

# **Molekulare Analyse der epithelial-mesenchymalen Transition im Pankreaskarzinom**

**Sören A. Weidemann**

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

## **Doktors der Medizin (Dr. med.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dieter Saur  
2. Pro. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 27.11.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 01.08.2018 angenommen.

*Meinen geliebten Schwestern*



3.2.1 Kultivierung von Zellen.....	38
3.2.2 Stimulation von murinen PDAC-Zellen mit TGF- $\beta$ .....	38
3.2.3 Transfektion von HEK-Zellen und Generierung lentiviralen Überstandes mit PEI.....	38
3.2.4 Transfektion von HEK-Zellen mit Lipofectamin2000.....	39
3.2.5 Transduktion von Tumorzellen.....	39
3.2.6 Selektion von Tumorzellen mit Chemotherapeutika.....	40
3.2.7 Fotodokumentation der Zellmorphologie.....	40
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
4.1 Herstellung lentiviraler Vektoren zur Überexpression eines Gens von Interesse.....	41
4.1.1 Klonierungsstrategie von Anxa10.....	42
4.1.2 Klonierungsstrategie von Anxa13.....	43
4.1.3 Klonierungsstrategie von Bgn.....	44
4.1.4 Klonierungsstrategie von Cd34.....	45
4.1.5 Klonierungsstrategie von Ddr2.....	46
4.1.6 Klonierungsstrategie von Fgfr1.....	48
4.1.7 Klonierungsstrategie von Hnf4a.....	49
4.1.8 Klonierungsstrategie von Mmp2.....	50
4.1.9 Klonierungsstrategie von Pcdh19.....	51
4.1.10 Klonierungsstrategie von Rbp4.....	53
4.1.11 Klonierungsstrategie von Snai2.....	54
4.1.12 Klonierungsstrategie von Sox2.....	55
4.1.13 Klonierungsstrategie von SPARC.....	56
4.1.14 Klonierungsstrategie von Tgfr3.....	57
4.1.15 Klonierungsstrategie von Tspan8.....	58
4.1.16 Klonierungsstrategie von Wnt7a.....	59
4.1.17 Klonierungsstrategie von Zeb2.....	60
4.1.18 Klonierungsstrategie der Kontrollvektoren.....	61
4.2 Herstellung lentiviraler Vektoren zum knockdown eines Gens von Interesse.....	62
4.3 TGF- $\beta$ -Stimulation muriner PDAC-Zellen induziert EMT.....	64
4.4 Überexpression von EMT-assoziierten Genen.....	65
4.5 Knockdown von EMT-assoziierten Genen.....	65
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>71</b>
5.1 Die lentiviralen Überexpressionsvektoren mit dsRed und EGFR führen nicht zur Viruspartikelproduktion.....	71
5.2 Der knockdown EMT-assoziiierter Gene kann einen Wechsel im morphologischen Zelltypus induzieren.....	72
5.3 TGF- $\beta$ ist ein Induktor der EMT in murinen Pankreaskarzinomzellen.....	74
5.4 Ausblick.....	75
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
<b>7 Danksagungen.....</b>	<b>78</b>
<b>8 Referenzen.....</b>	<b>79</b>
<b>9 Erklärungen.....</b>	<b>92</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>93</b>

10.1 Plasmidkarten..... 93

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: EMT-assoziierte Gene.....	7
Tabelle 2-1: Geräte.....	17
Tabelle 2-2: Verbrauchsgegenstände.....	18
Tabelle 2-3: Reagenzien und Enzyme.....	19
Tabelle 2-4: Antikörper.....	21
Tabelle 2-5: Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie.....	22
Tabelle 2-6: Kits für die Molekularbiologie.....	23
Tabelle 2-7: Bakterienstämme.....	23
Tabelle 2-8: Plasmide und cDNA.....	23
Tabelle 2-9: Screeningprimer für Vektor pEntr.....	25
Tabelle 2-10: Primer zur PCR Amplifikation.....	26
Tabelle 2-11: Primer zur Sequenzierung.....	26
Tabelle 2-12: Oligonukleotide für sh-Design.....	27
Tabelle 2-13: Zelllinien.....	29
Tabelle 2-14: Reagenzien and Kits für die Zellkultur.....	30
Tabelle 2-15: Medien für die Zellkultur.....	30
Tabelle 3-1: Reaktionsansatz und Bedingungen für eine Screening-PCR. .	36
Tabelle 3-2: Reaktionsansatz und Bedingungen für eine PCR mit PfuUltraTM.....	36
Tabelle 3-3: Transfektionsbedingungen.....	38
Tabelle 4-1: Übersicht Expressionsvektoren.....	41
Tabelle 4-2: Morphologische Ergebnisse der Knockdown-Versuche.....	66

