

**II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar**
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**Ein SNAIL/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplex reprimiert die
E-cadherin Expression und reguliert die Metastasierung
des duktales Pankreaskarzinoms *in vivo***

Stefan Eser

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. D. K. M. Saur
2. apl. Prof. Dr. J. H. Kleeff
3. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 11.02.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III-IV
1 Einleitung	1-7
1.1 Das duktales Pankreaskarzinom	1-2
1.2 Die verschiedenen Schritte des Metastasierungsprozesses	2
1.3 Modelle der Metastasierung	2-5
1.4 E-cadherin und die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)	5-6
1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	7
2 Material und Methoden	8-35
2.1 Materialien	8-14
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	8-9
2.1.2 Kommerziell erhältliche Kits	10
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	10-11
2.1.4 Geräte und Instrumente	11-12
2.1.5 Puffer	12-13
2.1.6 Antikörper	13
2.1.7 Small interfering RNA (siRNA)	14
2.1.8 PCR-Primer und Oligonukleotidsonden	14
2.2 Experimentalmethoden	15-34
2.2.1 Mauslinien und genetisch definierte Tumormausmodelle	15
2.2.2 Generierung von murinen Pankreaskarzinomzelllinien	15-16
2.2.3 Zellkultur	16
2.2.4 Plasmide und Virus Präparation	16-17
2.2.5 Generierung von TD-2 ^{EGFP-fluc-TVA} Zellen	17-18
2.2.6 <i>in vivo</i> Selektion von hochgradig metastasierenden Zelllinien mittels eines experimentellen Metastasierungs Assays und multimodaler Bildgebung	18-20
2.2.7 Expression von dominant-negativem E-cadherin in TD-2 ^{EGFP-fluc-TVA} Zellen mittels retroviraler Transduktion	20
2.2.8 Kryokonservierung von Zelllinien	21
2.2.9 Orthotope Implantation muriner Pankreaskarzinomzellen	21-22
2.2.10 Transfektion, Inhibitorbehandlung und Epitheliale-Mesenchymale Transitions Assay	22-23
2.2.11 Ganzzellextrakte und Bradford Assay	23
2.2.12 Western Blotting mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24-25
2.2.13 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	25-27
2.2.14 Immunpräzipitation	28-29
2.2.15 Avidin-Biotin-Komplex-DNA Assay	29

2.2.16 Reverse-Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	29-30
2.2.17 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30-31
2.2.18 Genexpressionsanalysen (mRNA Microarray)	31-32
2.2.19 Histochemie, Immunhistochemie, und Immunzytochemie	32-34
2.2.20 Datenanalyse	34-35
3 Ergebnisse	36-61
3.1 <i>In vivo</i> Selektion von Pankreaskarzinomzellen mit hohem Lungenmetastasierungspotential	36-38
3.2. Die metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	38-41
3.3. Die metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 sind durch den Verlust des Adhäsionsproteins E-cadherin charakterisiert	41-42
3.4. Die Inhibition von Histondeacetylasen führt zu einer Reaktivierung der E-cadherin Expression	43-44
3.5 Ein Snail/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplex reprimiert die E-cadherin Expression in den metastatischen Subzelllinien	44-47
3.6 Der RNAi vermittelte Knockdown von Snail und HDAC2 induziert die Reexpression von E-cadherin in den metastatischen P-2 Zellen	47-48
3.7 Die genetische Inaktivierung von E-cadherin in parentalen TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen induziert EMT <i>in vitro</i> und erhöhte die Lungenmetastasierung <i>in vivo</i>	49-51
3.8 Murine metastatische Pankreaskarzinomzelllinien mit einer mesenchymalen Morphologie weisen ein mesenchymales Genexpressionsprofil auf	51-53
3.9 Die Herabregulierung von E-cadherin im murinen Pankreaskarzinom ist HDAC-vermittelt und mit EMT und Metastasierung assoziiert	53-57
3.10 HDAC Aktivität ist für die epigenetische Repression von E-cadherin im murinen und humanen Pankreaskarzinom essentiell	58-61
4 Diskussion	62-67
5 Zusammenfassung	68
6 Literaturverzeichnis	69-76
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	77-78
7.1 Tabellenverzeichnis	77
7.2 Abbildungsverzeichnis	77-78
Curriculum vitae	79

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza	5-Azacytidine	dn-E-cadherin	dominant-negatives E-cadherin Protein
A	Ampère	dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphate
Ak	Antikörper	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ATP	Adenosintriphosphat	et al.	et alii (und andere).
BLI	Biolumineszenzbildgebung	FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
Bryan-RSV	polymerase gene and subgroupA envelope	FLI	Fluoreszenzbildgebung
BSA	Bovines Serumalbumin	fLuc	firefly luciferase
cdNA	komplementäre DNA	g	Gramm (ng, µg, mg)
cRNA	komplementäre RNA	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation	GSK3 beta	Glycogen synthase kinase 3 beta
ddH2O	zweifach destilliertes Wasser	HDAC	Histondeacetylase
D-MEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	IP	Immunpräzipitation
DNA	Desoxyribonucleid acid	kDa	Kilodalton
DNase	Desoxyribonuclease	l	Liter (µl, ml)

M	Molar (μM , mM)	RT	reverse transkription
mRNA	messenger-RNA	RTK	Rezeptorthyrosinkinase
nm	Nanometer	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
NP-40	Nonidet P40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol	siRNA	Small interfering RNA
PDAC	Pankreatisch duktales Adenokarzinom	TBE	TRIS-Borat-EDTA
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie	TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin
PBS	Phosphat Buffered Saline	TGF- β	Transforming growth factor beta
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TP53	Tumorsuppressorprotein 53
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
PVDF	Polyvinylidenfluorid	TsA	Trichostatin A
RCASBP(A)	replication competent avian sarcoma-leucosis virus long terminal repeat with splice acceptor	TVA	tumor virus A
RNA	Ribonucleid Acid	V	Volt
RNase	Ribonuclease	v/v	Volumen pro (Gesamt-) Volumen
rpm	Rotations Per Minute	VPA	Valproinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)	w/v	Masse pro (Gesamt-) Volumen

1 Einleitung

1.1 Das duktales Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDA) repräsentiert die vierthäufigste Krebs assoziierte Todesursache in der westlichen Welt (Jemal, Siegel, et al. 2008). In den Vereinigten Staaten von Amerika erkranken jährlich mehr als 30,000 Menschen an einem Pankreaskarzinom. Die meisten Erkrankten versterben noch im gleichen Jahr (Jemal, Siegel, et al. 2008). In fast allen Fällen wird die Erkrankung erst in einem fortgeschrittenen bzw. metastasierten Stadium diagnostiziert, sodass eine chirurgische Resektion mit kurativer Zielsetzung nur in ca. 15% der Fälle erfolgen kann. Allerdings liegt die 5-Jahres Überlebensrate auch nach einer potentiell kurativen Resektion bei lediglich 20 - 30 % (Li, Xie, et al. 2004). In den meisten Fällen führen Komplikationen durch Metastasen zum Tode des Patienten (Schneider, Hamacher, et al. 2008).

Die metastatische Absiedelung von Tumorzellen repräsentiert einen späten Schritt in der Tumorprogression des duktales Pankreaskarzinoms (Yachida, Jones, et al. 2010). Das PDA entsteht durch eine Reihe genetischer und morphologischer Veränderungen des exokrinen Pankreas. In mehr als 90% der Fälle führt eine onkogene Mutation im *KRAS* Protoonkogen über eine acinär-duktales Metaplasie zur Entstehung von prämaligen Vorläuferläsionen, sogenannte pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanINs) (Zhu, Shi, et al. 2007); (Aichler, Seiler, et al. 2012). Weitere genetische Läsionen in den Tumorsuppressorgenen *CDKN2a*, *TP53* und *DPC/SMAD4* führen zur Progression der PanIN Läsionen über die Stadien 1-3 zum invasiven PDA (Hruban, Maitra, et al. 2008); (Feldmann, Beaty, et al. 2007). Die Transition von PanIN-3 Läsionen hin zum Pankreaskarzinom ist durch die Invasion

von Zellen durch die Basalmembran charakterisiert. Neue Studien haben gezeigt, dass vermutlich viele Jahre zwischen der Entstehung eines invasiven Pankreaskarzinoms und der Aussaat von Tumorzellen, welche die Fähigkeit zur Invasion und der Etablierung von Metastasen in anderen Organen haben, liegen (Yachida, Jones, et al. 2010). In Anbetracht dieser Daten ist es von größter Bedeutung, die dem Metastasierungsprozess zugrunde liegenden Mechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren.

1.2 Die verschiedenen Schritte des Metastasierungsprozesses

Die molekularen Mechanismen, die dem Prozess der Metastasierung des PDA zugrunde liegen, sind trotz immenser wissenschaftlicher Anstrengungen immer noch weitgehend unbekannt.

Die Metastasierung ist ein Prozess der aus mehreren sequentiellen Schritten besteht, bei denen die Tumorzellen mit den Zellen des Wirts direkt interagieren (Klein 2008); (Nguyen und Massague 2007). Die Tumorzellen lösen sich aus dem Zellverband des Primärtumors ab und invadieren in das umgebende Gewebe. Dort gelangen sie durch Intravasation in Lymph- oder Blutgefäße in die Zirkulation. Im Kapillarbett des Zielorgans verlassen sie die Zirkulation und dringen in das Gewebe des Zielorgans ein um dort zu proliferieren und durch Neoangiogenese eine Blutversorgung für die wachsende Metastase zu induzieren (Fidler 2003); (Gupta und Massague 2006).

1.3 Modelle der Metastasierung

Es bestehen zwei fundamental konkurrierende konzeptionelle Modelle der Metastasierung maligner Tumore: Das lineare und das parallele

Metastasierungsmodell (Klein 2009); (Weigelt, Peterse, et al. 2005). Das lineare Modell postuliert, dass einzelne Tumorzellen des Primärtumors im Rahmen des lokalen Tumorwachstums genetische und epigenetische Aberrationen erfahren, welche einzelnen Zellen die Fähigkeit zur Metastasierung verleihen (siehe Abb. 1a, b). Das parallele Progressionsmodell hingegen postuliert eine frühzeitige Dissemination von Tumorzellen, welche von der lokalen Tumorprogression unabhängig ist (Abb. 1c) (Klein 2009). Für jedes der beiden Modelle finden sich in der Literatur Daten aus experimentellen und klinischen Studien, so dass eine anhaltende wissenschaftliche Debatte hinsichtlich der Gültigkeit der beiden verschiedenen Modelle geführt wird, welche die Komplexität der zugrunde liegenden biologischen Prozesse widerspiegelt. Im Laufe der letzten Jahre wurden auf der Basis dieser beiden Modelle mehrere modifizierte Metastasierungsmodelle beschrieben (Weigelt, Peterse, et al. 2005). Beim Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass an Hand des Genexpressionsprofils des Primärtumors das Metastatisierungspotential vorhergesagt werden kann (van 't Veer, Dai, et al. 2002). Diese Beobachtung kann durch das ‚good prognosis versus poor prognosis‘ Modell erklärt werden (Weigelt, Peterse, et al. 2005) (Abbildung 1a). Massague und Kollegen erweiterten dieses Modell indem sie zeigen konnten, dass Mammakarzinome, welche auf Transkriptomebene eine ‚poor prognosis signature‘ zeigen, zusätzlich Subpopulationen von Zellen beinhalten, welche eine gewebspezifische Metastasierung der Tumorzellen ermöglichen (Abb. 1b). Dieses gewebspezifische Genexpressionsprofil konnte erfolgreich als Prediktor des Metastasierungsortes angewandt werden (Minn, Gupta, et al. 2005).

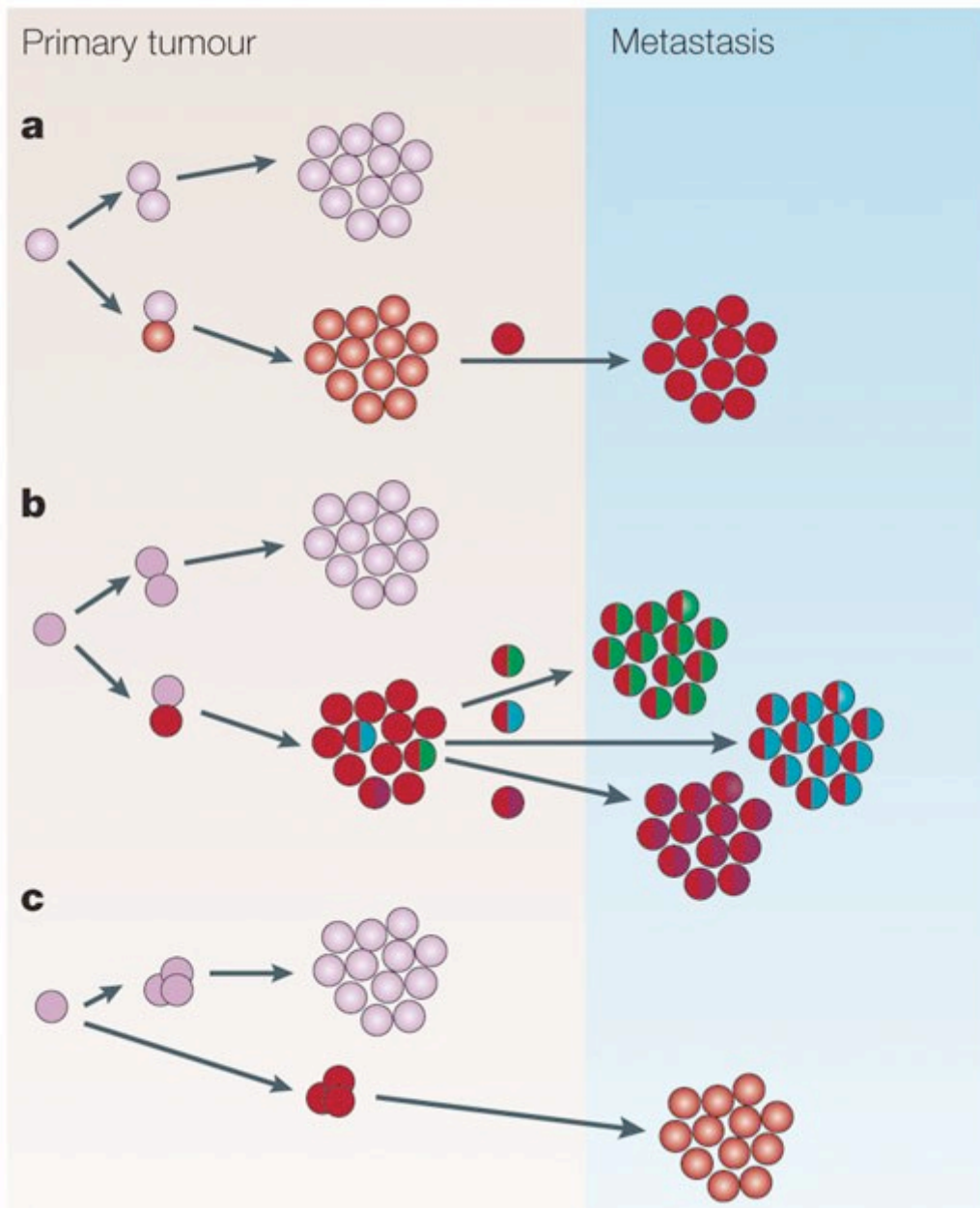


Abbildung 1: Modelle der Metastasierung (aus Weigelt et al. 2005)

(a) Die Genexpressionsprofile humaner Mammakarzinome können das Metastasierungsrisiko vorhersagen, ('poor-prognosis' (rot) versus 'good-prognosis' (lila) Signatur). (b) Primärtumore mit einer 'poor-prognosis' Signatur beinhalten klonale Subpopulationen welche eine Gewebsspezifische Metastasierung ermöglichen (grün, Knochen; blau, Leber; lila, Lunge). (c) Das parallele Progressionsmodell postuliert, dass die Metastasierung einzelner Zellen früh in der Karzinogenese stattfindet und unabhängig von der Progression des Primärtumors ist. Somit weisen Primärtumoren und Metastasen völlig unterschiedliche Genexpressionsprofile auf (Weigelt, Peterse, et al. 2005).

Im Falle des Pankreaskarzinoms konnte mittels ultratiefer Sequenzierung gezeigt werden, dass die Tumorprogression einem linearen Modell folgt. Erworbene genetische Aberrationen während der Karzinogenese führen zur Entstehung eines malignen Gründerklons („founder clon“), welcher die Fähigkeit zur Invasion besitzt. Dieser Klon weist in Abhängigkeit der während der Karzinogenese erworbenen genetischen Veränderungen eine definierte Prädisposition zur Metastasierung auf, kann aber selbst noch keine Metastasen bilden. Erst durch weitere genetische Veränderungen „progressor mutations“ entstehen im Laufe mehrerer Jahre Subpopulationen des parentalen Klons, welche die Fähigkeit zur Metastasierung aufweisen. Diese Beobachtung liefert eine Erklärung für die bekannte Heterogenität des PDA und die Rationale für die Analyse des Metastasierungsprozesses in einem *in vivo* Selektionsmodell (Yachida, Jones, et al. 2010).

1.4 E-cadherin und die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Mehrere Forschergruppen haben Genexpressionsanalysen benutzt und dadurch Gene identifiziert welche ursächlich am Metastasierungsprozess verschiedener Karzinome beteiligt sind (Eccles und Welch 2007); (Nguyen und Massague 2007). Diese Metastasierungsgene sind Prediktoren für das Metastasierungsrisiko und die Basis für die Entwicklung neuer spezifischer anti-metastatischer Therapien.

Unter den identifizierten Genen befindet sich das Gen *CDH1*, welches für das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin kodiert (Rinker-Schaeffer, O'Keefe, et al. 2006). E-cadherin ist ein transmembranäres Glykoprotein das Bestandteil von epithelialen Zell-Zell Kontakten ist. Es ist somit verantwortlich für die Integrität epithelialer Zellverbände, aber auch für die Polarität einzelner epithelialer Zellen. Der Verlust oder die Dysfunktion von E-cadherin wird mit einer erhöhten Invasivität von soliden

Tumoren, ihrer Fähigkeit zur Metastasierung und einer schlechten Prognose assoziiert (Christofori und Semb 1999); (Cavallaro und Christofori 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Herabregulierung von E-cadherin einen biologischen Prozess induziert, der als Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet wird (Yang und Weinberg 2008). Hierbei kommt es zu einer De-differenzierung neoplastischer epithelialer Zellen, hin zu einem motileren mesenchymalen Phänotyp. Zellen die diesen Prozess durchlaufen, zeichnen sich durch ein erhöhtes Potential zur Invasion und Metastasierung aus (Yang und Weinberg 2008); (Thiery und Sleeman 2006). Eine verminderte E-cadherin Expression oder ein E-cadherin Verlust kann durch verschiedene Mechanismen verursacht werden: Durch somatische Mutation des *CDH1* Gens, durch Deletion des *CDH1* Gens, durch die Repression des *CDH1* Promotors oder durch die proteolytische Degradation von E-cadherin (Strathdee 2002); (Christofori 2006); (Maretzky, Reiss, et al. 2005). Die Repression des *CDH1* Gens kann durch Hypermethylierung und/oder Deacetylierung der chromosomalen DNA in der Promotorregion induziert werden bzw. durch die Bindung von transkriptionellen Repressoren, wie z.B. Snail, Slug oder Twist. (Strathdee 2002); (Christofori 2006); (Peinado, Olmeda, et al. 2007); (Kang und Massague 2004); (Onder, Gupta, et al. 2008).

