hinweise.

Mein größtes Glück war es jedoch, PD Dr. Dr. Ihsan Ekin Demir als Mentor zu haben. Seit meinem ersten Tag im Labor hast auch Du mich unterstützt und gefördert. Deine außergewöhnlich gute Betreuung war für mich sehr wichtig – Du hast mir dort weitergeholfen, wo ich keine Lösung fand.

Ich danke Prof. Dr. Roland Rad und allen Mitgliedern seiner Forschungsgruppe für die Kooperation. Vielen Dank auch an Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Peter Janssen. Ohne Ihre einzigartige Unterstützung wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Helmut Friess. Sie haben sich stets die Zeit genommen, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, um mich sowohl in der Wissenschaft als auch in der Klinik auszubilden und mich beim Erreichen meiner Ziele zu unterstützen. Vielen Dank für die großzügige und liebevolle Unterstützung während meiner Zeit in der Klinik und noch weit darüber hinaus.

Danken möchte ich vor allem auch meiner großen Familie für die endlose Unterstützung und Liebe. Vielen Dank an meine Ehefrau Katia Fortunato, mit der wir während der Doktorarbeit unsere Familie gegründet haben.