Mehrere Studien, welche die Expression von E-cadherin in Pankreaskarzinomen untersuchten, konnten zeigen, dass 42-60% der untersuchten Tumore eine abnormal niedrige oder keine Expression von E-cadherin aufweisen. Eine erniedrigte Expression von E-cadherin zeigte eine signifikante positive Korrelation mit dem Vorliegen einer De-differenzierung des Tumors sowie Lymphknoten- und Organmetastasen (Pignatelli, Ansari, et al. 1994); (Joo, Rew, et al. 2002) . Ein kompletter E-cadherin Verlust konnte vor allem in undifferenzierten, nicht-kohesiven

Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden und war mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert (Winter, Ting, et al. 2008). Diese korrelativen Daten weisen auf eine wichtige Rolle von E-cadherin bei der Progression und Metastasierung des Pankreaskarzinoms hin.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Metastasierung des Pankreaskarzinoms funktionell untersucht werden. Mittels eines neu etablierten *in vivo* Mausmodells für die Lungenmetastasierung sollte durch die *in vivo* Selektion von hochgradig organspezifisch metastasierenden Subzellklonen ein Modellsystem für die gewebsspezifische Metastasierung des Pankreaskarzinoms generiert werden. Durch die vergleichende Analyse des Genexpressionsprofils der hochgradig organspezifisch metastasierenden Zellklone mit der Ausgangszelllinie sowie zellbasierten Assays sollten anschließend die molekularen und zellulären Grundlagen der Metastasierung untersucht und funktionell *in vitro* und *in vivo* in Transplantations- und endogenen genetisch definierten Pankreaskarzinommodellen validiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Log DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
5-Azacytidine	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ammonium persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bio-Rad Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff Konzentrat	Bio-Rad, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) Standard	Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Collagenase Typ II	Worthington,
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-PBS	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
D-luciferin	Synchem, Kassel, Deutschland
EDTA (Etylendiamintetraessigsäure)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gel Loading Dye, blue (6x)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim, Deutschland
Oligofectamin [™]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
OptiMEM [®]	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set	Roche, Mannheim, Deutschland
Proteinase K	Roche, Mannheim, Deutschland
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Inc., Carlsbad, CA, USA
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate Ultra Pure)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Superfect	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TEMED	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
TGF- β	R&D Systems, Minneapolis, USA
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trichostatin A	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Valproinsäure (VPA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Western Lightning ECL Reagenzien	Perkin Elmer, Waltham, USA

2.1.2 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Kits

Bezeichnung	Hersteller
Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneChip Sample Cleanup Module	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
IVT Labelling Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Mouse Genome UG 430 2.0 Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
One Cycle cDNA synthesis Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Plasmid Mini/Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA
TOPO TA Cloning® Kit, Dual Promotor, pCRII®-TOPO® Vector	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Biopur Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryo Tubes	Nunc Brand Products, Napeville, IL, USA
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
Immobilon-P (PVDF) Membran	Millipore, Schwalbach, Deutschland
MicroAmp ^{IM} Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Micro Amp TM optical 96-Well Reaction-Plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Neubauerzählkammer	Hecht-Assistant, Sondheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Phase-lock gel tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,65 ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe-lock Reaktionsgefäße Biopur	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Whatman-Paper	Biometra, Göttingen, Deutschland

Zellkulturverbrauchsmaterialien (Flaschen, Schalen, well-Platten, Röhrchen, serologische Pipetten, Zellschaber)

BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA,
 TPP Tissue Culture Labware, Trasadingen,
 Schweiz, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht,
 Deutschland

2.1.4 Geräte und Instrumente

Tabelle 4: Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Elektrophoreseapparatur	Hoefler
AxioCam	Zeiss
Bakterienschüttler Certomat	Termoshake
Biolumineszenzkamera OrcaII ER	Hamamatsu
Elektroblot-Kammer für Western-Blot	Biometra
Elektrophoreseapparaturen	Hoefler/Pharmacia
ELISA-Reader	SLT Spectra
Entwicklermaschine	Amersham Bioscience
Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware Imagemaster	QuantityOne, BioRad
Heizblöcke	Eppendorf
Homogenisator	Polytron PT 3100, Kinematica AG
Microlitterspritze	Hamilton
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Odyssey Infrared Imaging System	Licor
Photometer	NanoTrop NP-10, Peqlab
pH-Meter	WTW
Spannungsgeräte	Hoefler/Pharmacia
Sterilbank	Heraeus
Taqman	StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems
Thermocycler	Biometra
Ultraschallgerät	Bandelin electronic Sonopuls
Waagen/Feinwaage	Sartorius
Westernblottapparatur	Biometra

Zellkultur Inkubatoren

Heraeus

Zentrifugen

Heraeus, Eppendorf

2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
2X sample buffer	120 mmol/L Tris-HCl, pH 6,8, 3.3% SDS, 10% glycerol, 40 µg/mL bromphenol-blau
Western Blot Trenngelpuffer	1,5M TRIS/HCl, pH 8,8
Western Blot Sammelgelpuffer	0,5M TRIS/HCl, pH 6,8
Western Blot Laufpuffer (10fach)	35mM SDS, 0,25M TRIS/HCl, 2M Glycin
Western Blot Transferpuffer	39mM Glycin, 48mM TRIS/HCl, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Ethanol, pH 8,3
PBS (10fach)	1,4M NaCl, 27mM KCl, 40mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Laemmli-Probenpuffer (5fach)	0,35M SDS, 50% (v/v) Glycerin, 0,3M TRIS/HCl, 0,7mM Bromphenolblau Na-Salz, 5% (w/v) Mercaptoethanol, pH 6,8
IP-Puffer	50mM HEPES (pH 7,9), 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8), 0,5% (v/v) NP40, 10% (v/v) Glycerol
Blocking-Puffer	5% (v/v) Magermilchpulver, 0,1% (v/v) NP40, gelöst in PBS
Waschpuffer	1x PBS, 0,1% (v/v) NP40 oder 1x PBS, 0,1% (v/v) TWEEN 20
Stripping Puffer (Odyssey)	25mM Glycin, 2% (w/v) SDS, pH 2
TAE-Puffer (50fach)	2M TRIS, 100mM EDTA, 5,71% (v/v) Essigsäure (100%), pH 8,5
L1-Puffer	Tris pH 8,0 50mM, EDTA pH8,0 2mM, NP-40 0,1% (v/v), Glycerol 10% (v/v)
L2-Puffer	Tris pH 8,0 50mM, EDTA 5mM, SDS 1% (w/v)
Dilutions-Puffer	Tris pH 8,0 50mM, EDTA 0,5mM, NP-40 0,5% (v/v), NaCl 200mM
Elutions-Puffer	Tris pH 8,0 10mM, EDTA 1mM, SDS 1% (w/v)
Hochsalz-Puffer	Tris pH 8,0 20mM, EDTA 2mM, NP-40 1% (v/v), NaCl 500mM, SDS 0,1% (w/v)
Niedrigsalz-Puffer (1xTE, pH 8,0)	Tris pH 8,0 10mM, EDTA 1mM

LiCl-Puffer

Tris pH 8,0 20mM, EDTA 1mM, NP-40 0,5% (v/v),
LiCl 250mM, Na-deoxycholat 0,5% (w/v)

2.1.6 Antikörper

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

AK	Typ	Wirt	Verdünnung
β-Actin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	Maus	1:2000
CK-19 [TROMAIII]	Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA	Ratte	1:100
E-cadherin	BD Pharmingen, CA, USA	Maus	1:100
HDAC1	Upstate/Millipore, Billerica, MA, USA	Maus	1:250
HDAC2 (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Hase	1:500
HDAC2 (c-8)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Maus	1:500
HDAC2 (H-54)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Hase	1:500
horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelter Zweitantikörper	GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA	Schaf	1:2000
mSin3A (AK-11)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Hase	1µg/100µg Protein
nonimmunogenic purified IgG	Invitrogen, Groningen, Niederlande	Hase	1µg/100µg Protein
RNA Polymerase II (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Hase	1µg/100µg Protein
Snail (E-18)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Ziege	1µg/100µg Protein
Snail [ab17732]	Abcam, Cambridge, UK	Hase	1:30
Snail (L70G2)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	Maus	1:1000
biotinylated goat anti-rabbit	Vector Laboratories, CA, USA	Ziege	1:500
biotinylated goat anti-rat	Vector Laboratories, CA, USA	Ziege	1:500
biotinylated goat anti-mouse	Vector Laboratories, CA, USA	Ziege	1:500

2.1.7 Small interfering RNA (siRNA)

Small interfering RNAs (siRNAs) wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 7: siRNA-Sequenzen

siRNA	siRNA-Zielsequenz (Matrizenstrang)
scramble duplex I (SDI) (Kontrolle)	AAC AGT CGC GTT TGC GAC TGG
HDAC2	CGGATGACTCATAACTTGCTGCTAA
Snail	CGGAAGATCTTCAACTGCAAATATT

2.1.8 PCR-Primer und Oligonukleotidsonden

Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 8: Forwärts (F) und Rückwärts (R) gerichtete Primersequenzen für die Echtzeit qRT-PCR

HDAC2	HDAC2 F	5'-GGA GAA GAT TGT CCG GTG TTT G -3'
	HDAC2 R	5'-CCA TAT CAG TTT GTT GCC GGT T -3'
Snail	Snail F	5'-TGT CTG CAC GAC CTG TGG AAA -3'
	Snail R	5'-TTG GAG CGG TCA GCA AAA G -3'
E-cadherin	Ecad F	5'-CGT CCT GCC AAT CCT GAT GAA -3'
	Ecad R	5'-ACC ACT GCC CTC GTA ATC GAA -3'
Cyclophilin	Cyclo F	5'- ATG GTC AAC CCC ACC GTG T -3'
	Cyclo R	5'- TTC TGC TGT CTT TGG AAC TTT GTC -3'

Tabelle 9: Primersequenzen für die ChIP-PCR

CDH1	CDH1 F	5'- TAGGAAGCTGGGAAGTCTTCTAAGG -3'
	CDH1 R	5'- GCCGAGCAAACACTGAGCTC -3'
Albumin	Albumin F	5'- TGGGAAAACCT GGGAAAACCATC -3'
	Albumin R	5'- CACTCTCACACATACTCCTGCTG -3'

Tabelle 10: Oligonukleotide für den ABCD Assay

CDH1- E-Box 1	E-Box1 F	5'-TCCTTGCTGCCACCTGCAGGTGCGTCCCCAGCCAATCAGCGGCGCC-3'
	E-Box1 R	5'-GGCGCCGCTGATTGGCTGGGGACGCACCTGCAGGTGGCAGCCAAGGA-3'
CDH1- E-Box 2	E-Box2 F	5'-CAATCAGCGGCGCCGGGGCGGTGCCTGCGGGCTCACCTGGCGGCCGAGCCT- 3'
	E-Box2 R	5'-AGGCTGCGGCGCCAGGTGAGCCCGCAGGCACCGCCCCGGCGCCGCTGATTG -3'

2.2. Experimentalmethoden

2.2.1 Mauslinien und genetisch definierte Tumormausmodelle

Die Generierung der Mauslinien *LSL-Kras*^{G12D/+} (Jackson, Willis, et al. 2001), *Tp53*^{lox/lox} (Jonkers, Meuwissen, et al. 2001) und *Ptf1a/p48*^{ex1Cre/+}, (Nakhai, Sel, et al. 2007) wurde vorbeschrieben. Die Mauslinien wurden miteinander verkreuzt um ein genetisch definiertes endogenes Pankreaskarzinommodell zu generieren. Diese Mäuse entwickeln wie vorbeschrieben murine pankreatische intraepitheliale Neoplasien (mPanINs) und metastatische duktales Pankreaskarzinome. (Seidler, Schmidt, et al. 2008); (Hingorani, Petricoin, et al. 2003); (Bardeesy, Aguirre, et al. 2006). Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.2 Generierung von murinen Pankreaskarzinomzelllinien

Um Tumorzelllinien aus den Pankreaskarzinomen von Mäusen des genetisch definierten *Ptf1a/p48*^{ex1Cre/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+} Modells zu gewinnen, wurden Mäuse, welche einen tastbaren Tumor im Bereich des Pankreas haben, mit Isofluran euthanisiert und Genickbruch getötet. Das Fell wurde anschließend mit Sterilium desinfiziert. Mit sterilem Besteck erfolgte ein Medianschnitt um die Haut bis auf das Peritoneum zu öffnen. Anschließend wurde mit einem zweiten sterilen Bestecksatz das Peritoneum eröffnet und der Pankreastumor dargestellt. Ein ca. 0,5 bis 1 cm großes Stück des Tumors wurde reseziert und in steriles PBS gebracht und unter eine Zellkulturbank transferiert. Dort wurde das Tumorstück dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Dann wurde das Tumorstück mit sterilen Skalpell in einer 10 cm² Zellkulturschale in 1 mm³ große Stücke geschnitten. Diese wurden in 10 ml DMEM mit 150U/ml collagenase Typ 2 aufgenommen und über Nacht in einem 50 ml Falcon Röhren in einem Wasserbad bei 37 Grad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die

Zellen mittels Zentrifugation bei 150 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche in Kultur gebracht. Die Primärkulturen wurden als adherente Zellen in DMEM mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin bei 37% und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.3 Zellkultur

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und in DMEM Medium kultiviert. Das Medium wurde mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin versehen. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und unter 5% CO₂-Begasung. Die immortalisierte Fibroblasten Zelllinie DF-1 wurde von ATCC bezogen und in DMEM Medium mit zugesetztem 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1% (v/v) nicht essentieller Aminosäuren bei 37°C und unter 5% CO₂-Begasung kultiviert (Himly, Foster, et al. 1998).

2.2.4. Plasmide und Virus Präparation

Um die Reportergene „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) und „firefly luciferase“ (fLuc) zusammen mit dem Rezeptor für aviäre RCASBP(A) (replication competent avian sarcoma-leukosis virus long terminal repeat with splice acceptor, Bryan-RSV polymerase gene and subgroup A envelope) Retroviren, TVA (Tumovirus A), stabil zu exprimieren, wurde ein in der Arbeitsgruppe Saur vorhandenes Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus EGFP und fLuc kodiert und über eine „internal ribosome entry site“ (IRES) zusätzlich TVA exprimiert, verwendet (pCMV-EGFP-fLuc-IRES-TVA). In diesem Plasmid wurde der vorhandene

Cytomegalieviruspromotor (CMV) gegen einen CAG Hybridpromotor (CMV immediate early enhancer, welcher mit dem β -actin Promotor (Huhn) fusioniert ist) ausgetauscht. Der RCASBP(A)-lacZ Kontrollvektor wurde generiert, indem die kodierende Sequenz von lacZ aus dem Plasmid pcDNA3.1-V5-His-TOPO-lacZ in die geglätteten Enden der Cla I Restriktionsstelle des RCASBP(A) Vektors inseriert wurde. Um eine dominant-negative (dn) Form von E-cadherin (dn-E-cad) zu exprimieren wurde der Vektor RCASBP(A)-dn-E-cad verwendet, der freundlicherweise von Dr. Brian Lewis (University of Massachusetts Medical School, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Integrität aller Vektoren wurde mittels Sanger DNA Sequenzierungen überprüft (GATC, Konstanz, Deutschland). RCASBP(A) Viren wurden wie vorbeschrieben generiert (Mayr, von Werder, et al. 2008), (Seidler, Schmidt, et al. 2008). Die immortalisierte aviäre Fibroblasten Zelllinie DF-1 wurde für die Virusproduktion benutzt (Himly, Foster, et al. 1998). Die Zellen wurden in definierter Zellzahl in 10 cm² Schalen ausgesät und bei einer Konfluenz von 70-90% mit 2,5 μ g des RCASBP(A)-dn E-cad Expressionsplasmids oder des LacZ Kontroll Plasmids transfiziert. Die Transfektion wurde mit Superfect nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden für 2 Wochen nach der Transfektion kultiviert, dann wurde das produzierte Virus aus dem Medium der Zellen isoliert. Hierfür wurde das Medium der Zellen bei 800 g für 10 Minuten abzentrifugiert um abgestorbene Zellen im Zellkulturüberstand zu eliminieren. Der Überstand wurde dann mit einem 0.22- μ m Filter steril filtriert und sofort bei -80 Grad weggefroren.

2.2.5 Generierung von TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen

Die etablierte murine TD-2 Zelllinie, die im Labor von Herrn Prof. Schmid aus dem Pankreastumor einer *TGF- α /p53^{+/-}* Maus isoliert wurde, wurde wie beschrieben isoliert und kultiviert (Greten, Weber, et al. 2002). TD-2 Zellen wurden mit dem Plasmid pCAG-EGFP-fLuc-IRES-TVA stabil transfiziert. Hierzu wurden die Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in 12-Wellplatten in einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach dem Waschen der Zellen mit Medium ohne FCS wurden 400 μ l serumfreies Medium vorgelegt. Die Zellen wurden mit Hilfe von OligofectaminTM nach Angaben des Herstellers mit dem Plasmid pCAG-EGFP-fLuc-IRES-TVA transfiziert. Nach 5-minütiger Vorinkubation von OligofectaminTM mit Opti-MEM® wurde das Gemisch zu dem Ansatz aus Plasmid und Opti-MEM® gegeben. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben. Nach 4 stündiger Inkubation bei 37 Grad im Brutschrank mit 5% CO₂ wurde Medium mit 20% (v/v) FCS zugegeben. Das Medium wurde am folgenden Tag durch frisches Medium mit 10% (v/v) FCS und 1 mg/mL aktivem Geneticin zur Selektion stabil transfizierter Tumorzellen ersetzt. Die so generierte Zelllinie mit stabiler Expression von EGFP/fLuc und TVA wurde TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} genannt.

2.2.6. *In vivo* Selektion von hochgradig metastasierenden Zelllinien mittels eines experimentellen Metastasierungs Assays und multimodaler Bildgebung

10⁶ TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen wurden mit einer Microliter Spritze und einer 27G Nadel intravenös in die Schwanzvene von Nacktmäusen appliziert. Hierfür wurden die adhären wachsenden Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in FCS haltigem Zellkulturmedium aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren.

Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die gezählten Zellen wurden dann abzentrifugiert und in DMEM ohne Zusätze auf eine Konzentration von 1×10^4 Zellen pro μl eingestellt. Dann wurden 100 μl dieser Zellsuspension sehr langsam intravenös in insgesamt 10 Mäuse injiziert. In 7 tägigen Abständen erfolgte eine Messung der injizierten Mäuse mittels *in vivo* Biolumineszenz Messung (BLI) zum Nachweis der fLuc Expression. Die Mäuse wurden hierfür mit 0,5mg/kg KG Medetomidin, 5mg/kg KG Midazolam und 0,05mg/kg KG Fentanyl (MMF) durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Gleichzeitig wurden 150mg/kg KG des fLuc Substrats D-luciferin injiziert. Die Mäuse wurden 10 Minuten nach der Injektion der Bildgebung zugeführt. Zuerst wurde ein Weißlichtbild aufgenommen. Dann wurde das von den Tumorzellen emittierte Biolumineszenzsignal, welches durch die enzymatische Aktivität von fLuc unter Verbrauch von O_2 und ATP generiert wird, mit einer auf -70°C gekühlten CCD Kamera mit Bildverstärker analysiert. Es wurden mehrere Bilder mit unterschiedlichen Belichtungszeiten von 10-120 Sekunden und einem Gain von 700 aufgenommen. Mittels SimplePCI Software wurde das detektierte Biolumineszenzsignal in Pseudofarben dargestellt und auf das Weißlichtbild projiziert, um die Tumorzellen lokalisieren zu können. Konnten bei Mäusen Metastasen in der Biolumineszenzmessung identifiziert werden, wurden die Mäuse mit Isofluran euthanisiert. *Ex vivo* erfolgte dann eine erneute Darstellung der Metastasen durch die Detektion der enhanced-green fluorescent protein (EGFP) Expression der Tumorzellen mittels Fluoreszenzstereomikroskopie. Mittels einer UV Lampe und einem GFP Filter mit einer Exzitationswellenlänge von 488nm wurde das von den Tumorzellen exprimierte EGFP angeregt. Die von den Tumorzellen emittierte Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von

509nm wurde mit einem AxioCam MRc Kamerasystem und einem Emissionsfilter bei 510 nm detektiert. Die Aufnahmen wurde dann mit Hilfe der AxioVision 4.3 Software bearbeitet. Das Fluoreszenzsignal wurde in grüner Farbe auf das entsprechende Weißlichtbild projiziert. Hierdurch konnten die Metastasen *ex vivo* validiert werden. Dann wurden, wie oben beschrieben, Tumorzelllinien aus den Lungenmetastasen und dem Primärtumor an der Injektionsstelle isoliert. Die Zelllinien wurden in DMEM mit zugesetztem Geneticin (1mg/ml) kultiviert. Hierdurch konnten die Tumorzellen, die das Neomycin Resistenzgen exprimieren, von Fibroblasten und anderen Zellen des Wirts isoliert werden. Eine der Subzelllinien, die aus einer Lungenmetastase isoliert wurde (Subzelllinie P1) wurde *in vitro* expandiert und in niedriger Passage (<4) wieder intravenös injiziert, um erneut auf hochgradig metastasierende Subklone der Zelllinien zu selektionieren. Wieder wurden die Mäuse mittels BLI überwacht und Zelllinien aus den Primärtumoren und Metastasen gewonnen. Die Subzelllinie P2 wurde aus einer Lungenmetastase einer Maus gewonnen, in welche die Subzelllinie P1 injiziert worden war.

2.2.7 Expression von dominant-negativem E-cadherin in TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen mittels retroviraler Transduktion

Transfizierte DF-1 Zellen (siehe oben) und die zu infizierenden TVA-Rezeptor exprimierenden murinen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen wurden parallel kultiviert. Die TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen wurden in einer 6-Well Platte mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well ausgesät. Am Folgetag wird das virushaltige Medium der transfizierten DF-1 Zellen abgenommen und entweder 2ml des unverdünnten oder 2ml einer 1:10 Verdünnung je Well der TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von

48 Stunden bei 37 Grad und 5% CO₂ wird das Medium abgesaugt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Die infizierten TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} RCASBP(A)-dn-E-cad und TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} RCASBP(A)-LacZ wurden cryokonserviert und Proteine zur Analyse der E-cadherin und dominant negativen E-cadherin Expression isoliert.

2.2.8 Kryokonservierung von Zelllinien

Zellen wurden bei 80% Konfluenz in 175 cm² Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und dann mit 0,01% Trypsin abgelöst und durch auf-und abpipettieren vereinzelt. Dann wurde das Zellen-Trypsin Gemisch in Kulturmedium mit FCS aufgenommen um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen wurden dann in 50ml Falcons mit einer Geschwindigkeit von 150 g in einer Ausschwingzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in eiskaltem Freezing Medium (70% DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert in Cryotubes bei -80 Grad weggefroren. Nach 24 Stunden erfolgte dann die Überführung der Röhrchen in den flüssigen Stickstoff.

2.2.9 Orthotope Implantation muriner Pankreaskarzinomzellen

Um das Metastastierungspotential von murinen Pankreaskarzinomzelllinien, die aus Pankreaskarzinomen von *Ptf1a/p48*^{ex1Cre/+};LSL-*Kras*^{G12D/+} oder *Ptf1a/p48*^{ex1Cre/+};LSL-*Kras*^{G12D/+}; *Tp53*^{lox/lox} Mäusen isoliert wurden, zu testen, wurden 5.000 Zellen in 20µl DMEM ohne Zusätze orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen implantiert. Hierfür wurden die Mäuse mittels kontinuierlicher kontrollierter Zufuhr eines Isofluran-O₂ Gemisches mittels eines Kleintiernarkosegeräts narkotisiert. Zur Analgesie wurde prä-und postoperativ 1mg/kg KG Metacam appliziert. Die Eröffnung des Abdomens

im linken Oberbauch erfolgte nach Desinfektion der Haut mit Sterilium durch eine 1 cm große Inzision mit sterilem Besteck. Nach Freilegung des Peritoneums durch Präparation zwischen Haut und Peritoneum wurde dieses eröffnet und die Milz und der Pankreasschwanz dargestellt. Vorsichtig wurde die Milz mit einer atraumatischen Pinzette gefasst und zusammen mit dem Pankreasschwanz nach aussen disloziert. Die Tumorzellen wurden mit einer Microliter Spritze in einem Volumen von 20µl in den Pankreasschwanz nahe der Milz injiziert. Das Pankreas wurde danach vorsichtig reponiert und das Peritoneum mit Ethilon Nahtmaterial mittels Einzelknopfnahnt verschlossen. Die Haut wurde dann mit Hautklammern verschlossen. Die implantierten Mäuse wurden gemäß der Vorgaben des Tierversuchsantrags überwacht und getötet als sie Zeichen einer Beeinträchtigung durch den Tumor zeigten, bzw. die Abbruchkriterien erreicht hatten. Die Organe wurden entnommen und histologisch aufgearbeitet (siehe oben).

2.2.10 Transfektion, Inhibitorbehandlung und Epitheliale-Mesenchymale Transitions Assays

Die Transfektion von doppelsträngiger siRNA (siehe Tabelle 7 für die Sequenzen der siRNAs) mit einer Endkonzentration von 50nmol/L wurde mit OligofectaminTM wie oben beschrieben, nur ohne Antibiotikaselektion durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für die Analysen verwendet. Um die Histondeacetylase (HDAC) Aktivität zu inhibieren, wurden die murinen Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* für 24 Stunden mit 0.1 µmol/L oder 0.3 µmol/L Trichostatin A (TsA) oder DMSO als Kontrolle behandelt und anschließend mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden untersucht (siehe nachfolgende Methoden). Um eine globale DNA Demethylierung zu erzielen wurden die murinen Pankreaskarzinomzelllinien für 48 oder 96 Stunden mit dem Demethylierungsgagens

5'-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ behandelt. Eine EMT wurde in Panc1 Zellen durch die Zugabe von TGF- β 1 induziert. Hierfür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70% in DMEM Medium mit 10% FCS (v/v) kultiviert. Dann wurden die Zellen zweimal mit serumfreien Medium gewaschen und für 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert um dann mit TGF- β 1 (10 ng/ml) und kompletten Medium oder nur mit kompletten Medium ohne TGF- β 1 für 48 Stunden behandelt zu werden. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit dem Klasse I HDAC Inhibitor Valproinsäure in einer Konzentration von 1,5 mmol/L behandelt. Morphologische Änderungen wurden mittels Lichtmikroskopie mit einem invertierten Zeiss Mikroskop analysiert. Aufnahmen wurden mit der zugehörigen AxioCam in den angegebenen Vergrößerungen gemacht (Ellenrieder, Hendler, et al. 2001).

2.2.11 Ganzzellextrakte und Bradford Assay

Für die Gewinnung von Ganzzellextrakten wurden adherent wachsende Zellen vor der Ernte mit PBS gewaschen und dann in IP-Puffer (mit 0,5 mM PMFS, 1 mM DTT und mit 1:100 verdünntem Phosphatase Inhibitor) lysiert und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat für 20 min bei -20 Grad weggefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Lysate 15 Minuten bei 16.100 g und 4 °C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinbestimmung erfolgte durch die Methode nach Bradford In eine Mikrotiterplatte wurden je Well 300 μl des 1:5 in destilliertem Wasser verdünnten Bradford Reagenz gegeben. Aus Rinderalbumin (BSA) wurde eine Standardreihe erstellt (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) welche im linearen Messbereich des Photometers lag. Es wurden 1 μl der zu messenden Probe in Triplikaten zu den vorgelegten 300 μl pipettiert und die Farbreaktion bei

einer Wellenlänge von 595nm im Mikroplatten-Absorptionsphotometer Anthos 2001 gemessen. Mit Hilfe der Standardreihe konnten die gemessenen Absorptionswerte in die Proteinkonzentration umgerechnet werden. Durch entsprechende Verdünnung mit IP-Puffer wurde in allen Proben eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Die Proben wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bei -20°C weggefroren.

2.2.12. Western Blotting mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Ganzzellextrakte erfolgte mittels diskontinuierlicher SDSPolyacrylamid-Gelelektrophorese. Zuerst wurde das Trenngel vorbereitet und in eine vertikale Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 30 Minuten Polymerisationszeit konnte das Isopropanol abgegossen werden und das Trenngel mit Sammelgellösung überschichtet werden, in welches der Probenkamm eingeführt wurde. Nach erneuter Polymerisationszeit konnte der Kamm entfernt werden und die Probenaschen mit Aqua Destillatum gewaschen werden. Die Ganzzellextrakte wurden bei einer konstanten Spannung zwischen 90-120-V in einer Gel-Laufapparatur HoeferTM aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe einer WET- Blottapparatur auf eine Immobilon-P Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Die Membran wurde in Methanol für 30 Sekunden aktiviert, dann in ddH₂O hydrophilisiert und anschließend bis zum Gebrauch in Transferpuffer eingelegt. Auch das Trenngel wurde für 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Das Blotten erfolgte für 2 Stunden bei 250 mA bei 4 Grad. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungstellen in Blockingpuffer (Odyssey Blocking Buffer 1:1 (v/v)

PBS) für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper, welcher in Blockingpuffer verdünnt wurde auf die Membran gegeben und diese über Nacht bei 4 °C unter leichter Agitation inkubiert. Dann wurde die Membran vor der Behandlung mit dem zweiten Antikörper dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Als sekundäre Antikörper wurden Antikörper, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind benutzt. Die zweistündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Die Membran wurde nach dieser Inkubation, wie oben beschrieben, lichtgeschützt gewaschen. Anschließend wurde die Membran mittels des Odyssey Infrared Imaging System gescannt und dabei die Intensität der Fluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen 700 nm bzw. 800 nm detektiert. Nach erfolgter primärer Immundetektion können die Antikörper wieder von der Membran gelöst werden (Strippen), um mit einem neuen Antikörper eine weitere Detektion anderer Proteine auf derselben Membran durchzuführen. Zum Strippen wurde die Membran 30 Minuten bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer unter Agitation inkubiert, dann mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wieder für 30 Minuten in Blockingpuffer inkubiert. Dann erfolgte eine erneute Inkubation mit einem spezifischen Antikörper.

2.2.13. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Um die Interaktion von DNA bindenden Proteinen mit spezifischen DNA Sequenzen zu untersuchen, führten wir Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP) Analysen durch. Gleiche Mengen an Chromatin wurden für jede Präzipitationsreaktion eingesetzt (100µg). Die gezielte Präzipitation von DNA bindenden Proteinen erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen RNA Polymerase II, HDAC1, HDAC2, HDAC3,

acetyliertes Histon 4 (acH4), mSin3A oder Snail. Nach der Präzipitation wurden die Proteine von der DNA getrennt und die DNA Fragmente wurden mit spezifischen Primern amplifiziert um eine spezifische Bindung der präzipitierten Proteine nachzuweisen. Für die ChIP Analyse wurden 50.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit 0,3µM TsA oder DMSO, als Kontrolle, für 24 Stunden behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde ein Fixationsschritt mit Formaldehyd (1% Endkonzentration) für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt, gefolgt von einer Inkubation von 5 Minuten mit 1,25 M Glycin. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, in 80µl PBS abgeschabt in ein Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. und in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge bei 200 g zwei Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 500µl L1-Puffer resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis lysiert. Durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 800 g für zwei Minuten konnten die Zellkerne vom Zytoplasma getrennt und pelletiert werden. Die Zellkerne wurde dann in 700µl L2-Puffer resuspendiert. Nachfolgend erfolgte der Aufschluss der Kernmembranen mittels Sonifikation. Die Proben wurden je sechs Mal für 20 Sekunden bei 60% der Maximalleistung des Geräts behandelt (Electronic Sonopuls, Bandelin; Stromstärke: 0,4A, Leistung: 70W, Frequenz: -20kHz). Dann wurden die Kernmembranbestandteile bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Überstand auf eine definierte Konzentration von 100µg/ml Chromatin mit Dilutionspuffer eingestellt. Als Input Kontrolle wurden 10µg jeder Probe mit Elutionspuffer verdünnt und weggefroren. Die Proben wurden dann mit Agarose A/G Beads inkubiert, dann gewaschen und nachfolgend mit 3µg eines spezifischen Antikörpers inkubiert. Dieser Inkubationsschritt erfolgte bei 4 Grad über Nacht auf einem Rotor. Am nächsten Tag wurden erneut Agarose A/G Beads in Dilutionspuffer

zugegeben und die Agarose A/G Beads-Antikörper-Protein-Chromatin Komplexe mittels Zentrifugation bei 100 g pelletiert. Die Proben wurden dann drei Mal mit Waschpuffern mit steigendem Salzgehalt gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 100 g bei 4 Grad für eine Minute pelletiert. Das Pellet wurde dann in 300µl Elutionspuffer aufgenommen und für 20 Minuten bei 65 Grad inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 2300 g für zwei Minuten wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 30µl NaCl zugegeben. Dann wurde ein erneuter Inkubationsschritt bei 65 Grad über Nacht durchgeführt. Es folgte ein Proteinverdau durch Zugabe von 2µl Proteinase K. Diese Reaktion wurde für 2 Stunden bei 45 Grad ausgeführt. Dann wurde eine Phenol/Chloroform Fällung durchgeführt. Hierzu wurden die verdauten Proben zusammen mit 600µl Phenol/Chloroform in ein Phase-Lock-Gel Tube überführt, kurz gemischt und dann bei 16.100 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Die wässrige Phase zusammen mit dem Phasenübergang wurden in ein neues Phase-Lock-Gel Tube überführt und ein gleicher Anteil von Chloroform zugegeben. Nach einer erneuten Phasentrennung wurden 500µl der wässrigen Phase einer Ethanol Fällung unterzogen. Es folgte die Zugabe von 50µl 3M Natriumacetat pH 5,2 und 1.100µl Ethanol. Ausserdem wurden zu jeder Probe 1,2µl tRNA als Carrier zugegeben. Die Fällung erfolgte dann bei -20 Grad für 30 Minuten. Nach Zentrifugation bei 16.100 g für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und 300µl 70% Ethanol zum Pellet gegeben und 5 Minuten bei 16.100 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in 100µl H₂O gelöst und 5µl für die nachfolgende PCR Reaktion eingesetzt. Die PCR wurde mit spezifischen Primern und REDTaq Ready Mix PCR Reagenzien durchgeführt. Die Amplifikation der DNA erfolgte mit spezifischen Primern für die jeweiligen Promotorsequenzen (siehe

Tabelle 9 für Primersequenzen). Die Amplifikationsreaktion wurde nach folgendem Programm durchgeführt: Initial 2 min Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 34-38 PCR Zyklen mit 45 sek Denaturierung bei 94°C, 1 min Primeranlagerung bei 60-64°C (je nach Primerpaar-Annealingtemperatur), 1 min Elongation bei 72°C. Nach dem letzten PCR Zyklus 10 min Elongation bei 72°C gefolgt von einer dauerhaften Inkubation bei 4°C. Um Linearität der PCR Reaktion zu gewährleisten wurden verschiedene Zyklenzahlen verwendet (34-38 Zyklen). Die PCR Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.14 Immunpräzipitation

Die ausgesäten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann in 800µl Lysepuffer (50 mmol/L Tris, pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 1% Nonidet-P 40) mit Proteaseinhibitoren lysiert. Die Zellen wurden dann abgekratzt und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten auf Eis lysiert. Dann wurden die Proben für 10 Minuten bei 16,100 g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt. 1,5 mg des Proteins wurden in einem Endvolumen von 500µl mit IP-Puffer verdünnt und 1 Stunde bei 4 Grad mit 60µl Agarose Beads inkubiert. Die Lysate wurden dann über Nacht bei 4 Grad mit je einem der nachfolgenden Antikörper inkubiert: 3 µg anti-Snail (E-18), 2 µL anti-HDAC1 (clone 2E10), 3 µg anti-HDAC2 (C-8), 3 µg mSin3A (AK-11), oder 3 µg nonimmunogenic purified IgG. Für Antikörper aus dem Hasen wurden Protein A Agarose Beads verwendet, für alle anderen Spezies wurden Protein G Agarose Beads verwendet. Am nächsten Tag wurden die Antikörper-Protein Komplexe mittels Agarose Beads präzipitiert indem die Proben 2 Stunden bei 4 Grad mit den entsprechenden Agarose Beads inkubiert

wurden. Die Beads wurden dann 5 Mal mit Lysepuffer gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in 2X sample buffer (120 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 3.3% SDS, 10% glycerol, 40 µg/mL bromphenol-blau) aufgenommen und für 5 Minuten bei 100°C aufgeköcht. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE und Transfer auf eine PVDF Membran wurden die Membranen mit einem der nachfolgenden spezifischen Antikörper über Nacht inkubiert: anti-Snail (E-18) 1:500 oder anti-Snail (L70G2) 1:1000; anti-HDAC1 (clone 2E10) 1:1000; anti-HDAC2 (C-8) 1:1000 oder anti-HDAC2 (H-54) 1:500; oder anti-mSin3A (AK-11) 1:1000. Die gebundenen Antikörper wurden nach entsprechenden Waschschritten, wie oben beschrieben, mit horseradish peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörpern und Western Lightning ECL Reagenzien mit Hyperfilm ECL Filmen nach dem Standardprotokoll des Herstellers detektiert. Die Expression der entsprechenden Proteine und die gleichmäßige Beladung der Taschen (β -Aktin Ladungskontrolle) wurde mittels Western Blot von 15µg des initialen Lysats untersucht.

2.2.15 Avidin-Biotin-Komplex-DNA Assay

Ganzellextrakte wurden mittels Bradford Assay gemessen und 1.000 µg des Proteins jeder Probe mit 3µg 5' biotinylierten doppelsträngigen Oligonukleotiden, welche die E-Box1 oder E-Box2 des proximalen Teils des *CDH1* Promotors enthalten, bei 4°C für 4 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 80 µL Streptavidin-Agarose zugegeben und das Gemisch bei 4°C für 16 Stunden inkubiert. Die Streptavidin-Agarose wurde mittels Zentrifugation präzipitiert und 3 Mal gewaschen. Die Präzipitate wurden dann in einem 9% SDS-Polyacrylamid Gel

aufgetrennt und nach Standard Western Blot Protokoll auf eine PVDF Membran transferriert. Dann wurde die Membran mit dem anti-Snail Antikörper (E-18) inkubiert und dieser wie oben beschrieben detektiert. 1 Prozent des Ausgangsmaterials wurde als Ladungskontrolle benutzt und mittels Western Blot analysiert. Die verwendeten 5' biotinylierten Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgeführt.

2.2.16 Reverse-Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Gesamt-RNA wurde aus den Zelllinien mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Qiagen RNeasy Kit gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde in H₂O eluiert und die Konzentration der Eluate photometrisch mit einem Nanodrop Photometer gemessen. 1µg der Gesamt-RNA wurde dann für die reverse Transkription in komplementäre einzelsträngige DNA (cDNA) eingesetzt. Diese Reaktion wurde mit Reagenzien von Applied Biosystems in einem Bioemtra Thermocycler nach dem in Tabelle 11 beschriebenen Schema und nachfolgendem Programm durchgeführt: 10 min bei 25°C, 1 h bei 48°C, 5 min bei 95°C und Pause bei 4°C. Die Proben wurden dann bei -20 Grad gelagert.

Tabelle 11: Pipettierschema RT-PCR

Reagenz	finale Konzentration
10 x TaqMan RT Puffer	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	5,5 mM
dNTP-Mix	500 µM je Base
random hexamers	2,5 µM
RNase Inhibitor	0,4 U/µl
Multiscribe Reverse Transkriptase (50 U/µl)	1,25 U/µl
RNA	1 µg
Wasser, RNase frei	auf 100 µl

2.2.17 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

5 ng der cDNA wurden für die quantitative Echtzeit PCR (qPCR) eingesetzt. Hierbei wird ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR) welcher neu synthetisierte doppelsträngige DNA bindet und nur im gebundenen Zustand detektiert werden kann zur Quantifizierung des PCR Produkts genutzt. Das Reaktionsgemisch zur Quantifizierung spezifischer Genprodukte mittels spezifischer Primer (siehe Tabelle 8) wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 12: Pieltierschema quantitative Echtzeit-PCR

Reagenz	Konzentration Stamm Lsg.	Konzentration final
2 x SYBR MM Puffer	2 x	1 x
FP (forward Primer)	10 μ M	100nM
RP (reverse Primer)	10 μ M	100nM
Matritze (5ng)	diverse	diverse
Wasser auf 25 μ l	1x	1x

Die PCR wurde in einem StepOnePlus™ Real-Time PCR System in einem 96-Well Format durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Step One Software (Applied Biosystems).

2.2.18 Genexpressionsanalysen (mRNA Microarray)

Microarray Analysen wurden nach dem Standardprotokoll von Affymetrix durchgeführt. Gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit gemäß des Standardprotokolls in Duplikaten sowohl von der parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zelllinie als auch von der metastatischen P2 Zelllinie isoliert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mit einem NanoDrop Gerät bestimmt. 5 μ g der gesamt-RNA

wurden in die cDNA Synthese eingesetzt (Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit). Die gewonnene doppelsträngige cDNA wurde dann aufgereinigt (Sample Cleanup Module). Die gereinigte cDNA wurde anschließend in einer In-Vitro-Transkription (IVT) in cRNA umgeschrieben und mit Biotin markiert (GeneChip IVT Labeling Kit). Nach einem erneuten Reinigungsschritt wurde die markierte cRNA photometrisch quantifiziert und mittels Agarosegelelektrophorese auf ihre Integrität geprüft. Die markierte cRNA wurde anschließend fragmentiert und auf GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrays hybridisiert. Die Rohdaten der Microarray Experimente wurden mit Hilfe der „robust multi-array average“ (RMA) Methode auf ihre Qualität geprüft und normalisiert. Weiterführende bioinformatische Analysen wie „principal component analysis“, Bestimmung von differentiell exprimierten Genen und „Heatmap“ Generierung wurden mit R und Bioconductor software sowie CIMminer (Genomics and Bioinformatics Group, National Institutes of Health)(Weinstein, Myers, et al. 1997) durchgeführt. Die bioinformatischen Analysen wurden mit der freundlichen Hilfe von Dr. Jörg Mages (Insitut für medizinische Mikrobiologie, TUM) und Philipp Eser (Genzentrum München) durchgeführt.

2.2.19 Histochemie, Immunhistochemie, und Immunzytochemie

Für histologische Gewebeanalysen wurden die Gewebe für 24h in 4% Paraformaldehyd bei 4 Grad fixiert. Dann wurden die Gewebe drei Mal für je 15 Minuten in PBS gewaschen. Die Entwässerung wurde mit einem Entwässerungssystem der Firma Leica durchgeführt. Anschließend wurden die Gewebe in Parafin eingegossen und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Färbungen wurden 3µm dicke serielle Schnitte mit einem Microtom angefertigt und

auf Superfrost Objekträger aufgezogen. Zur morphologischen Analyse wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte mit HistoClear zweimal 15 Minuten lang entparafinisiert. Anschließend folgte eine Ethanolreihe mit absteigenden Konzentrationen (100%, 96% und 80%). Die Schnitte wurden in jeder Alkoholkonzentration je zwei Mal drei Minuten inkubiert. Dann wurden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt und anschließend für eine Minute in Hämatoxylin gefärbt. Nach diesem Färbeschritt wurden die Schnitte für 5 Minuten mit fließendem Wasser gespült, bis keine Farbwolken mehr abwaschbar waren. Dann erfolgte die Färbung in Eosin für 30 Sekunden mit anschließender Inkubation in destilliertem Wasser und einer aufsteigenden Ethanolreihe. Zuletzt wurden die Schnitte 2 mal 5 Minuten in HistoClear gereinigt. Dann wurden sie mithilfe von Pertex Mounting Medium und Deckgläschen eingebettet. Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte wie oben beschrieben entparafinisiert und rehydriert. Um die Antigene nach der Fixierung wieder freizulegen wurden die Schnitte in Unmasking Lösung in einer Mikrowelle für 10 Minuten bei 600 Watt gekocht. Dann wurden die Schnitte für weitere 45 Minuten zum Abkühlen in der Pufferlösung belassen. Die Schnitte wurden dann in destilliertes Wasser transferiert und anschließend mit 3% H₂O₂ für 15 Minuten lichtgeschützt geblockt. Danach wurden die Schnitte einmal mit destilliertem Wasser und zweimal mit PBS für je drei Minuten gewaschen. Als nächstes wurde das Gewebe mit 5% Ziegen Serum in PBS mit Avidin für 15 Minuten geblockt. Nach einem erneuten Waschriff in PBS wurde mit 5% Ziegen Serum-PBS Lösung mit Biotin für 15 Minuten geblockt. Dann wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und mit dem spezifischen Erstantikörper in verschiedenen Verdünnungen (1:100, E-cadherin; 1:100, CK-19 [TROMAIII]; 1:30, Snail [ab17732]) in 5% Ziegen Serum-PBS Lösung über Nacht bei 4 Grad inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte 3 Mal mit PBS gewaschen und es folgte die Inkubation mit einem biotinylierten Zweitantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Erneut wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und dann für 30 Minuten in ABC-Lösung inkubiert. Anschliessend wurden die Schnitte wieder 3 Mal mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion des Zweitantikörpers wurde mit DAB Lösung unter Sicht unter einem Mikroskop durchgeführt. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin wie oben beschrieben. Für die immunzytochemische Detektion von E-cadherin in den Zelllinien TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}, P1 und P2 wurden Zellen in einer Dichte von 2×10^5 pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 15 Minuten fixiert und permeabilisiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Antikörper gegen E-cadherin in einer Verdünnung von 1:100 in 5% BSA-PBS für 2 Stunden bei 37 Grad inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde ein Alexa555 fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:500 in 5% BSA-PBS für eine Stunde zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden dann erneut mit PBS gewaschen und die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die mikroskopische Analyse wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit einem Zeiss Kamerasystem aufgenommen. Die Bildanalyse erfolgte mit der AxioVision 4.3 Software.

2.2.20 Datenanalyse

Die verschiedenen Datensätze wurden mittels Varianzanalysen, Student's t-Test oder Mann-Whitney Rank Sum Test miteinander verglichen (Graph Pad Prism Software). Bei der Anwendung von Multiplen Tests, wurde eine Korrektur des p-

Werts nach Bonferroni vorgenommen. Die Metastasierungsfrequenzen wurde mittels Fisher Exact Test verglichen. Hierfür wurde StatXact-4.0.1 software benutzt. Ein p-Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1. *In vivo* Selektion von Pankreaskarzinomzellen mit hohem Lungenmetastasierungspotential

Um biologische Prozesse, die im Rahmen des Metastasierungsprozesses von Pankreaskarzinomzellen eine wichtige Rolle spielen, zu identifizieren und sukzessiv zu analysieren, wurde ein neu etabliertes *in vivo* Selektionsmodell benutzt (Abb. 2). Die murine Pankreaskarzinomzelllinie TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} wurde aufgrund der Eigenschaft, dass sie *in vivo* ein geringes Metastasierungspotential aufweist, als Modellzelllinie ausgewählt. Um hochgradig metastasierende Subzelllinien der parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zelllinie zu generieren, wurde die Ausgangszelllinie in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert und der Metastasierungsprozess in die Lunge longitudinal mittels *in vivo* Biolumineszenzbildgebung (BLI) überwacht (Abb. 2). Sobald Metastasen in der Bildgebung sichtbar wurden und/oder sich der klinische Zustand der Maus verschlechterte, wurden die Mäuse getötet. Die in der Biolumineszenzbildgebung detektierten Metastasen wurden mittels fluoreszenzgestützter stereomikroskopischer Detektion der EGFP Expression der Zellen verifiziert. Dann wurden die Tumorzellen aus den Metastasen isoliert und als Einzelzellsuspension in Kultur gebracht. Die isolierten Zellen konnten aufgrund des von ihnen exprimierten Neomycin-Geneticin-Resistenzgens (Aminoglykosid-Phosphotransferase) mit Hilfe von Geneticin *in vitro* von mauseigenen Zellen wie Fibroblasten und Zellen des Lungenparenchyms gereinigt werden. Auf diese Weise konnte die Subzelllinie P-1 aus der parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} generiert werden. P-1 Zellen wurden dann erneut in weitere Nacktmäuse injiziert, um Subzelllinien (P-2) aus den entstandenen Lungenmetastasen zu isolieren, und um gleichzeitig das Lungenmetastasierungspotential der P-1 Zellen zu untersuchen. Die Morphologie der

parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zelllinie und der Subzelllinien P-1 und P-2, und das Ausmass der Lungenmetastasierung wurden histologisch mittels Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbungen von seriellen Schnitten analysiert (Abb. 2 und Tabelle 13).

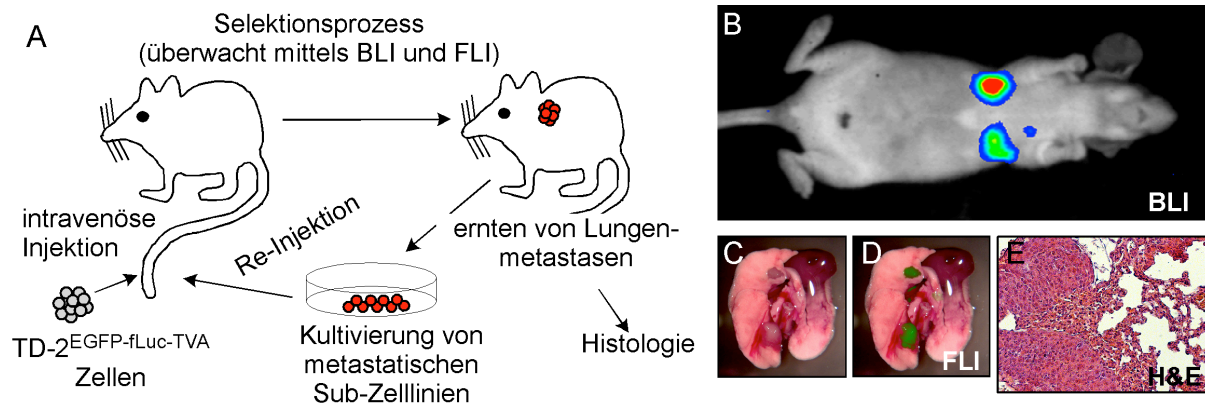


Abbildung 2: *In vivo* Selektion von TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Pankreaskarzinomzellen

(A) *In vivo* Selektionsmodell für die Lungenmetastasierung: die murine Pankreaskarzinomzelllinie TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} welche die Reportergene ‚enhanced green fluorescent protein‘ (EGFP) und ‚firefly luciferase‘ (fLuc) sowie den aviären ‚tumor virus A‘ Rezeptor (TVA) exprimieren, wurden intravenös in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert. Entstandene Lungenmetastasen wurden anschließend isoliert und mit Selektionsmedium kultiviert um Subzelllinien der Ausgangszelllinie zu generieren. Diese Subzelllinien wurden in die Schwanzvenen von Nacktmäusen re-injiziert, um durch den Prozess der *in vivo* Selektion Subzelllinien mit hochgradigem Lungenmetastasierungspotential zu generieren. (B–D) Überwachung des Metastasierungsprozesses *in vivo* mittels Biolumineszenzbildgebung (BLI) und *ex vivo* mittels Fluoreszenzbildgebung (FLI). (B) Stabile Expression von ‚firefly luciferase‘ in TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen erlaubt die longitudinale Überwachung des Metastasierungsprozesses *in vivo* mittels BLI. (C und D) Makroskopischer Aspekt der Lungenmetastasen von Mäusen, die mit TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen injiziert wurden. Die EGFP Expression der TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Metastasen wurde mittels Fluoreszenzbildgebung unter einem Stereomikroskop visualisiert. Ein Weißlichtbild (C) und ein korrespondierendes Fluoreszenzbild der Lungenmetastasen wurden übereinander projiziert (D). (E) Histologische Verifikation der Lungenmetastasen mittels H&E-Färbung an Paraffinschnitten der Lungen von Nacktmäusen, die mit TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen injiziert wurden.

Mäuse die mit der Ausgangszelllinie TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} injiziert wurden, entwickelten lediglich in 14% der Fälle Lungenmetastasen (2 von 14 Tieren; siehe Tabelle 13). Dagegen wiesen die Subzelllinien P-1 und P-2 ein signifikant höheres Metastasierungspotential auf. Die Subzelllinie P-1 metastasierte in 60 % der

injizierten Tiere in die Lungen und 100% der Tiere, die mit der P-2 Zelllinie injiziert wurden, entwickelten Lungenmetastasen (Tabelle 13; $P < 0.001$, P-2 vs. TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}; berechnet mit Fisher's Exact Test).

Somit konnten mit Hilfe des von uns implementierten *in vivo* Selektionsmodells, aus einer murinen Pankreaskarzinomzelllinie mit niedrigem Lungenmetastasierungspotential, Subzelllinien generiert werden, welche ein hohes Lungenmetastasierungspotential aufweisen.

Tabelle 13: Lungenmetastasierungspotential von parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} und *in vivo* selektionierten P-1 und P-2 Pankreaskarzinomzellen

Zelllinie	Tumorigenität	Lungenmetastasierung
TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA}	14/14	2/14
P-1	5/5	3/5
P-2	10/10	10/10**

Die Versuchstiere wurden 120 Tage nach intravenöser Injektion der parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} oder der *in vivo* selektionierten P-1 oder P-2 Zelllinien analysiert. Metastasen wurden mittels *in vivo* Biolumineszenzbildgebung, *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung und histopathologischer Analyse identifiziert. Der Vergleich des Lungenmetastasierungspotentials zwischen der parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} und der P-2 Zelllinie wurde mit dem Fisher's Exact Test durchgeführt (** $P < 0.001$, verglichen mit TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}).

3.2. Die metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 durchlaufen eine Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT)

Die isolierten metastatischen Subzelllinien zeigen deutliche morphologische Veränderungen gegenüber der TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Ausgangszelllinie. TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen weisen einen epithelialen Phänotyp auf, wohingegen die hochgradig metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 einen mesenchymalen Phänotyp

aufweisen (Abb. 3A). So zeigen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen *in vitro* ein typisches epitheliales Wachstumsmuster mit engen Zell-Zell Kontakten und einschichtigen epithelialen Kolonien. Zellen der Subzelllinien P-1 und P-2 weisen keine solche Adhäsionen zwischen den einzelnen Zellen auf und wachsen in der Mehrzahl als einzelne Zellen, bzw. in irregulären, teilweise mehrschichtigen Formationen. Zusätzlich zeigen die Subzelllinien im Gegensatz zu den kubischen epithelialen Zellen der Ausgangszelllinie eine elongierte fibroblastenähnliche mesenchymale Morphologie. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es während des *in vivo* Selektionsprozesses zu einer Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) gekommen ist (Abb. 3A). Die beobachteten morphologischen Veränderungen spiegeln sich auch in den globalen Genexpressionsprofilen der verschiedenen Zelllinien wider. Die Subzelllinie P-2 zeigte im Vergleich zur Ausgangszelllinie eine vermehrte Expression etablierter mesenchymaler Markergene und gleichzeitig eine Herabregulierung bekannter epithelialer Marker (Tabelle 14).

Zusammen genommen unterstützen diese Beobachtungen die Hypothese, dass das erhöhte Metastasierungspotential der Subzelllinien die Folge einer Epithelialen-Mesenchymalen Transition ist, welche während des *in vivo* Selektionprozesses aufgetreten ist.

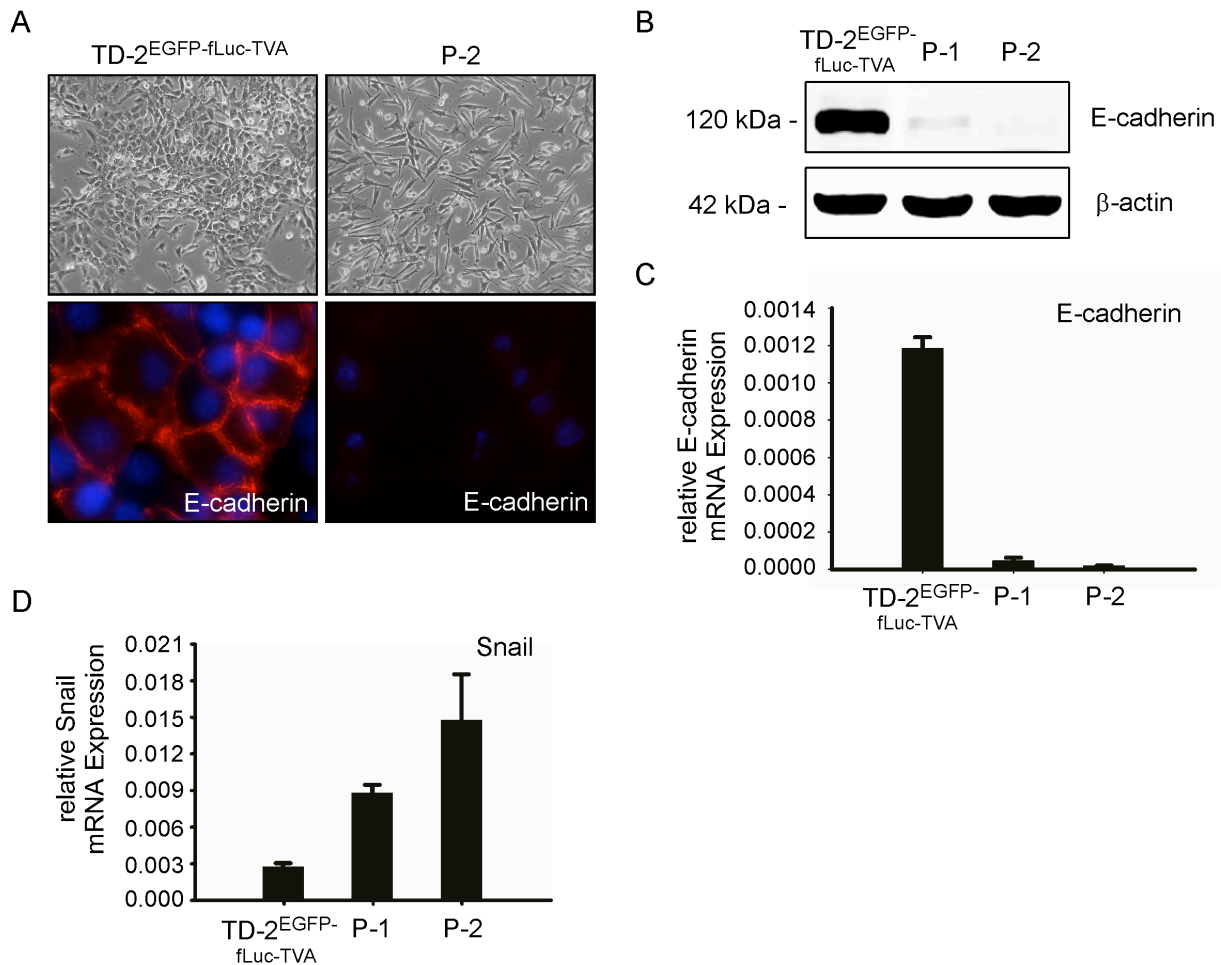


Abbildung 3: Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Verlust der E-cadherin Expression in den metastatischen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Subzelllinien P-1 und P-2

(A) Oben: Phasenkontrastbilder von kultivierten parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen (linkes Bild; epithelialer Phänotyp) und *in vivo* selektionierten metastatischen P-2 Zellen (rechtes Bild; mesenchymaler Phänotyp). Unten: Immunzytochemie der E-cadherin Expression. Die Fluoreszenzbilder zeigen eine detektierbare E-cadherin Expression (rot) nur in parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen, nicht aber in Zellen der metastatischen Subzelllinie P-2. (B) Western blot Analyse der E-cadherin Expression in TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}, P-1 und P-2 Zellen. Um die gleiche Proteinladung aller Proben sicherzustellen, wurden die Membranen mit einem spezifischen Antikörper gegen β -Aktin inkubiert. (C,D) Quantitative RT-PCR zur Bestimmung der E-cadherin (C) und Snail (D) mRNA Expression. Gesamt-RNA wurde aus TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}, P-1 und P-2 Zellen isoliert. Die E-cadherin und Snail mRNA Expression wurde mittels Echtzeit RT-PCR mit Standardkurven für die entsprechenden Gene ermittelt und gegen die mRNA Expression des global exprimierten und nicht regulierten „housekeeping“ Gens Cyclophilin aus der gleichen RNA Präparation normalisiert. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung (+ S.D) von drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 14: Differentiell exprimierte Gene in parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} und *in vivo* selektionierten metastatischen P-2 Zellen (P-2 vs. TD-2^{EGFP-fLuc-TVA})

Acc. No.	Gensymbol	Genname	epithelialer vs. mesenchymaler Marker	x-fache Veränderung (P-2 vs TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA})
<i>Hochreguliert</i>				
NM_007743	COL1A2	procollagen, type I, alpha 2	mesenchymal	33
NM_153138	WASPIP	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	mesenchymal	10
NM_011658	TWIST1	twist gene homolog 1 (Drosophila)	mesenchymal	4.2
NM_019724	MMP16	matrix-metalloproteinase 16	mesenchymal	3.1
NM_023118	DAB2	disabled homolog 2 (Drosophila)	mesenchymal	2.9
NM_007993	FBN1	fibrillin 1	mesenchymal	2.1
NM_010233	Fn1	fibronectin 1	mesenchymal	1.7
NM_009263	SPP1	secreted phosphoprotein 1	mesenchymal	1.7
NM_019724	SNAI1	snail homolog 1 (drosophila)	mesenchymal	1.6
<i>Herabreguliert</i>				
NM_009864	CDH1	cadherin 1 (E-cadherin)	epithelial	- 10
NM_016773	NUCB2	nucleobindin 2	epithelial	- 5.1
NM_172647	F11R	F11 receptor	epithelial	- 4.9
NM_008770	CLDN11	claudin 11	epithelial	- 4.2
NM_008471	KRT1-19	keratin complex , acidic, gene 19	epithelial	- 3.0
XM_484245	DSP	desmoplakin	epithelial	- 2.4
NM_010593	JUP	junction plakoglobin	epithelial	- 2.0

Aus TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} und P-2 Zellen wurde RNA isoliert, prozessiert und mit dem GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array (Affymetrix) hybridisiert. Differentiell exprimierte Gene sind in der Tabelle aufgelistet. Die Daten zeigen die x-fache Änderung des Expressionswertes des entsprechenden Gens in P-2 Zellen in Relation zu dem Expressionswert in der Ausgangszelllinie.

3.3. Die metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 sind durch den Verlust des Adhäsionsproteins E-cadherin charakterisiert

Das Genexpressionsprofil der Subzelllinie P-2 zeigt eine deutliche Herabregulierung des epithelialen Markers E-cadherin verglichen mit der Ausgangszelllinie (Tabelle

14). Der Verlust der Expression von E-cadherin stellt einen wichtigen Schritt bei der Epithelialen-Mesenchymalen Transition dar (Zavadil, Haley, et al. 2008). Da dieser Prozess mit einem gesteigerten Metastasierungspotential assoziiert ist, und die Regulation von E-cadherin im PDA weitgehend unklar ist, haben wir die Subzelllinien P-1 und P-2 zusammen mit der Ausgangszelllinie TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} als Modellsystem verwendet. In TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen konnten sowohl hohe mRNA Expressionsspiegel, als auch Proteinmengen von E-cadherin nachgewiesen werden (Abb. 3B, C). Im Gegensatz dazu zeigten P-1 Zellen eine verminderte und P-2 Zellen einen kompletten Verlust der E-cadherin Expression (Abb. 3B, C). Mittels Immunzytochemie konnte der E-cadherin Expressionsverlust in der Subzelllinie P-2 auf Proteinebene verifiziert werden. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass E-cadherin in den Zellen der Ausgangszelllinie TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} eine regelrechte Lokalisation an interzellulären Kontaktstellen aufweist. Dies spricht für eine regelrechte Funktion des Adhäsionsproteins in den TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen (Abbildung 3 A). Parallel zur Herabregulierung der E-cadherin Expression in den Subzelllinien zeigte sich in den globalen Genexpressionsprofilen eine vermehrte Expression des bekannten E-cadherin Repressors Snail (Lin, Dong, et al. 2013). Dies konnte auf mRNA Ebene mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR validiert werden (Abb. 3D). Hier konnte eine 3,5 fache Induktion der Expression von Snail in den P-1 Zellen und eine 6 fache Induktion in P-2 Zellen gegenüber der Ausgangszelllinie detektiert werden. Da Zellen der Subzelllinie P-2 durch einen kompletten Verlust der E-cadherin Expression charakterisiert sind, sprechen diese Beobachtungen für einen gendosisabhängigen Effekt von Snail bei der Repression des *E-cadherin (CDH1)* Gens (Abb. 3).

3.4. Die Inhibition von Histondeacetylasen führt zu einer Reaktivierung der E-cadherin Expression

Neben der transkriptionellen Repression durch einen Transkriptionsfaktor stellt die epigenetische Modifikation des *CDH1* Gens einen potentiellen Mechanismus der Repression dar. Um dies in unserem Modellsystem zu untersuchen, haben wir zwei wesentliche Mechanismen der epigenetischen Modifikation, nämlich die Repression der Genexpression durch die Methylierung von CpG Sequenzen im Bereich des Genpromotors und die Deacetylierung durch Histondeacetylasen (HDACs) näher untersucht (McCleary-Wheeler, Lomber, et al. 2013). Histondeacetylasen wurden durch die Behandlung der Zelllinien mit Trichostatin A (TsA) inhibiert. Eine globale Demethylierung wurde durch die Behandlung der Zellen mit 5'-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) herbeigeführt. Hier zeigte sich, dass die Behandlung der Subzelllinien mit TsA zu einer Reexpression von E-cadherin führte. Dieser Effekt war dosisabhängig, wobei eine höhere Konzentration von TsA zu einer stärkeren Reexpression von E-cadherin führte. Der beobachtete Effekt konnte nicht durch eine Behandlung der Zellen mit DMSO, das als Lösungsmittel von TsA dient, herbeigeführt werden (Abb 4A, B). Im Gegensatz zu TsA führte die Behandlung der Subzelllinien mit dem Demethylierungsmittel 5-Aza nicht zu einer Reexpression von E-cadherin (Abb. 4B). Diese Daten sprechen für eine kausale Rolle der Histondeacetylasen bei der Repression des *Cdh1* Gens in unserem Modellsystem. Veränderungen der Methylierung des *Cdh1* Gens hingegen scheinen in unserem Modellsystem keinen wesentlichen Einfluss zu haben.

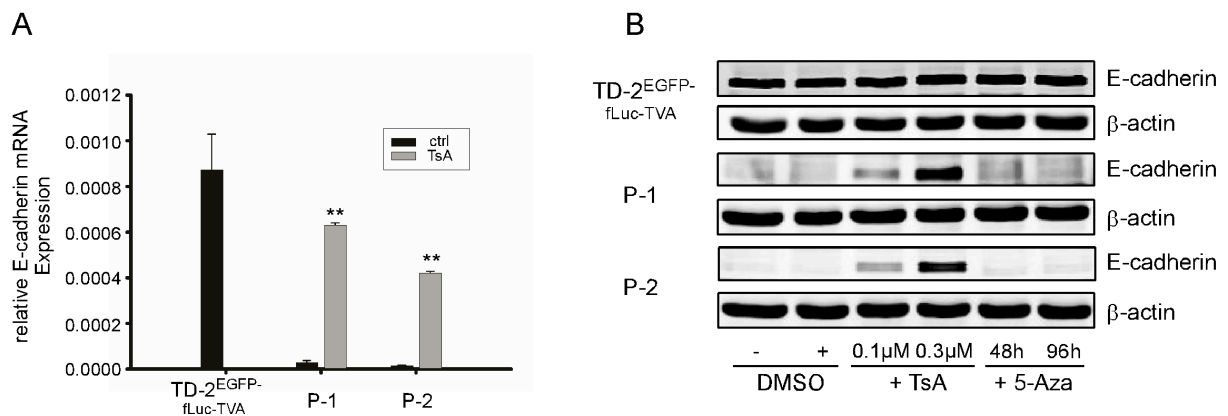


Abbildung 4: Epigenetische Repression der E-cadherin Expression durch Histondeacetylasen (HDACs) in den metastatischen P-1 und P-2 Zellen

(A) P-1 und P-2 Zellen wurden für 24 Stunden mit dem HDAC Inhibitor Trichostatin A (TsA; 0.3 μM) oder DMSO als Kontrolle (ctrl) behandelt. Die E-cadherin mRNA Expression wurde mittels Echtzeit qRT-PCR quantifiziert und gegen das „housekeeping“ Gen Cyclophilin normalisiert. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung (+ S.D) dreier unabhängiger Experimente. (Student's t-Test: ** $P < 0.001$, TsA vs. Kontrolle). (B) Western Blot Analyse der E-cadherin Expression in parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} (oben), und den metastatischen P-1 (mitte) und P-2 (unten) Subzelllinien nach der Behandlung mit 0.1 μM und 0.3 μM TsA für 24 Stunden oder dem Demethylierungagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza; 1 μM) für 48 oder 96 Stunden. Unbehandelte und DMSO behandelte Zellen wurden als Kontrollen benutzt. Die Membranen wurden mit Strippingpuffer behandelt und als Ladungskontrolle mit einem spezifischen Antikörper gegen β-actin inkubiert.

3.5. Ein Snail/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplex reprimiert die E-cadherin Expression in den metastatischen Subzelllinien

Um die transkriptionelle Regulation des E-cadherin Gens genauer zu untersuchen, führten wir Chromatin Immunpräzipitationen (ChIP) durch. Als Ausdruck einer starken Expression des *Cdh1* Gens und passend zu den Ergebnissen der Westernblot Analysen konnte in der Ausgangszelllinie TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} eine starke Bindung der RNA Polymerase II an den Promotor des *Cdh1* Gens gezeigt werden (Abb. 5A). In den metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2, in denen die E-cadherin Expression reprimiert ist, zeigte sich wie erwartet keine Bindung von RNA

Polymerase II an den *Cdh1* Promotor. Stattdessen konnte in den Zellen der metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 eine Bindung des transkriptionellen Repressor *Snail* an den *Cdh1* Promotor nachgewiesen werden (Abb. 5A). Passend zu den durchgeführten Genexpressionsstudien korrelierten die Mengen an gebundenem Snail Protein sehr gut mit dem mRNA Expressionsniveau in TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}, P-1 und P-2 Zellen (Abb. 5A und 3D). Desweiteren zeigte sich in den ChIP Experimenten, dass die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2, nicht jedoch HDAC3 und mSin3a in den metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 spezifisch an den *Cdh1* Promoter rekrutiert werden und dort binden. Entsprechend weist das epigenetische Acetylierungsmuster von Histon 4 des *Cdh1* Promotors in den parental TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen eine transkriptions-permissive Struktur des Chromatins auf (offenes Chromatin). Im Falle der Subzelllinien P-1 und P-2 zeigt sich hier das Bild von transkriptionell inaktivem Heterochromatin (Abb. 5A). Um den repressiven Charakter der Bindung von HDAC1 und HDAC2 an den *Cdh1* Promotor in den metastatischen Subzelllinien zu zeigen, wurden die Zellen mit TsA behandelt und dann erneut mittels ChIP untersucht. Passend zu unserer Hypothese führte eine Inhibition der HDAC Aktivität zu einer Induktion der Bindung von RNA Polymerase II an den *Cdh1* Promotor in den metastatischen Subzelllinien (Abb. 5A). Gleichzeitig zeigte sich eine Dissoziation der HDACs vom *Cdh1* Promotor nach TsA Behandlung (Abb. 5A). Eine solche TsA induzierte Dissoziation von HDACs von ihrem Zielpromotor wurde in mehreren Zelllinien beschrieben und ist wahrscheinlich Ausdruck einer vermehrten nukleären Mobilität nach TsA Behandlung (Gialitakis, Kretsovali, et al. 2006); (Kato, Tanaka, et al. 2007). Die beschriebenen regulatorischen Mechanismen sind spezifisch für den *Cdh1* Promotor und wurden nicht am *Albumin* Promotor gesehen, welcher als Negativkontrolle benutzt wurde

(Abb. 5A). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die epigenetische Modifikation des *Cdh1* Promotors durch eine Snail vermittelte Rekrutierung von HDAC1 und HDAC2 eine wichtige Rolle bei der Repression des *Cdh1* Gens in den metastatischen Subzelllinien spielt.

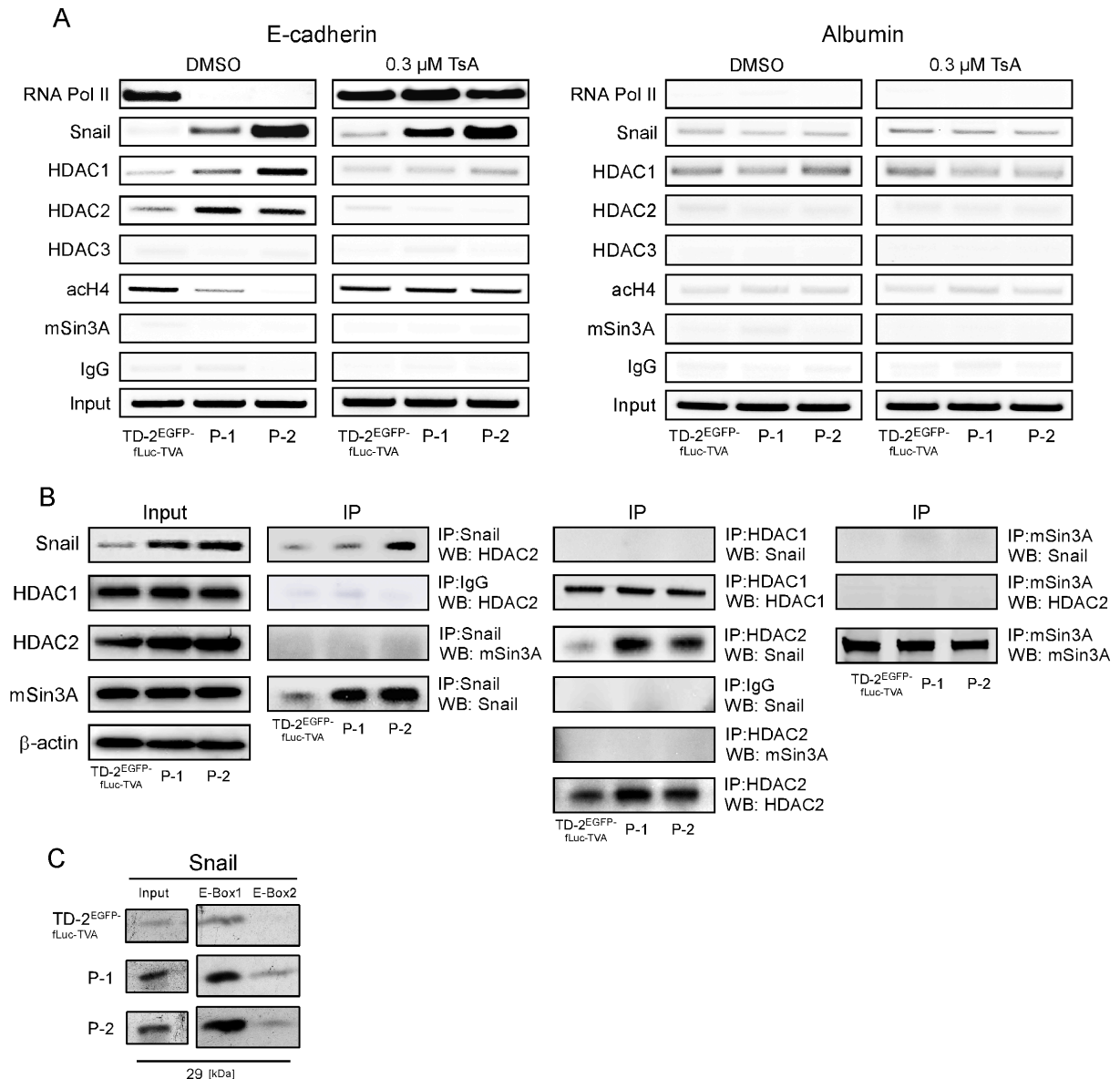


Abbildung 5: Bindung eines Snail/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplexes an den basalen E-cadherin Promotor in den metastatischen Subzelllinien P1 und P2

(A) Chromatin Immunpräzipitationsanalyse (ChIP) des proximalen *E-cadherin* (*Cdh1*) Promotors und des *Albumin* Promotors (Kontrolle). Chromatin von TD-2^{EGFP}-fLuc-TVA, P-1 oder P-2 Zellen welche für 24 Stunden mit DMSO (Kontrolle; linke Spalte) oder für die gleiche Zeit mit 0,3 μ M TsA (rechte Spalte) behandelt wurden, wurde mit

spezifischen Antikörpern gegen RNA-polymerase II, Snail, HDAC1, HDAC2, HDAC3, acetyliertes Histon 4, und mSin3A immunpräzipitiert. Eine Präzipitation mit einem IgG Antikörper diente als Negativkontrolle. Die präzipitierte DNA oder 10% des Chromatins als Input wurden mit spezifischen Primern für den proximalen Teil des *Cdh1* Promotors und des *Albumin* Promotors amplifiziert. (B) Co-Immunpräzipitation von Snail, HDAC1, HDAC2, und mSin3A mit spezifischen Antikörpern in TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}, P-1, und P-2 Zellen. Das präzipitierte Protein wurde dann mittels Western Blot analysiert, wobei ein Prozent des präzipitierten Proteins als Input Kontrolle verwendet wurde. Diese Experimente wurden von Herrn Dr. von Burstin in Philadelphia, USA durchgeführt. (C) Avidin-biotin-complex-DNA binding Assay mit doppelsträngigen 5' biotinylierten Oligonukleotiden, welche die Sequenzen der E-Box1 und E-Box2 des proximalen *Cdh1* Promotors enthalten.. Ganzzellextrakte von TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}, P-1 und P-2 Zellen wurden mit den entsprechenden Oligonukleotiden inkubiert und das gebundene Protein wurde mittels Westernblott mit einem Antikörper gegen Snail detektiert. 10 Prozent der Ganzzellextrakte wurden als Inputkontrolle benutzt.

3.6 Der RNAi vermittelte Knockdown von Snail und HDAC2 induziert die Reexpression von E-cadherin in den metastatischen P-2 Zellen

Um den Beitrag von Snail und HDAC2 bei der Repression des *Cdh1* Gens in P-2 Zellen funktionell zu analysieren, transfizierten wir P-2 Zellen mit spezifischen siRNAs gegen Snail und HDAC2. 48 Stunden nach der Transfektion wiesen die mit den spezifischen siRNAs transfizierten P-2 Zellen eine deutlich verminderte Snail und HDAC2 Expression auf (Abb. 6A, C). Die Depletion von Snail führte zu einer 4,5 fachen Induktion der E-cadherin Expression im Vergleich zu Kontroll siRNA behandelten P-2 Zellen. HDAC2 depletierte Zellen zeigten eine 2 fach erhöhte E-cadherin mRNA Expression gegenüber den Kontroll-transfizierten Zellen (Abb. 6B, D). Diese Beobachtungen validieren die Repressorfunktion von Snail und HDAC2 gegenüber des *Cdh1* Gens in unserem Model der Lungenmetastasierung.

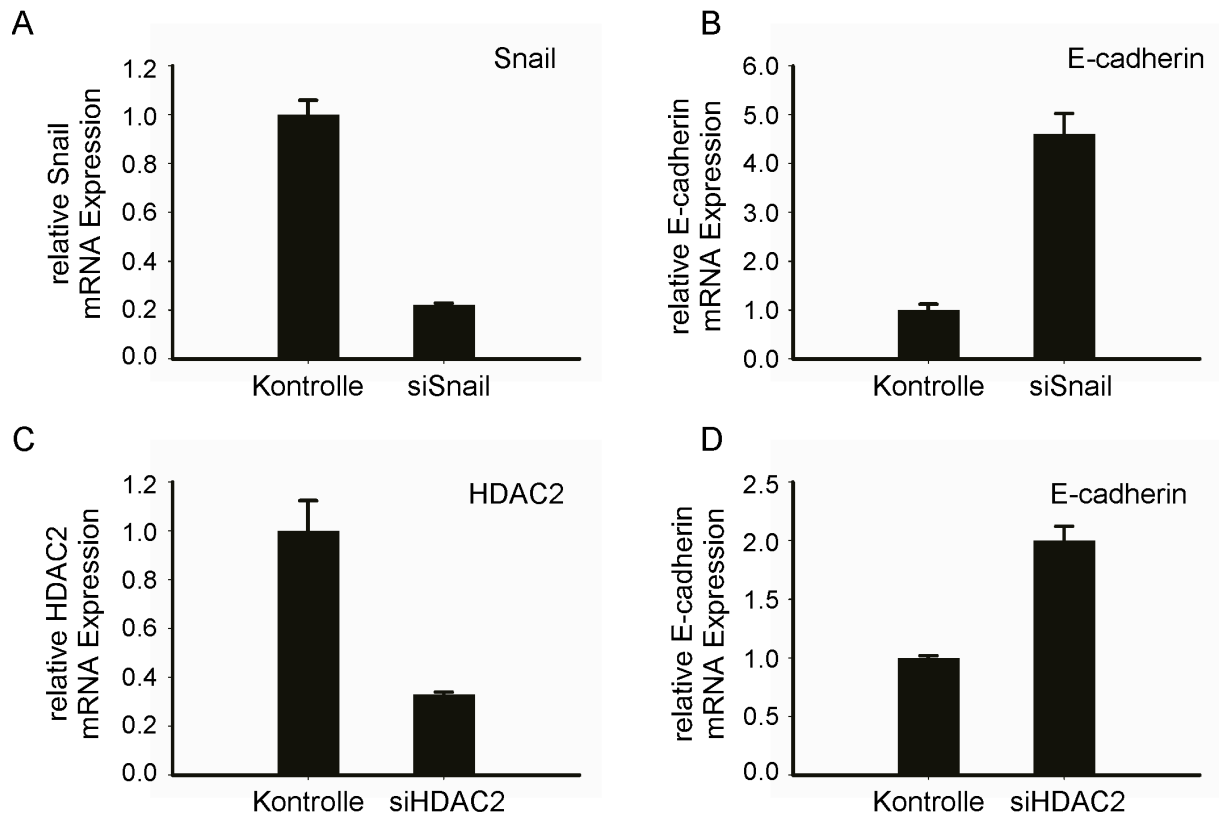


Abbildung 6: Der RNAi vermittelte ‘Knockdown’ von Snail oder HDAC2 induziert die E-cadherin mRNA Expression in metastatischen P-2 Zellen

(A) Snail mRNA Expression in P-2 Zellen, welche mit Snail- oder Kontroll-siRNAs (Kontrolle) transfiziert wurden. Die Snail mRNA Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion mittels Echtzeit qRT-PCR ermittelt und gegen die Cyclophilin mRNA Expression normalisiert. (B) E-cadherin mRNA Expression in P-2 Zellen die mit Snail- oder Kontroll-siRNAs (Kontrolle) transfiziert wurden. Die E-cadherin mRNA Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion mittels Echtzeit qRT-PCR ermittelt und gegen die Cyclophilin Expression normalisiert. (C) HDAC2 mRNA Expression in P-2 Zellen, welche mit siRNAs gegen HDAC2 oder Kontroll-siRNAs (Kontrolle) transfiziert wurden. Die HDAC2 mRNA Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion mittels Echtzeit qRT-PCR ermittelt und gegen die Cyclophilin Expression normalisiert. (D) E-cadherin mRNA Expression in P-2 Zellen die mit HDAC2- oder Kontroll-siRNA (Kontrolle) transfiziert wurden. Die E-cadherin Expression wurde 48 Stunden nach der Transfektion mittels Echtzeit qRT-PCR ermittelt und gegen die Cyclophilin Expression normalisiert. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung (+ S.D) von drei unabhängigen Experimenten.

3.7 Die genetische Inaktivierung von E-cadherin in parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen induziert eine EMT *in vitro* und erhöht die Lungenmetastasierung *in vivo*

Um den funktionellen Beitrag des E-cadherin Verlustes zur EMT und zum Metastasierungsprozess zu zeigen, transduzierten wir parentale TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen mit einem dominant-negativen-E-cadherin (dn-E-cad) (Dahl, Sjodin, et al. 1996) oder mit lacZ als Kontrolle. Für die Transduktion der TVA exprimierenden TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen wurde das RCAS-TVA Gentransfersystem und aviäre retrovirale Vektoren mit einer Expressionskassette für ein dominant-negatives-E-cadherin Protein oder einer Lac-Z Expressionskassette verwendet (Orsulic 2002), (Seidler, Schmidt, et al. 2008). Die Expression des dominant-negativen-E-cadherins führte in den parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen zu einer Destabilisierung und konsekutiven Degradation des funktionellen endogenen E-cadherin Proteins (Abb. 7A) (Dahl, Sjodin, et al. 1996). Passend zu einer kausalen Rolle von E-cadherin in der Beibehaltung des epithelialen Phänotyps von TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen, zeigten die mit dn-E-cad transduzierten Zellen einen Verlust der ursprünglichen epithelialen Morphologie mit einer Transition zu einem mesenchymalen Phänotyp. Dies wurde in den lacZ transduzierten TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Kontrollen nicht beobachtet (Abb. 7B).

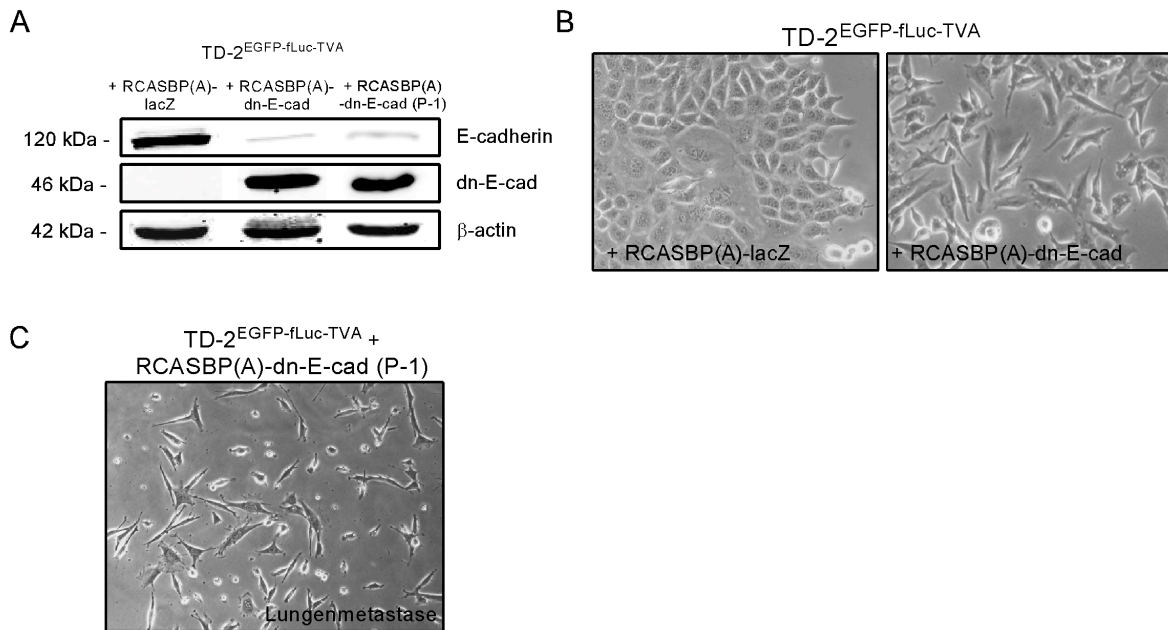


Abbildung 7: Inaktivierung von E-cadherin in parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen induziert EMT und Lungenmetastasierung *in vivo*

Parentale TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen wurden mit dem retroviralen Vektor RCASBP(A)-dominant-negatives-E-cadherin (dn-E-cad) oder dem Kontrollvektor RCASBP(A)-lacZ transduziert. Anschließend wurden die Zellen in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert um das Potential der transduzierten Zellen zur Lungenmetastasierung zu evaluieren. (A) Western Blot der endogenen E-cadherin- und dn-E-cad Proteinexpression von TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen welche mit RCASBP(A)-lacZ oder RCASBP(A)-dn-E-cad Vektoren transduziert wurden (links, mitte), bzw. von RCASBP(A)-dn-E-cad (P-1) Zellen welche nach Injektion in die Schwanzvene einer Nacktmaus aus einer Lungenmetastase isoliert wurde (rechts). Die Membranen wurden mit Strippingpuffer behandelt und als Ladungskontrolle mit einem spezifischen Antikörper gegen β-actin inkubiert. (B) Hellbilder von RCASBP(A)-lacZ infizierten TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen (Kontrolle; linker Bildausschnitt: epithelialer Phänotyp) und RCASBP(A)-dn-E-cad infizierten TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen (rechter Bildausschnitt: mesenchymaler Phänotyp). (C) Zelllinien aus Lungenmetastasen von Nacktmäusen in die RCASBP(A)-dn-E-cad transduzierte TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen injiziert wurden, weisen weiterhin einen mesenchymalen Phänotyp auf.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass das Lungenmetastasierungspotential der dn-E-cad exprimierenden TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen im Vergleich zu den parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen signifikant erhöht war (Tabelle 15).

Im Gegensatz zu den parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen, welche nach intravenöser Injektion nur in 10% der Mäuse Lungenmetastasen ausbildeten, kam es in 66% der Mäuse, welche mit dn-E-cadherin exprimierenden TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen injiziert

wurden, zu detektierbaren Lungenmetastasen (Tabelle 13, $P < 0.05$; Fisher's Exact Test). Darüber hinaus konnten wir beobachten, dass aus Lungenmetastasen isolierte dn-E-cadherin exprimierende TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen den induzierten mesenchymalen Phänotyp beibehielten und morphologisch P-2 Zellen stark ähneln (Abb. 7A, C). Diese Daten zeigen, dass E-cadherin eine essentielle Rolle bei dem Prozess der EMT spielt und dass die Herabregulierung von E-cadherin das Metastasierungspotential von TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen *in vivo* signifikant steigert.

Tabelle 15: Die Expression eines dominant-negativen-E-cadherin (dn-E-cad) Proteins in parentalen TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Pankreaskarzinomzellen erhöht das Potential der Lungenmetastasierung *in vivo* signifikant

Zelllinie	Tumorigenität	Lungenmetastasierung
TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA}	10/10	1/10
TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} + RCASBP(A)-dn-E-cadherin	6/6	4/6*

Parentale TD-2^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen wurden mit einem viralen Expressionsvektor für dominant-negatives E-cadherin (RCASBP(A)-dn-E-cad) transduziert. Anschließend wurden diese Zellen in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert um ihr metastastisches Potential zu evaluieren. Die Mäuse wurden spätestens 120 Tage nach der Injektion analysiert. Metastasen wurden mittels *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung (BLI) und histopathologischer Analyse identifiziert. Der Vergleich des Lungenmetastasierungspotentials zwischen den beiden Gruppen wurde mit Hilfe des Fisher's Exakt Tests durchgeführt (* $P < 0.05$, verglichen mit TD-2^{EGFP-fLuc-TVA}).

3.8 Murine metastatische Pankreaskarzinomzelllinien mit einer mesenchymalen Morphologie weisen ein mesenchymales Genexpressionsprofil auf

In den globalen Genexpressionsprofilen isolierter muriner Pankreaskarzinomzelllinien können Zeichen einer stattgehabten EMT identifiziert werden. Alle untersuchten murine Pankreaskarzinomzelllinien, welche *in vitro* eine mesenchymale Morphologie

aufweisen, zeigen im Vergleich zu Pankreaskarzinomzelllinien mit einem epithelialen Phänotyp eine Herabregulation von E-cadherin. (Abb. 8A, B). Zusätzlich weisen diese Zellen weitere EMT typische Veränderungen in ihren Genexpressionsprofilen auf. Es finden sich Veränderungen in der Expression von Genen der vier etablierten Kategorien der EMT Marker (Zelloberflächenproteine, Zytoskeletproteine, Proteine der extrazellulären Matrix und Transkriptionsfaktoren) (Zeisberg und Neilson 2009) (Abb. 8 A). In der Kategorie der Zelloberflächenproteine zeigt sich eine 50 fache Herabregulation von E-cadherin und zugleich eine 3,5 bzw 60 fache Überexpression der mesenchymalen Cadherine N-Cadherin (neuronales Cadherin) und OB-cadherin (osteoblasten Cadherin) (Kaur, Phillips-Mason, et al. 2012). Anhand der Expressionslevel dieser drei Gene, können murine Pankreaskarzinomzelllinien mit einer epithelialen Morphologie *in vitro* eindeutig von denen mit einer mesenchymalen Morphologie unterschieden werden (Abb. 8 B).

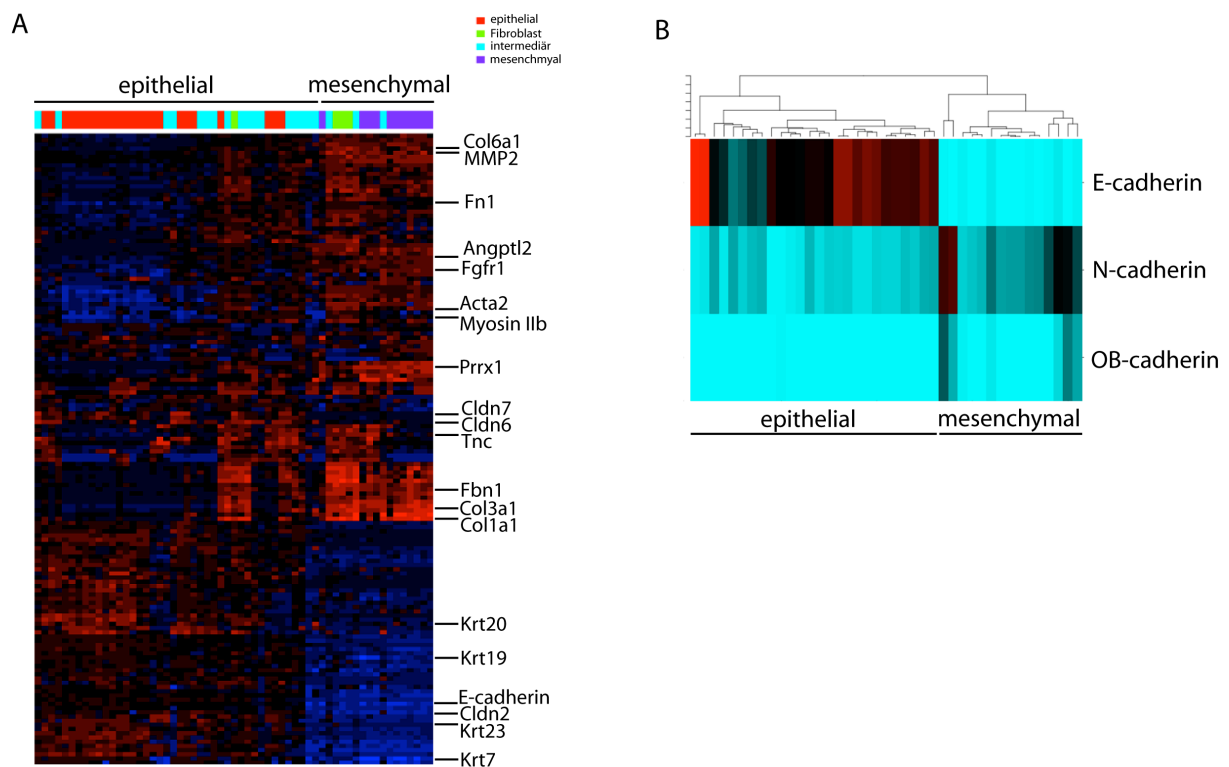


Abbildung 8: Globale Genexpressionsanalysen muriner mesenchymaler und epithelialer Pankreaskarzinomzelllinien

Isolierte, niedrig passagierte murine Pankreaskarzinomzelllinien mit einer klassischen epithelialen Morphologie, einem intermediären bzw. einem mesenchymalen Phänotyp sowie murine Fibroblasten wurden mittels Microarrayanalysen untersucht. (A) Mittels hierarchischer Clusteranalyse können epitheliale und mesenchymale Pankreaskarzinomzelllinien unterschieden werden. Es zeigen sich EMT typische Veränderungen in der Expression von bekannten epithelialen und mesenchymalen Genen in den mesenchymalen Zelllinien. (B) Mittels CIMminer Analyse (Bioinformatics Group, National Cancer Institute) kann anhand der gezeigten drei Cadherine zwischen murinen Pankreaskarzinomzelllinien mit einer klassischen epithelialen Morphologie und murinen mesenchymalen Pankreaskarzinomzelllinien eindeutig unterschieden werden. Die Microarrayexperimente wurden von Stefan Eser, Dr. Mariel Paul und Dr. Annegret Schmidt durchgeführt und von Dr. Jörg Mages, Philipp Eser und Stefan Eser ausgewertet.

Auch Gene die für Proteine des Zytoskeletts kodieren, zeigen ein Expressionsmuster im Sinne einer stattgehabten EMT. Es findet sich eine verminderte Expression mehrerer epithelialer Zytokeratine (Krt 7, 19 und 20) und eine Hochregulierung des EMT Markers α -SMA (alpha smooth muscle actin) (Acta2) (Sarrío, Rodríguez-Pinilla, et al. 2008) (Abb. 8A). Auch in der Kategorie von Genen, welche für Proteine der extrazellulären Matrix kodieren, finden sich EMT typische Muster. Insbesondere die Kollagene Col1a1 und Col3a1, welche mit EMT und Invasivität in Lungen- und Mammakarzinomen (Shintani, Maeda, et al. 2008), (Asiedu, Ingle, et al. 2011) assoziiert sind, zeigen hohe Expressionswerte in den mesenchymalen Pankreaskarzinomzelllinien (Abb. 8A). In der Gruppe der Transkriptionsfaktoren zeigt sich in den mesenchymalen Pankreaskarzinomzelllinien eine durchschnittlich 7,1 bzw. 3,6 bzw. 2,7 fache Überexpression der bekannten EMT Marker Prrx1, Snail und Twist im Vergleich zu den epithelialen PDA Zelllinien (Ocana, Corcoles, et al. 2012). Der differentiell exprimierte Transkriptionsfaktor Snail konnte wie oben beschrieben als funktioneller Mediator der EMT und der Lungenmetastasierung in den *in vivo* selektionierten TD-2 Zellen validiert werden. Die in unserem vorwärtsgerichteten funktionellen Screen als EMT- und metastasierungs-relevant identifizierten HDACs

zeigten bei hoher Expression in allen Pankreaskarzinomzelllinien keine signifikant differentielle Expression zwischen den epithelialen und mesenchymalen Pankreaskarzinomzelllinien. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass die beiden Histondeacetylasen von Snail an den E-cadherinpromoter rekrutiert werden und somit lediglich als Korepressoren dienen.

3.9 Die Herabregulierung von E-cadherin im murinen Pankreaskarzinom ist HDAC-vermittelt und mit EMT und Metastasierung assoziiert

Um den Einfluss der HDAC-vermittelten Repression von E-cadherin auf die EMT und den Metastasierungsprozess in einem breiteren Kontext zu untersuchen, analysierten wir die E-cadherin Regulation in einem genetisch definierten murinen Pankreaskarzinommodell, welches die wesentlichen Schritte des human Pankreaskarzinoms rekapituliert (Hingorani, Petricoin, et al. 2003). Immunhistochemische Analysen von metastatischen murinen Pankreaskarzinomen zeigten eine deutliche E-cadherin Expression in gut differenzierten zentralen Anteilen des Primärtumors und einen Verlust der E-cadherin Expression an der invasiven Front des Primärtumors als Hinweis einer durchlaufenen EMT (Abb. 9D, E). Ferner zeigten die Tumorzellen an der invasiven Front weitere Zeichen einer EMT, wie einen Verlust der CK-19 Expression, welche in gut differenzierten E-cadherin positiven Anteilen der Primärtumoren detektierbar war (Abb. 9G, H). Auch in Lebermetastasen der gleichen Tiere zeigte sich ein Verlust der CK-19 und E-cadherin Expression (Abb. 9F, I). Parallel zu diesem Verlust der Expression epithelialer Marker zeigte sich eine deutliche Snail Expression in den Zellkernen schlecht differenzierter Tumorzellen (Abb. 9K, L). Gut differenzierte duktale Tumoren wiesen hingegen keine nukleäre Snail Expression auf (Abb 9J).

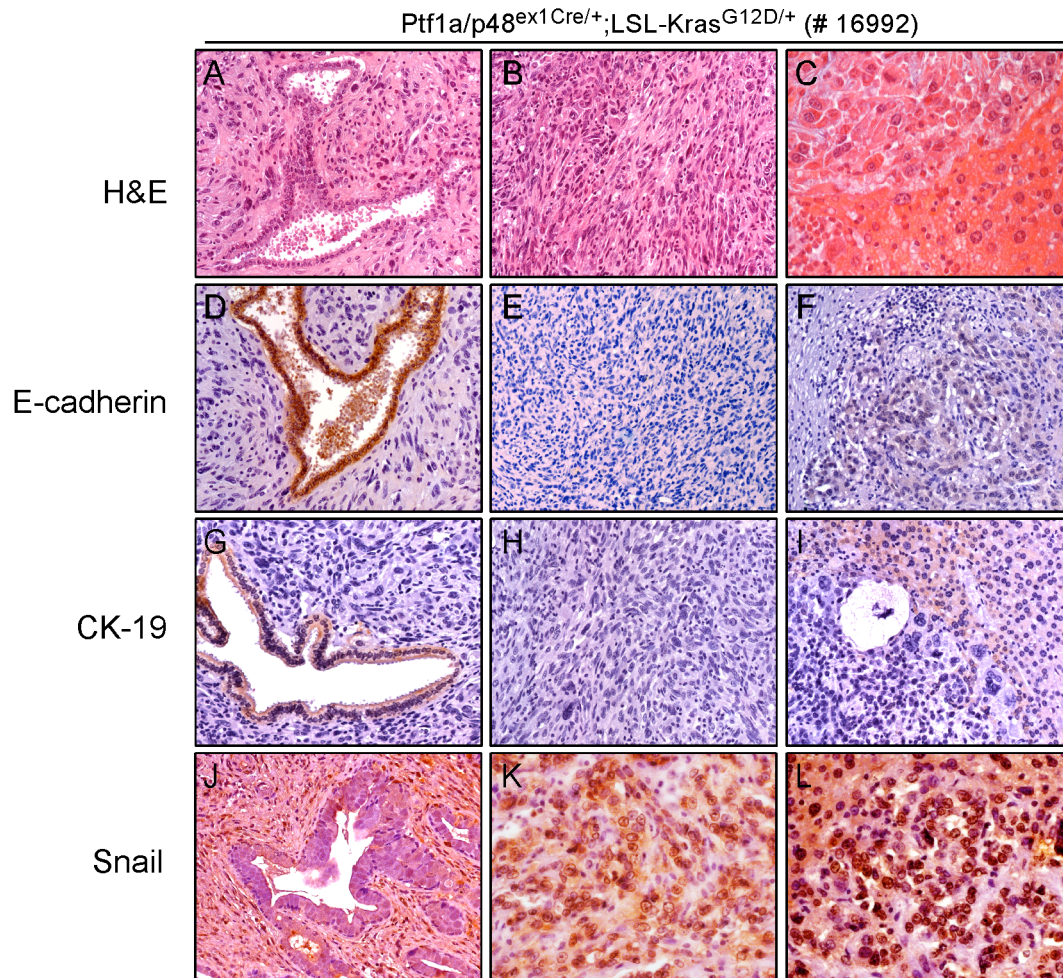


Abbildung 9: EMT und Herabregulierung von E-cadherin in einem genetisch definierten *Kras*^{G12D} abhängigen Mausmodell des Pankreaskarzinoms

(A-C) H&E gefärbte Paraffinschnitte eines murinen Pankreaskarzinoms zeigen Zellen eines gut differenzierten duktales PDA im Zentrum des Tumors (A) sowie schlecht differenzierte sarkomatoide Tumorzellen an der invasiven Front des Primärtumors (B) und in den korrespondierenden Lebermetastasen (C) einer *Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* Maus (#16992). (D-I) Immunhistochemische Färbung von E-cadherin und CK-19 an korrespondierenden Paraffinschnitten (D,G: gut differenzierter Primärtumor; E,H: schlecht differenzierte Tumorzellen an der invasiven Front; F,I: Lebermetastasen). (J-L) Immunhistochemische Färbung von Snail in gut (J) und schlecht differenzierten Tumoranteilen des Primärtumors (K) und den korrespondierenden Lebermetastasen (L).

Um diese deskriptiven Daten in größerem Detail zu untersuchen, analysierten wir eine aus dem oben gezeigten Primärtumor isoliert Tumorzelllinie. Passend zu den Ergebnissen der histologischen Analysen zeigte die korrespondierende niedrig passagierte (P<4) Zelllinie 16992 einen mesenchymalen Phänotyp *in vitro* (Abbildung 10). Diese Zelllinie zeigte einen Verlust der E-cadherin Expression und hohe mRNA

Spiegel etablierter mesenchymaler Marker in der quantitativen RT-PCR Analyse (Abb. 10A, B). Auch *in vivo*, nach orthotoper Implantation der Zelllinie in Nacktmäuse, behielten die Zellen ihren E-cadherin negativen mesenchymalen Phänotyp bei und zeigten ein hohes Metastasierungspotential in die Leber und die Lunge (Abb. 10C-H). Um zu zeigen, dass die Regulation von E-cadherin auch in diesen Zellen HDAC-vermittelt ist, behandelten wir die Zellen mit TsA. Wie erwartet führte die Behandlung der Zellen zu einer Reexpression von E-cadherin. Dies konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 10I, J). Desweiteren war die Reexpression von E-cadherin durch HDAC Inhibition dosisabhängig. Diese Beobachtungen zeigen die Bedeutung der Histondeacetylasen in der Repression des *Cdh1* Gens im murinen Pankreaskarzinom eindrücklich auf.

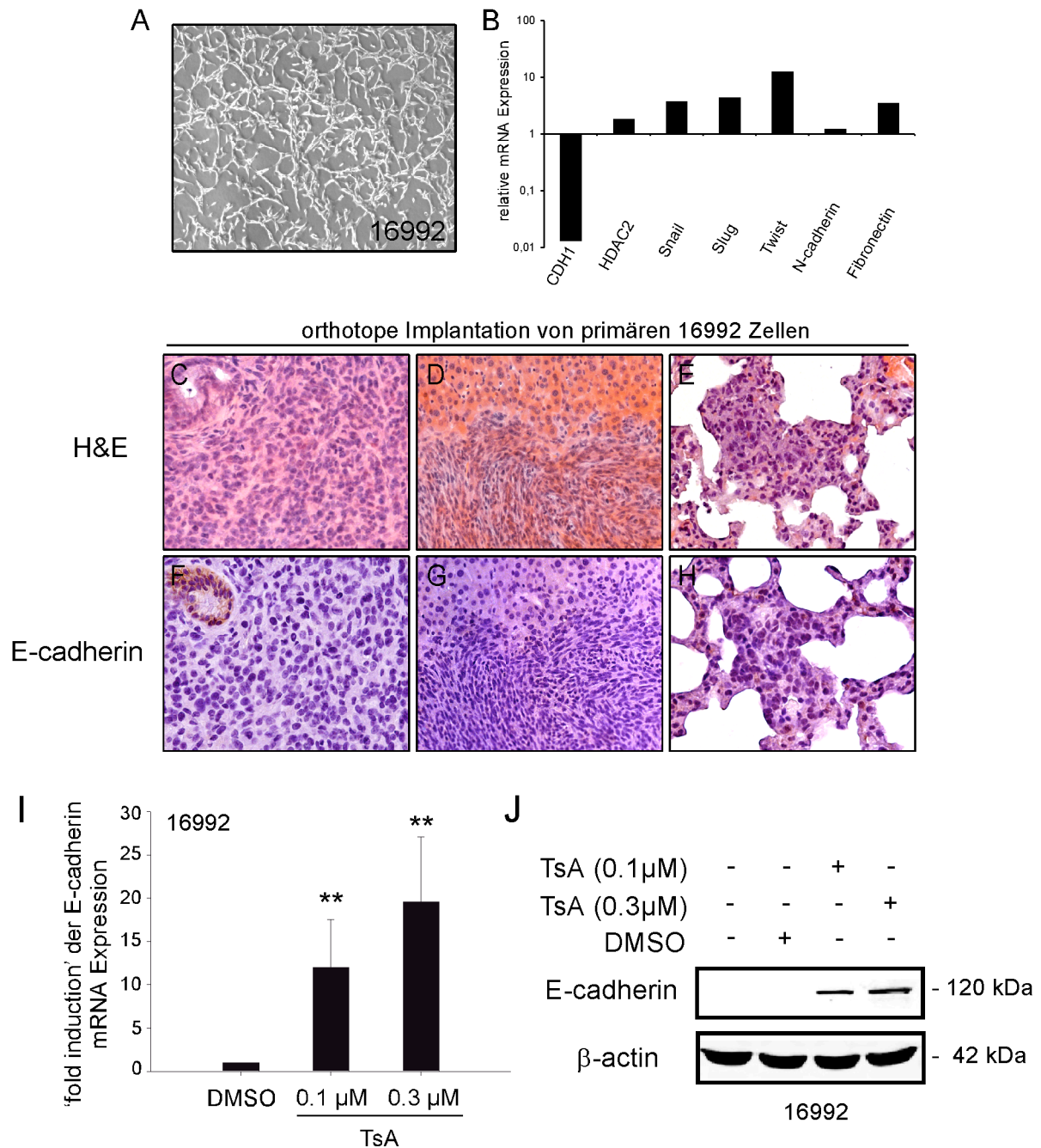


Abbildung 10: Epigenetische Inaktivierung der E-cadherin Expression in mesenchymalen *Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* Pankreaskarzinomzellen mit hohem Metastasierungspotential

(A) Phasenkontrastbild von niedrig passagierten Zellen (P<4) der Zelllinie 16992, welche aus dem metastatischen Primärtumor einer *Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* Maus (#16992) isoliert wurden (siehe Abb. 9). Die Zellen zeigen einen mesenchymalen Phänotyp. (B) Relatives mRNA Expressionsniveau der genannten epithelialen und mesenchymalen Markergene in 16992 Zellen verglichen mit Tumorzellen aus einem epithelialen Primärtumor einer *Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* Maus. Die mRNA Expression der entsprechenden Gene wurde mittels Echtzeit qRT-PCR quantifiziert und gegen das global exprimierte „house-keeping“ Gen Cyclophilin aus der gleichen RNA Präparation normalisiert. Daten, welche in den Teilen A und B dieser Abbildung dargestellt sind, wurden von Frau Dr. Mariel

Paul erhoben. (C-H) Mesenchymale 16992 Tumorzellen wurden orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen implantiert und das Ausmaß der Metastasierung mittels makroskopischer und mikroskopischer pathologischer Untersuchung analysiert. (C-E) H&E gefärbte Paraffinschnitte der orthotopen Pankreaskarzinome (C) sowie von Leber- (D) und Lungenmetastasen (E). (F-H) Die immunhistochemische Färbung der E-cadherin Expression im Primärtumor (F) und in den Leber- (G) und Lungenmetastasen (H) zeigt einen Verlust der E-cadherin Expression. (I) 16992 Zellen wurden mit Trichostatin A (TsA) oder DMSO als Kontrolle für 24 Stunden behandelt. Die E-cadherin mRNA Expression wurde mittels Echtzeit qRT-PCR quantifiziert und gegen die mRNA Expression des global exprimierten Gens Cyclophilin normalisiert. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert mit Standardabweichung (+ S.D) von drei unabhängigen Experimenten. (Student's T-test: $**P < 0.001$ versus Kontrolle (DMSO)). (J) Western Blot Analyse der E-cadherin Proteinexpression in 16992 Zellen die für 24 Stunden mit TsA behandelt wurden. Nicht behandelte und mit DMSO behandelte Zellen dienten als Kontrolle. β -actin wurde als Ladungskontrolle benutzt.

3.10 HDAC Aktivität ist für die epigenetische Repression von E-cadherin im murinen und humanen Pankreaskarzinom essentiell

Um die Rolle der HDAC-vermittelten epigenetischen Repression von E-cadherin als generellen Mechanismus während der EMT im murinen und humanen Pankreaskarzinom zu validieren, untersuchten wir die Expression von E-cadherin in mehreren murinen primären mesenchymalen Pankreaskarzinomzelllinien und einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie mit und ohne HDAC Inhibitor Behandlung. Hierfür wurde der globale HDAC Inhibitor TsA und der für die Histondeacetylasen der Klasse I (HDAC 1, 2, 3 und 8) selektive Inhibitor Valproinsäure (VPA) benutzt. Die vier verwendeten niedrig passagierten ($P < 4$) mesenchymalen murinen Pankreaskarzinomzelllinien wurden von Primärtumoren oder Lymphknotenmetastasen von gentechnisch definierten *Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}* oder *Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tp53^{lox/lox}* Mäusen isoliert und zeichnen sich durch einen Verlust von E-cadherin und einer gleichzeitigen Expression mesenchymaler Marker wie Snail, Slug und Twist1 aus (Abb. 11B, C). Durch die Inhibition der HDAC

Aktivität mittels TSA konnte in allen untersuchten E-cadherin negativen mesenchymalen Zelllinien die E-cadherin Expression induziert werden. Dieser Effekt war dosisabhängig und war in den mit DMSO behandelten Kontrollen nicht zu beobachten (Abb. 11D). Der gleiche Effekt konnte durch eine Behandlung der Zellen mit dem Klasse I selektiven HDAC Inhibitor Valproinsäure erzielt werden (Abb. 11E). Um den Beitrag von HDACs zur Herabregulierung von E-cadherin auch in humanen Zellen zu untersuchen, bedienten wir uns eines etablierten TGF β abhängigen Modells der EMT (Ellenrieder, Hender, et al. 2001). Hierfür wurde die epitheliale E-cadherin exprimierende humane Pankreaskarzinomzelllinie Panc1 benutzt. Die TGF β Behandlung von Panc1 für 48h induziert eine EMT der Zellen und eine Herabregulierung der E-cadherin Expression (Abb. 11F). Durch eine simultane Behandlung der TGF β stimulierten Zellen mit VPA konnte die EMT und die Herabregulierung der E-cadherin Expression verhindert werden (Abb. 11F). Diese Daten legen nahe, dass die Snail vermittelte Rekrutierung von HDACs an den Promotor des *CDH1* Gens eine wichtige Rolle bei der Repression von E-cadherin während der EMT und des Metastasierungsprozesses von Pankreaskarzinomzellen spielt (Abb. 11G).

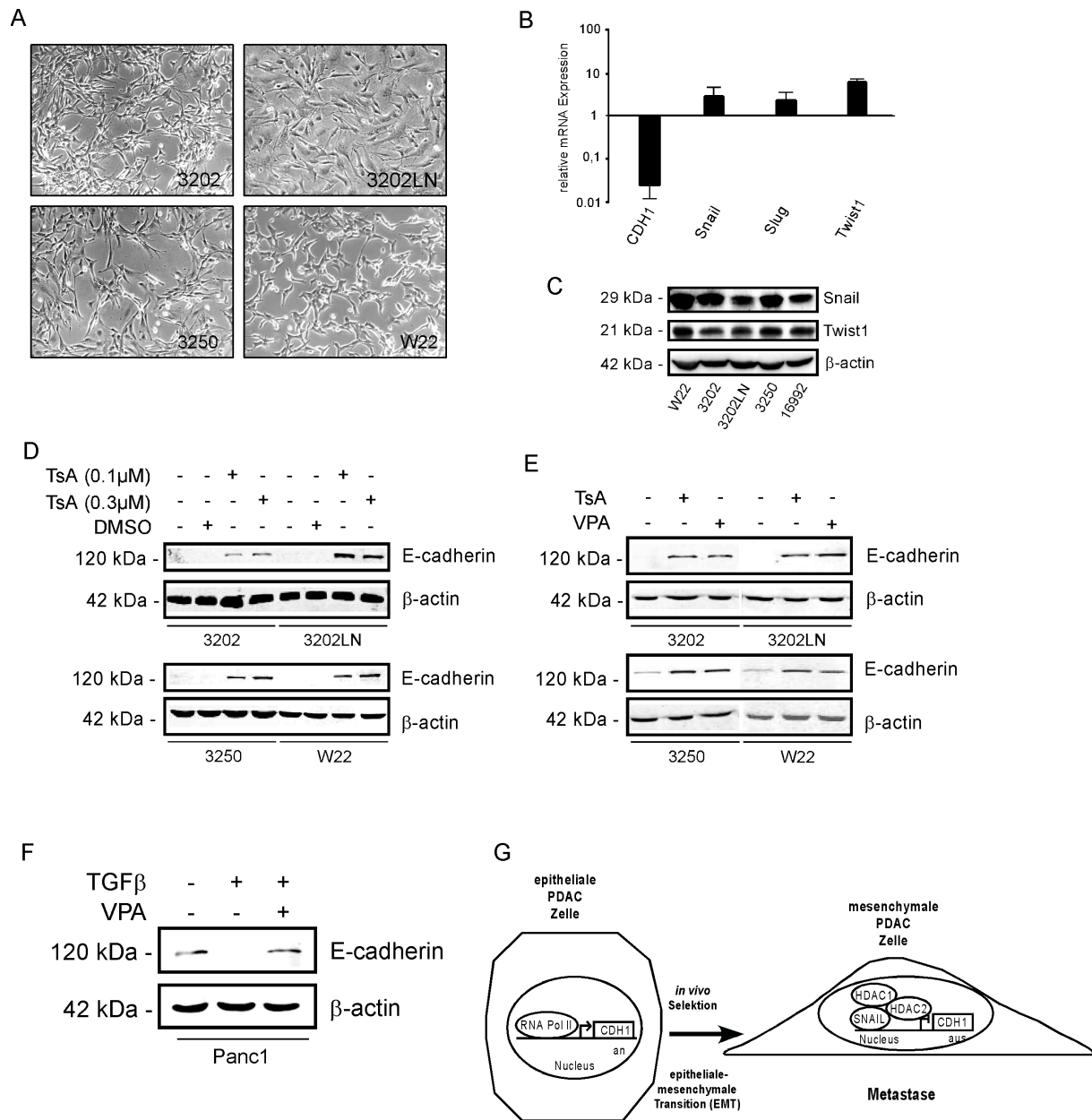


Abbildung 11: HDAC Aktivität vermittelt die Repression der E-cadherin Expression im mesenchymalen murinen und humanen Pankreaskarzinom

(A) Phasenkontrastbilder von 4 niedrig passagierten mesenchymalen murinen PDAC Zelllinien, welche aus primären Pankreaskarzinomen (3202, 3250, W22) und Lymphknotenmetastasen (3202LN) von $Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ oder $Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tp53^{lox/lox}$ Mäusen isoliert wurden. (B) qRT-PCR Analyse der relativen mRNA Expression der genannten Gene in den mesenchymalen 3202, 3202LN, 3250, und W22 Zelllinien verglichen mit vier epithelialen Zelllinien, die aus $Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}$ und $Ptf1a/p48^{ex1Cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tp53^{lox/lox}$ Mäusen isoliert wurden. (C) Western blot Analyse der Snail und Twist1 Proteinexpression in den mesenchymalen Pankreaskarzinomzelllinien. Die in (B) und (C) gezeigten Experimente wurden von Frau Dr. Mariel Paul durchgeführt (D) Western Blot Analyse der E-cadherin Proteinexpression in den bezeichneten unbehandelten und für 24 Stunden mit DMSO oder mit TsA behandelten mesenchymalen PDA Zellen. Die Membranen wurden mit Strippingpuffer behandelt und als Ladungskontrolle mit einem

spezifischen Antikörper gegen β -actin inkubiert. (E) Western Blot Analyse der E-cadherin Expression in den mesenchymalen PDA Zelllinien nachdem sie für 24 Stunden entweder mit TsA (0.3 μ M) oder dem HDAC Klasse I (1, 2, 3 und 8) selektiven Inhibitor Valproinsäure (VPA; 1.5mM) behandelt wurden. (F) Western Blot Analyse der E-cadherin Proteinexpression in humanen Panc1 Pankreaskarzinomzellen in denen mit TGF β eine EMT induziert wurde. Panc1 Zellen wurden für 48 Stunden mit TGF β (10ng/ml) stimuliert um eine EMT zu induzieren. Western Blot Analyse der E-cadherin Proteinexpression in Zelllysaten von unbehandelten Zellen, TGF β -stimulierten Zellen oder Zellen welche mit TGF β und VPA (1.5mM) behandelt wurden. Dieses Experiment wurde von Frau Martina Brandl durchgeführt. (G) Modell des Metastasierungsprozesses des Pankreaskarzinoms. Ein Snail/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplex vermittelt die Repression des *Cdh1* Promotors. Dies führt zur Induktion der EMT und Metastasierung der Pankreaskarzinomzellen.

4. Diskussion

Die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls E-cadherin als Tumorsuppressor in epithelialen Geweben wurde mehrfach beschrieben (Carneiro, Figueiredo, et al. 2013); (Cowin, Rowlands, et al. 2005). Neben der wichtigen Rolle als Regulator der Homeostase epithelialer Gewebe, wird diesem Protein auch eine antagonisierende Wirkung gegenüber der Motilität und Invasion maligner epithelialer Zellen zugeschrieben (Yilmaz und Christofori 2010).

In dieser Arbeit konnte die Relevanz des E-cadherin Verlustes für die EMT und den Metastasierungsprozess des Pankreaskarzinoms *in vivo* gezeigt werden. Mittels eines *in vivo* Selektionsmodells konnten aus einer murinen epithelialen Pankreaskarzinomzelllinie mit schlechtem Metastasierungspotential, Subzelllinien mit hohem gewebsspezifischen Metastasierungspotential generiert werden. Diese metastatischen Subzelllinien zeigten eine Transformation zum mesenchymalen Phänotyp, im Sinne einer EMT und waren durch den Verlust der E-cadherin Expression charakterisiert.

Die E-cadherin Expression kann im Rahmen der Tumorprogression und des Metastasierungsprozesses durch inaktivierende somatische Mutationen, Promotormethylierung oder auf transkriptioneller Ebene reprimiert werden (van Roy und Berx 2008). Inaktivierende Mutationen des *CDH1* Gens scheinen im Pankreaskarzinom, im Gegensatz zum Magen- und Mammakarzinom, keine wesentliche Rolle zu spielen (Becker, Atkinson, et al. 1993); (Berx, Cleton-Jansen, et al. 1996). So konnten in einer aktuellen Studie keine Mutationen im *CDH1* Gen in den untersuchten humanen Pankreaskarzinomen detektiert werden (Winter, Ting, et al. 2008). Die Hyper-methylierung des *CDH1* Promotors als Ursache des E-cadherin Expressionsverlustes konnte in mehreren Tumorentitäten gezeigt werden. Eine

Hypermethylierung fand sich in Tumorzellen der Mamma, der Prostata, der Lunge und der Blase, und in Zelllinien gastrointestinaler Tumore des Magens, der Leber und des Kolons (Yoshiura, Kanai, et al. 1995). In diesen Zelllinien konnte die DNA-Methylierung, und die daraus resultierende Repression des *CDH1* Gens, durch eine Behandlung der Zellen mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin aufgehoben werden. Dies weist den kausalen Effekt der *CDH1* Promotermethylierung als Ursache des E-cadherin Expressionsverlustes nach (Graff, Herman, et al. 1995); (Yoshiura, Kanai, et al. 1995). Eine Hypermethylierung des *CDH1* Promotors konnte auch in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MiaPaCa2 nachgewiesen werden. Jedoch zeigte eine Untersuchung von humanen Pankreaskarzinomgeweben kein reproduzierbares Muster (Winter, Ting, et al. 2008), sodass es sich hierbei möglicherweise um einen *in vitro* aufgetretenen Effekt handelt.

Diese Studien zeigen, dass die Repression des *CDH1* Gens im Pankreaskarzinom derzeit unvollständig verstanden ist und wahrscheinlich durch transkriptionelle Mechanismen reguliert wird. In dieser Arbeit wird sowohl in murinen als auch humanen Modellen gezeigt, dass die Expression von E-cadherin im Pankreaskarzinom transkriptionell reguliert wird, und dass die transkriptionelle Repression von E-cadherin *in vivo* und *in vitro* an die Aktivität von Histondeacetylasen (HDACs) gekoppelt ist.

Es ist bekannt, dass ein bidirektionaler „Crosstalk“ zwischen den Mechanismen der Histonacetylierung und der DNA-Methylierung besteht (Vaissiere, Sawan, et al. 2008). In einigen Karzinomzelllinien wurde beobachtet, dass eine Inhibition von HDACs durch TSA zu einer Demethylierung des proximalen Anteils des *CDH1* Promotors führt, und somit die Demethylierung ursächlich für die wiederhergestellte Expression von E-cadherin ist (Ou, Torrisani, et al. 2007). Dies konnte in unseren

metastatischen TD-2^{EGFP-fluc-TVA}-Subzelllinien P-1 und P-2 nicht beobachtet werden. Eine Inhibition der HDAC Aktivität mit TsA führte zu einer Re-expression von E-cadherin, nicht aber eine Behandlung mit dem Demethylierungsmittel 5'-Aza-2'-deoxycytidin. Somit kann ein signifikanter Beitrag der Methylierungsmaschinerie zur epigenetischen Repression von E-cadherin in unserem *in vivo* Selektionsmodell ausgeschlossen werden. Neben der beobachteten epigenetischen Modifikation des *Cdh1* Promotors durch HDAC Aktivität, zeigte sich in den metastatischen Subzelllinien P-1 und P-2 eine Hochregulierung des Transkriptionsfaktors Snail. SNAIL wird zusammen mit den Transkriptionsfaktoren SLUG und TWIST als wichtiger Faktor in der Repression des humanen und murinen *CDH1* Gens und in der Induktion der EMT beschrieben (Peinado, Olmeda, et al. 2007). Eine starke bis moderate Expression von SNAIL konnte in 78% der untersuchten Fälle immunhistochemisch in einer kürzlich durchgeführten Studie in humanen Pankreaskarzinomen gezeigt werden. Ein etwas weniger starkes Färbungsmuster konnte für den Transkriptionsfaktor SLUG in 50% der Pankreaskarzinome gezeigt werden. Die Expression des Transkriptionsfaktors TWIST konnte in dieser Studie nur in 3% der Pankreaskarzinome nachgewiesen werden (Hotz, Arndt, et al. 2007). Interessanterweise konnte in dieser Studie auch gezeigt werden, dass Pankreaskarzinome mit einem niedrigen SNAIL Expressions Score einen hohen E-cadherin Expressions Score aufwiesen. Dies war statistisch signifikant und liefert somit einen weiteren Hinweis für einen wichtigen Beitrag von SNAIL in der Repression von E-cadherin im Pankreaskarzinom (Hotz, Arndt, et al. 2007). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen zeigt unsere Arbeit eine vermehrte Expression von Snail in den metastatischen *in vivo* passagierten murinen Subzelllinien P-1 und P-2, die einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen. Ferner

zeigen unsere Daten die spezifische Bindung von Snail an den *Cdh1* Promotor während des Prozesses der EMT und der Lungenmetastasierung. Desweiteren konnten wir nachweisen, dass Snail den *Cdh1* Promotor reprimiert und somit die korrelativen Expressionsdaten aus der genannten humanen Studie funktionell mittels molekularbiologischer Methoden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* validieren.

In den globalen Transkriptomanalysen zeigte sich in den metastatischen Subzelllinien im Vergleich zur Ausgangszelllinie neben der Hochregulation von Snail auch eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Twist, einem bekannten Repressor von E-cadherin. Somit kann ein Beitrag von Twist zur Repression von E-cadherin in unserem *in vivo* Selektionsmodell nicht vollständig ausgeschlossen werden (Kang und Massague 2004). Ob Twist eine kausale Rolle bei der Repression des E-cadherin Gens spielt oder ob die vermehrte Expression von Twist eine Folge des E-cadherin Verlustes ist, wie es in einem Modell der Metastasierung des Mammkarzinoms kürzlich gezeigt werden konnte, ist derzeit für unser Modell nicht bekannt und muss in weiteren Studien untersucht werden (Onder, Gupta, et al. 2008).

Obwohl SNAIL ein bekannter und gut charakterisierter kontextspezifischer Repressor von E-cadherin ist, ist seine Rolle auf Chromatinebene nur unvollständig verstanden. Kürzlich wurde *in vitro* in MDCK (Madin-Darby canine kidney epithelial cells) und MCA3D (murine epidermal cells) Zellen eine Snail abhängige Rekrutierung eines Sin3a/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplexes gezeigt (Peinado, Ballestar, et al. 2004). Im Gegensatz zu diesen Daten beobachteten wir in den hochgradig metastatisierenden Subzelllinien P-1 und P-2 eine Rekrutierung der Klasse I HDACs HDAC1 und HDAC2 zusammen mit Snail an den *Cdh1* Promotor. Eine Bindung von HDAC3 konnte nicht gefunden werden. Das noch verbleibende Klasse I Mitglied

HDAC8 wird in den beiden Subzelllinien P-1 und P-2 nicht exprimiert. Dies zeigt, dass die Expression von E-cadherin in unserem murinen Pankreaskarzinommodell durch einen Snail/HDAC1/HDAC2 Komplex reprimiert wird.

Obwohl auch in Pankreaskarzinomzellen ein funktioneller Sin3A/HDAC2 Komplex gefunden wurde, welcher zu einer Repression des *TGF β RII* Promotors nach TGF- β Stimulation führt (Truty, Lomberk, et al. 2009), konnte in unserem Modell keine gleichzeitige Rekrutierung von murinem mSin3A zusammen mit Snail an den *Cdh1* Promotor beobachtet werden. Desweiteren konnte keine direkte Interaktion zwischen Snail und mSin3A auf Proteinebene gefunden werden (Abbildung 5). Somit zeigen die erhobenen Daten, dass die Interaktion von Snail und mSin3A abhängig vom zellulären Kontext und dem entsprechendem Promotor ist. Der Korepressor, welcher in unserem Modell HDAC1 und HDAC2 an den CDH1 Promotor rekrutiert, ist derzeit nicht bekannt. Hier bedarf es weiterer molekularbiologischer Analysen.

Obwohl in Studien gezeigt werden konnte, dass die Expression von Klasse I HDAC Proteinen mit einer schlechten Prognose in bestimmten Krebsarten assoziiert ist, bleibt die Rolle der HDAC Proteine im Rahmen der Karzinogenese, der Tumorprogression und der Metastasierung nur ungenügend verstanden (Glozak und Seto 2007). In dieser Arbeit konnte mittels eines unvoreingenommenen vorwärtsgerichteten genetischen Ansatzes *in vivo* erstmals funktionell eine essentielle Rolle für Snail und HDAC1/2 bei der Repression von E-cadherin und der Metastasierung des Pankreaskarzinoms gezeigt werden. Die erhobenen Daten zeigen einen funktionellen Synergismus von HDAC1 und HDAC2 und dem transkriptionellen Repressor Snail hinsichtlich der Repression von E-cadherin, der EMT und dem Metastasierungsprozess des Pankreaskarzinoms. HDACs leisten somit einen kritischen Beitrag zur Metastasierung des Pankreaskarzinoms *in vivo*.

Zusammengefasst legen diese präklinischen Daten nahe, dass die pharmakologische Inhibition von HDACs eine vielversprechende antimetastatische Therapiestrategie darstellt. Weitere präklinische Daten konnten für andere Tumorentitäten zeigen, dass HDACs vielversprechende therapeutische Zielstrukturen darstellen. Dies hat bereits zu der Implementierung einer Vielzahl klinischer Studien geführt. So werden derzeit etwa 80 verschiedene Phase I-III Studien zur Behandlung fortgeschrittener hämatologischer und solider Tumoren mit HDAC Inhibitoren (HDACi) durchgeführt (Tan, Cang, et al. 2010). Vorinostat ist der erste HDAC Inhibitor welcher von der Food and Drug Administration (FDA) für den regulären klinischen Einsatz in der Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms freigegeben wurde (Tan, Cang, et al. 2010). Auch Patienten mit fortgeschrittenen Pankreaskarzinomen wurden im Rahmen klinischer Studien mit HDAC Inhibitoren behandelt. Jedoch, wurden diese Patienten zusammen mit Patienten, welche an anderen soliden Tumoren erkrankt waren, in die entsprechenden Studien eingeschlossen. Daher ist es derzeit aufgrund der geringen Anzahl an Pankreaskarzinompatienten nicht möglich, eine adäquate Aussage über die Wirksamkeit der HDACi Therapie zu treffen (Koutsounas, Giaginis, et al. 2013). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass HDAC Inhibitoren als antimetastatische Therapeutika in neoadjuvanten und adjuvanten kontrollierten klinischen Pankreaskarzinomstudien evaluiert werden sollten.

5. Zusammenfassung

Für die extrem schlechte Prognose des duktaalen Pankreaskarzinoms ist vor allem die hohe Letalität durch Metastasen-assoziierte Komplikationen verantwortlich. Daher ist es wichtig tumorbiologische Prozesse, die zur Metastasierung des Pankreaskarzinoms beitragen, *in vivo* zu analysieren. Ziel der Arbeit war die Generierung und eingehende Charakterisierung von organspezifisch metastasierenden Pankreaskarzinomsubzelllinien aus einer Ausgangszelllinie mit schlechtem Metastasierungspotential (TD-2). Mit Hilfe eines unvoreingenommenen *in vivo* Modells der Metastasierung konnten aus der parentalen Zelllinie TD-2 Subzelllinien mit hohem Lungenmetastasierungspotential generiert werden. Diese Subzelllinien weisen im Gegensatz zu den epithelialen TD-2 Zellen einen mesenchymalen Phänotyp auf. Dies zeigt, dass es im Rahmen der Lungenmetastasierung zu einer epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) der TD-2 Zellen kommt. Das epitheliale tumorsuppressive Protein E-Cadherin wird in den metastatischen Subzelllinien auf mRNA- und Proteinebene herabreguliert. Diese Herabregulierung kann durch den Histondeacetylase (HDAC) Inhibitor Trichostatin A (TsA), jedoch nicht durch Demethylierung mit 5-Azacytidine (5-Aza) revertiert werden. Passend hierzu konnte auf molekularer Ebene mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) die vermehrte spezifische Bindung eines Snail/HDAC1/HDAC2 Korepressorkomplexes an den E-Cadherin Promotor in den Zellen mit hohem Metastasierungspotential gezeigt werden. Dies weist eine wichtige Rolle von Snail und der Klasse I HDACs bezüglich EMT und Metastasierung des Pankreaskarzinoms nach. Somit indentifiziert unsere Studie HDACs als vielversprechende Zielstrukturen für eine anti-metastatische Therapie des Pankreaskarzinoms.

6. Literaturverzeichnis

Aichler, M., Seiler, C., Tost, M., Siveke, J., Mazur, P. K., Da Silva-Buttkus, P., Bartsch, D. K., Langer, P., Chiblak, S., Durr, A., Hofler, H., Kloppel, G., Muller-Decker, K., Brielmeier, M. and Esposito, I. Origin of pancreatic ductal adenocarcinoma from atypical flat lesions: a comparative study in transgenic mice and human tissues. *J Pathol.* 226 (2012) 723-34

Asiedu, M. K., Ingle, J. N., Behrens, M. D., Radisky, D. C. and Knutson, K. L. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res.* 71 (2011) 4707-19

Bardeesy, N., Aguirre, A. J., Chu, G. C., Cheng, K. H., Lopez, L. V., Hezel, A. F., Feng, B., Brennan, C., Weissleder, R., Mahmood, U., Hanahan, D., Redston, M. S., Chin, L. and Depinho, R. A. Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 5947-52

Becker, K. F., Atkinson, M. J., Reich, U., Huang, H. H., Nekarda, H., Siewert, J. R. and Hofler, H. Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet.* 2 (1993) 803-4

Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Strumane, K., de Leeuw, W. J., Nollet, F., van Roy, F. and Cornelisse, C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene.* 13 (1996) 1919-25

Carneiro, P., Figueiredo, J., Bordeira-Carrico, R., Fernandes, M. S., Carvalho, J., Oliveira, C. and Seruca, R. Therapeutic targets associated to E-cadherin dysfunction in gastric cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 17 (2013) 1187-201

Cavallaro, U. and Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 4 (2004) 118-32

Christofori, G. New signals from the invasive front. *Nature.* 441 (2006) 444-50

Christofori, G. and Semb, H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 24 (1999) 73-6

Cowin, P., Rowlands, T. M. and Hatsell, S. J. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 17 (2005) 499-508

Dahl, U., Sjodin, A. and Semb, H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. *Development.* 122 (1996) 2895-902

Eccles, S. A. and Welch, D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet.* 369 (2007) 1742-57

Ellenrieder, V., Hendler, S. F., Boeck, W., Seufferlein, T., Menke, A., Ruhland, C., Adler, G. and Gress, T. M. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res.* 61 (2001) 4222-8

Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R. H. and Maitra, A. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 14 (2007) 224-32

Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 3 (2003) 453-8

Gialitakis, M., Kretsovali, A., Spilianakis, C., Kravariti, L., Mages, J., Hoffmann, R., Hatzopoulos, A. K. and Papamatheakis, J. Coordinated changes of histone modifications and HDAC mobilization regulate the induction of MHC class II genes by Trichostatin A. *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 765-72

Glozak, M. A. and Seto, E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene.* 26 (2007) 5420-32

Graff, J. R., Herman, J. G., Lapidus, R. G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D. F., Isaacs, W. B., Pitha, P. M., Davidson, N. E. and Baylin, S. B. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 55 (1995) 5195-9

Greten, F. R., Weber, C. K., Greten, T. F., Schneider, G., Wagner, M., Adler, G. and Schmid, R. M. Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology.* 123 (2002) 2052-63

Gupta, G. P. and Massague, J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127 (2006) 679-95

Himly, M., Foster, D. N., Bottoli, I., Iacovoni, J. S. and Vogt, P. K. The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology*. 248 (1998) 295-304

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V., Hruban, R. H., Lowy, A. M. and Tuveson, D. A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*. 4 (2003) 437-50

Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H. J. and Hotz, H. G. Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 13 (2007) 4769-76

Hruban, R. H., Maitra, A. and Goggins, M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol*. 1 (2008) 306-16

Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T. and Tuveson, D. A. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev*. 15 (2001) 3243-8

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. and Thun, M. J. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 58 (2008) 71-96

Jonkers, J., Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M. and Berns, A. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet*. 29 (2001) 418-25

Joo, Y. E., Rew, J. S., Park, C. S. and Kim, S. J. Expression of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*. 2 (2002) 129-37

Kang, Y. and Massague, J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*. 118 (2004) 277-9

Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Ibata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M. and Imamura, M. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*. 21 (2007) 2103-8

Kaur, H., Phillips-Mason, P. J., Burden-Gulley, S. M., Kerstetter-Fogle, A. E., Basilion, J. P., Sloan, A. E. and Brady-Kalnay, S. M. Cadherin-11, a marker of the mesenchymal phenotype, regulates glioblastoma cell migration and survival in vivo. *Mol Cancer Res*. 10 (2012) 293-304

Klein, C. A. Cancer. The metastasis cascade. *Science*. 321 (2008) 1785-7

Klein, C. A. Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*. 9 (2009) 302-12

Koutsounas, I., Giaginis, C., Patsouris, E. and Theocharis, S. Current evidence for histone deacetylase inhibitors in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 19 (2013) 813-28

Li, D., Xie, K., Wolff, R. and Abbruzzese, J. L. Pancreatic cancer. *Lancet*. 363 (2004) 1049-57

Lin, Y., Dong, C. and Zhou, B. P. Epigenetic Regulation of EMT: The Snail Story. *Curr Pharm Des*. (2013)

Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., de Strooper, B., Hartmann, D. and Saftig, P. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (2005) 9182-7

Mayr, U., von Werder, A., Seidler, B., Reindl, W., Bajbouj, M., Schmid, R. M., Schneider, G. and Saur, D. RCAS-mediated retroviral gene delivery: a versatile tool for the study of gene function in a mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther*. 19 (2008) 896-906

McCleary-Wheeler, A. L., Lomberk, G. A., Weiss, F. U., Schneider, G., Fabbri, M., Poshusta, T. L., Duseti, N. J., Baumgart, S., Iovanna, J. L., Ellenrieder, V., Urrutia, R. and Fernandez-Zapico, M. E. Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Lett*. 328 (2013) 212-21

Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L. and Massague, J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 436 (2005) 518-24

Nakhai, H., Sel, S., Favor, J., Mendoza-Torres, L., Paulsen, F., Duncker, G. I. and Schmid, R. M. Ptf1a is essential for the differentiation of GABAergic and glycinergic amacrine cells and horizontal cells in the mouse retina. *Development*. 134 (2007) 1151-60

Nguyen, D. X. and Massague, J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*. 8 (2007) 341-52

Ocana, O. H., Corcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., Barrallo-Gimeno, A., Cano, A. and Nieto, M. A. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 22 (2012) 709-24

Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S. and Weinberg, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 68 (2008) 3645-54

Orsulic, S. An RCAS-TVA-based approach to designer mouse models. *Mamm Genome*. 13 (2002) 543-7

Ou, J. N., Torrisani, J., Unterberger, A., Provencal, N., Shikimi, K., Karimi, M., Ekstrom, T. J. and Szyf, M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*. 73 (2007) 1297-307

Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 7 (2007) 415-28

Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. and Cano, A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol*. 24 (2004) 306-19

Pignatelli, M., Ansari, T. W., Gunter, P., Liu, D., Hirano, S., Takeichi, M., Kloppel, G. and Lemoine, N. R. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol.* 174 (1994) 243-8

Rinker-Schaeffer, C. W., O'Keefe, J. P., Welch, D. R. and Theodorescu, D. Metastasis suppressor proteins: discovery, molecular mechanisms, and clinical application. *Clin Cancer Res.* 12 (2006) 3882-9

Sarrio, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G. and Palacios, J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68 (2008) 989-97

Schneider, G., Hamacher, R., Eser, S., Friess, H., Schmid, R. M. and Saur, D. Molecular biology of pancreatic cancer--new aspects and targets. *Anticancer Res.* 28 (2008) 1541-50

Seidler, B., Schmidt, A., Mayr, U., Nakhai, H., Schmid, R. M., Schneider, G. and Saur, D. A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105 (2008) 10137-42

Shintani, Y., Maeda, M., Chaika, N., Johnson, K. R. and Wheelock, M. J. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38 (2008) 95-104

Strathdee, G. Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol.* 12 (2002) 373-9

Tan, J., Cang, S., Ma, Y., Petrillo, R. L. and Liu, D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol.* 3 (2010) 5

Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (2006) 131-42

Truty, M. J., Lomberk, G., Fernandez-Zapico, M. E. and Urrutia, R. Silencing of the transforming growth factor-beta (TGFbeta) receptor II by Kruppel-like factor 14 underscores the importance of a negative feedback mechanism in TGFbeta signaling. *J Biol Chem.* 284 (2009) 6291-300

Vaissiere, T., Sawan, C. and Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* 659 (2008) 40-8

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. and Friend, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 415 (2002) 530-6

van Roy, F. and Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci.* 65 (2008) 3756-88

Weigelt, B., Peterse, J. L. and van 't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 5 (2005) 591-602

Weinstein, J. N., Myers, T. G., O'Connor, P. M., Friend, S. H., Fornace, A. J., Jr., Kohn, K. W., Fojo, T., Bates, S. E., Rubinstein, L. V., Anderson, N. L., Buolamwini, J. K., van Osdol, W. W., Monks, A. P., Scudiero, D. A., Sausville, E. A., Zaharevitz, D. W., Bunow, B., Viswanadhan, V. N., Johnson, G. S., Wittes, R. E. and Paull, K. D. An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science.* 275 (1997) 343-9

Winter, J. M., Ting, A. H., Vilardell, F., Gallmeier, E., Baylin, S. B., Hruban, R. H., Kern, S. E. and Iacobuzio-Donahue, C. A. Absence of E-cadherin expression distinguishes noncohesive from cohesive pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 14 (2008) 412-8

Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R. H., Eshleman, J. R., Nowak, M. A., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Iacobuzio-Donahue, C. A. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature.* 467 (2010) 1114-7

Yang, J. and Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 14 (2008) 818-29

Yilmaz, M. and Christofori, G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 8 (2010) 629-42

Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T. and Hirohashi, S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (1995) 7416-9

Zavadil, J., Haley, J., Kalluri, R., Muthuswamy, S. K. and Thompson, E. Epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 68 (2008) 9574-7

Zeisberg, M. and Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 119 (2009) 1429-37

Zhu, L., Shi, G., Schmidt, C. M., Hruban, R. H. and Konieczny, S. F. Acinar cells contribute to the molecular heterogeneity of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol.* 171 (2007) 263-73

Ein Großteil der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurde in der internationalen englischsprachigen Fachzeitschrift *Gastroenterology* (Impact Factor: 12.821) nach einem peer review Verfahren veröffentlicht:

von Burstin J*, Eser S*, Paul MC, Seidler B, Brandl M, Messer M, von Werder A, Schmidt A, Mages J, Pagel P, Schnieke A, Schmid RM, Schneider G, Saur D.

E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology.* 2009;137:361-71, 371.e1-5. * Equal contribution.

Die Arbeit wurde seither über 100 mal zitiert. Die übrigen Ergebnisse (globale mRNA Expressionsprofile und ihre Bedeutung für die EMT von Pankreaskarzinomzellen) werden derzeit zur Publikation vorbereitet.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Chemikalien	8-9
Tabelle 2: Kommerziell erhältliche Kits	10
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	10-11
Tabelle 4: Geräte und Instrumente	11-12
Tabelle 5: Verwendete Puffer	12-13
Tabelle 6: Verwendete Antikörper	13
Tabelle 7: siRNA Sequenzen	14
Tabelle 8: Vorwärts (F) und Rückwärts (R) gerichtete Primersequenzen für die Echtzeit qRT-PCR	14
Tabelle 9: Primersequenzen für die CHIP-PCR	14
Tabelle 10: Oligonukleotide für den ABCD Assay	14
Tabelle 11: Pipettierschema RT-PCR	30
Tabelle 12: Pipettierschema quantitative Echtzeit-PCR	30
Tabelle 13: Lungenmetastasierungspotential von parentalen TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} und <i>in vivo</i> selektionierten P-1 und P-2 Pankreaskarzinomzellen	37
Tabelle 14: Differentiell exprimierte Gene in parentalen TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} und <i>in vivo</i> selektionierten metastatischen P-2 Zellen (P-2 vs. TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA})	40
Tabelle 15: Die Expression eines dominant-negativen-E-cadherin (dn-E-cad) in parentalen TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} Pankreaskarzinomzellen erhöht das Potential der Lungenmetastasierung <i>in vivo</i> signifikant	50

7.2. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Modelle der Metastasierung	4
Abbildung 2: <i>In vivo</i> Selektion von TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} Pankreaskarzinomzellen	36

Abbildung 3: Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) und Verlust der E-cadherin Expression in den metastatischen TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} Subzelllinien P-1 und P-2	39
Abbildung 4: Epigenetische Repression der E-cadherin Expression durch Histondeacetylasen (HDACs) in den metastatischen P-1 und P-2 Zellen	43
Abbildung 5: Bindung eines Snail/HDAC1/HDAC2 Repressorkomplexes an den basalen E-cadherin Promotor in den metastatischen Subzelllinien P1 und P2	45
Abbildung 6: Der RNAi vermittelte 'Knockdown' von Snail oder HDAC2 induziert die E-cadherin mRNA Expression in metastatischen P-2 Zellen	47
Abbildung 7: Inaktivierung von E-cadherin in parentalen TD-2 ^{EGFP-fLuc-TVA} Zellen induziert EMT und Lungenmetastasierung <i>in vivo</i>	48
Abbildung 8: Globale Genexpressionsanalysen muriner mesenchymaler und epithelialer Pankreaskarzinomzelllinien	51
Abbildung 9: EMT und Herabregulierung von E-cadherin in einem genetisch definierten <i>Kras</i> ^{G12D} abhängigen Mausmodell des Pankreaskarzinoms	53
Abbildung 10: Epigenetische Inaktivierung der E-cadherin Expression in mesenchymalen Ptf1a/p48 ^{ex1Cre+} ;LSL-Kras ^{G12D/+} Pankreaskarzinomzellen mit hohem Metastasierungspotential	55
Abbildung 11: HDAC Aktivität vermittelt die Repression der E-cadherin Expression im mesenchymalen murinen und humanen Pankreaskarzinom	58

Lebenslauf

Stefan Eser

geboren am 27.10.1980 in München

Ärztliche Tätigkeit

seit 01.01.2010 Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter, II. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Roland M. Schmid)

Schul-und Hochschulbildung

03.12.2009 Approbation als Arzt
2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München und der Ludwig-Maximilians-Universität München
2001 – 2003 Hawaii-Pacific-University, U.S.A.
Major: Premedical Sciences
1998 – 1999 Galena High School, Kansas, U.S.A.
Abschluss: High School Diploma
1991 – 1998 Gymnasium in Kirchheim und München
1987 – 1991 Grundschule in Kirchheim

Doktorarbeit

2006 - 2013 Doktorarbeit mit dem Thema: „Analyse der Rolle der epithelialen-mesenchymalen-Transition bei Tumorprogression und Metastasierung des Pankreaskarzinoms“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Dieter Saur, II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Roland M. Schmid)

Zivildienst und Nebentätigkeit

1999 – 2000 Zivildienst in der Pädiatrie des Krankenhauses München Schwabing
2002 – 2004 Ambulante Kranken- und Altenpflege
Pflegedienst Ingrid Schlener, München (Semesterferien)

Publikationen

Rad R., Cadiñanos J., Rad L., Strong A., Varela I., Krieg L., Constantino-Casas F., Eser S., Hieber M., Seidler B., Price S., Hoffman G., Fraga M.F., Calvanese V., Schneider G., Yusa K., Grove C., Wang W., Schmid R.M., McDermott U., Kirchner T., Liu P., Vassiliou G., Saur D., Bradley A. (2013). A genetic progression model of BrafV600E-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell*, 24(1):15-29.

Eser S., Reiff N., Messer M., Seidler B., Gottschalk K., Dobler M., Hieber M., Arbeiter A., Klein S., Kong B., Michalski C.W., Schlitter A.M., Esposito I., Kind A.J., Rad L., Schnieke A.E., Baccarini M., Alessi D.R., Rad R., Schmid R.M., Schneider G., Saur D. (2013). Selective Requirement of PI3K/PDK1 Signaling for Kras Oncogene-Driven Pancreatic Cell Plasticity and Cancer. *Cancer Cell*, 23(3):406-20.

Diersch S., Wenzel P., Szameitat M., Eser P., Paul M.C., Seidler B., Eser S., Messer M., Reichert M., Pagel P., Esposito I., Schmid R.M., Saur D., Schneider G. (2013). Efemp1 and p27(Kip1) modulate responsiveness of pancreatic cancer cells towards a dual PI3K/mTOR inhibitor in preclinical models. *Oncotarget*, 4(2):277-88.

Merkel C., Saalfrank A., Riesen N., Kühn R., Pertek A., Eser S., Hardt M.S., Kind A., Saur D., Wurst W., Iglesias A., Schnieke A. (2013). Efficient generation of rat induced pluripotent stem cells using a non-viral inducible vector. *PLoS One*, 8(1):e55170.

Flisikowska T., Leuchs S., Saalfrank A., Eser S., Kind A., Wolf E., Saur D., Schnieke A. (2012). Porcine models for human cancer. *Reproduction Fertility and Development*, 25(1):321-2.

Flisikowska T., Merkel C., Landmann M., Eser S., Rezaei N., Cui X., Kurome M., Zakhartchenko V., Kessler B., Wieland H., Rottmann O., Schmid R.M., Schneider G., Kind A., Wolf E., Saur D., Schnieke A. (2012). A porcine model of familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 143(5):1173-5.

Conradt L., Godl K., Schaab C., Tebbe A., Eser S., Diersch S., Michalski C.W., Kleeff J., Schnieke A., Schmid R.M., Saur D., Schneider G. (2011). Disclosure of erlotinib as a multikinase inhibitor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia*, 13(11):1026-34

Eser S., Messer M., Eser P., von Werder A., Seidler B., Bajbouj M., Vogelmann R., Meining A., von Burstin J., Algül H., Pagel P., Schnieke A.E., Esposito I., Schmid R.M., Schneider G., Saur D. (2010). In vivo diagnosis of murine pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer by molecular imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(24):9945-50

Eser S.*, von Burstin J.*, Paul M.C., Seidler B., Brandl M., Messer M., von Werder A., Schmidt A., Mages J., Pagel P., Schnieke A., Schmid R.M., Schneider G., Saur D. (2009). E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology*, 137(1):361-71 (* equal contribution).

Eser S.*, von Burstin J.*, Seidler B., Meining A., Bajbouj M., Mages J., Lang R., Kind A.J., Schnieke A.E., Schmid R.M., Schneider G., Saur D. (2008). Highly sensitive detection of early-stage pancreatic cancer by multimodal near-infrared molecular imaging in living mice. International Journal of Cancer, 123(9):2138-47 (*equal contribution).

Schneider G., Hamacher R., Eser S., Friess H., Schmid R.M., Saur D. (2008). Molecular biology of pancreatic cancer – new aspects and targets. Anticancer Research, 28:1541-50.

Preise und Vorträge

- | | |
|------|---|
| 2013 | Förderpreis der Wolfgang-Wilmanns-Stiftung zur Förderung der Leukämie- und Tumorforschung |
| 2009 | - Wissenschaftlicher Vortrag zum Thema: „Molecular in vivo imaging of pancreatic intraepithelial neoplasia and early-stage pancreatic cancer“ im Rahmen des UEGW/WCOG Kongresses in London. |
| 2007 | - Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) anlässlich der 62. Jahrestagung |
| 2007 | - Posterpreis der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e.V. anlässlich des 35. Kongresses |
| 2007 | - Wissenschaftlicher Vortrag auf der 62. Jahrestagung der DGVS |

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Arbeit im Labor und beim Verfassen dieser Dissertationsarbeit unterstützt und gefördert haben.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Roland M. Schmid für die Möglichkeit, in seiner Klinik grundlagenwissenschaftliche Fragestellungen bearbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dieter Saur, der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm, und mich durch seine passionierte und brillante Art wissenschaftlich zu arbeiten, für die Grundlagenwissenschaft begeistert hat.

Desweiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Barbara Seidler für die fortwährende Unterstützung und die konstruktive Kritik und bei Herrn Dr. med. Johannes von Burstin, der diese Arbeit als Postdoc betreut hat. Er stand mir sowohl methodisch, als auch in theoretisch wissenschaftlichen Fragen zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite.

Ausserdem möchte ich mich bei Herrn PD. Dr. Günter Schneider für seinen maßgeblichen Beitrag zum Gelingen dieses Projektes bedanken.

Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Saur und um Herrn PD. Dr. Günter Schneider bedanken, die an diesem Projekt mitgewirkt haben. Insbesondere gilt mein Dank den Wissenschaftlerinnen Frau Dr. Mariel Paul, Frau Martina Brandl und Frau Dr. Annegret Schmidt, die Daten für dieses Projekt generiert und bereitgestellt haben. Ausserdem möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der beiden Arbeitsgruppen, die Zelllinien für dieses Projekt generiert haben, bedanken.

Abschliessend möchte ich mich bei meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder für die lebenslange Unterstützung und Freude, die sie mir zu Teil werden lassen bedanken. Ohne Euch wäre dies und vieles mehr nicht möglich gewesen. Danke!