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Progressionsmodell für das pankreatisch duktales Adenokarzinom	3
Abb. 1.2: EMT	5
Abb. 1.3: Beitrag der EMT zur Tumorentwicklung	6
Abb. 1.4: Struktur von HIV-1	12
Abb. 1.5: Organisation des HIV-1-Genoms	13
Abb. 1.6: Funktionsprinzip von RNAi	15
Abb. 3.1: Prinzip der Clonase-Reaktion	35
Abb. 4.1: Kontrollknockdown von Anxa10 in pLenti6.2	42
Abb. 4.2: Kontrollknockdown von Anxa13 in pLenti4	43
Abb. 4.3: Kontrollknockdown von Bgn in pLenti6.2	44
Abb. 4.4: Übersicht über die Klonierungsstrategien mit dem Zielvektor pLenti4V5dest	45
Abb. 4.5: Kontrollknockdown von CD34 in pLenti4	46
Abb. 4.6: Kontrollknockdown von Ddr2 in pLenti4	47
Abb. 4.7: Kontrollknockdown von Fgfr1 in pLenti6.2	48
Abb. 4.8: Kontrollknockdown von Hnf4a in pLenti6.2	49
Abb. 4.9: Kontrollknockdown von Mmp2 in pLenti6.2	50
Abb. 4.10: Kontrollknockdown von Pcdh19 in pLenti4	51
Abb. 4.11: Übersicht über die Klonierungsstrategien mit dem Zielvektor pLenti6.2V5dest	52
Abb. 4.12: Kontrollknockdown von Rbp4 in pLenti6.2	53
Abb. 4.13: Kontrollknockdown von Snai2 in pLenti6.2	54
Abb. 4.14: Kontrollknockdown von Sox2 in pLenti4	55
Abb. 4.15: Kontrollknockdown von SPARC in pLenti4	56
Abb. 4.16: Kontrollknockdown von Tgfbr3 in pLenti4	57
Abb. 4.17: Kontrollknockdown von Tspan8 in pLenti6.2	58
Abb. 4.18: Kontrollknockdown von Wnt7a in pLenti4	59
Abb. 4.19: Kontrollknockdown von Zeb2 in pLenti4	60
Abb. 4.20: Kontrollknockdown von Kontrolle EGFP (a), Puro (b) und dsRed (c)	61
Abb. 4.21: Aneinandergelagertes sh-Oligonukleotid am Beispiel der sh-Sequenz von Anxa10	62
Abb. 4.22: Übersicht über die Herstellung von Vektoren, die sh-RNA-Sequenzen exprimieren	63
Abb. 4.23: Morphologische Änderungen unter TGF- $\beta$ -Stimulation	64
Abb. 4.24: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5193 PPT und 53631 PPT mit viralem Überstand aus den knockdown-Experimenten mit shAnxa10 und shHnf4a	67
Abb. 4.25: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5193 PPT mit viralem Überstand aus den knockdown-Experimenten mit shMmp2 sowie der Zelllinien 5193 PPT und 53631 PPT mit viralem Überstand von shRbp4	68
Abb. 4.26: Morphologische Änderungen nach Transduktion der	

---

Tumorzelllinien 5320 PPT und 16992 PPT mit viralem Überstand aus den knockdown-Experimenten mit shSox2 sowie der Zelllinie 53631 PPT mit viralem Überstand von shTspan8.....	69
Abb. 4.27: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5193 PPT mit viralem Überstand aus den knockdown-Experimenten mit shTspan8 sowie der Zelllinien 53631 PPT und 5193 PPT mit viralem Überstand von shWnt7a.....	70
Abb. 10.1: Plasmidkarte von pENTR-MCS-IRES-Puromycin.....	93
Abb. 10.2: Plasmidkarte von pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP.....	94
Abb. 10.3: Plasmidkarte von pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed.....	95
Abb. 10.4: Plasmidkarte von pENTR-pSupr.Puromycin.....	96
Abb. 10.5: Plasmidkarte von pLenti4V5dest.....	97
Abb. 10.6: Plasmidkarte von pLenti6.2V5dest.....	98



## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Adenin/Adenosin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin/Cytidin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
D-MEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>double stranded</i>
dsRed	rot fluoreszierendes Protein drFP583
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
<i>et al.</i>	et Alibi/et alius
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
fM	Femtomol/femtomolar
G	Guanin/Guanosin
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
H1 Promotor	H1 RNA Polymerase III Promotor
IRES	<i>internal ribosome entry side</i>
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LSL	LoxP-stop-LoxP
M	Mol/molar
mbar	Millibar
MET	Mesenchymal-epitheliale-Transition
mg	Milligramm
min	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol/millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol/nanomolar
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PGK-Promotor	Phosphoglycerat-kinase Promotor
PPT	Primär pankreatischer Tumor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Interferenz-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sh	<i>short-hairpin</i>
si	<i>small interfering</i>
ss	<i>single stranded</i>
T	Thymin/Thymidin
TAE	Trisacetat EDTA
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
V	Volt
wt	Wildtyp
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol/mikromolar

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Das duktale Adenokarzinom des Pankreas

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist die vierthäufigste neoplastisch bedingte Todesursache in der westlichen Welt (Hezel *et al.* 2006; Bardeesy, DePinho 2002). Dies begründet sich weniger in der Häufigkeit dieser Erkrankung – nur 3% aller Krebsneuerkrankungen in den USA entfielen 2013 auf diese Entität (Siegel *et al.*, 2013) - sondern im Mangel an effektiven Therapien. Da das Pankreaskarzinom dem Patienten erst im späten Erkrankungsverlauf Beschwerden bereitet, vergleichsweise früh metastasiert und im metastasierten Zustand keine kurative Behandlungsoption mehr besteht, zeichnet sich die Erkrankung durch eine besonders schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von nur 6% aus, der geringsten unter allen Krebserkrankungen (Jemal *et al.* 2010).

Die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und die Deutsche Krebsgesellschaft (DKG) fassen die epidemiologische Situation in Deutschland so zusammen, dass jährlich etwa 12800 Menschen, Männer wie Frauen in gleicher Häufigkeit, am Pankreaskarzinom erkranken. In der Statistik der Krebsneuerkrankungen nimmt es bei Männern den 9. mit einem mittleren Erkrankungsalter von 68 Jahren und bei Frauen den 7. Platz mit einem mittleren Erkrankungsalter von 75 Jahren ein. Jährlich versterben etwa 12100 Menschen am Pankreaskarzinom, was in etwa der Frequenz an Neuerkrankungen entspricht – ein Langzeitüberleben ist die Ausnahme.

Für die Grundlagen- und klinische Forschung stellt sich daher die Aufgabe, größte Anstrengungen zu unternehmen, um die weiterhin unverstandenen molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, die hinter der Progression dieses Karzinoms stehen und zu dessen früher Metastasierung führen.

Als sichere Risikofaktoren für die Entstehung dieses Karzinoms sind die chronische Pankreatitis, zumeist auf dem Boden eines Alkohol-, sowie Nikotinabusus, Adipositas, Diabetes mellitus und eine positive Familienanamnese für Pankreaskarzinome bei erstgradigen Verwandten ausgemacht worden.

In der Diagnostik und dem Staging des Pankreaskarzinoms kommen der Abdomensonographie, der Endsonographie und der Computertomographie die größte Bedeutung zu. Im Verlauf und als Therapiekontrolle können die Tumormarker CA19-9 und das weniger spezifische CEA bestimmt werden.

Eine kurative Intention der Therapie kann nach Diagnosestellung nur bei knapp 20% der Patienten mittels Operation verfolgt werden. Hierzu wird eine Duodenopankreatektomie nach Whipple oder eine pyloruserhaltende, partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt. In der

---

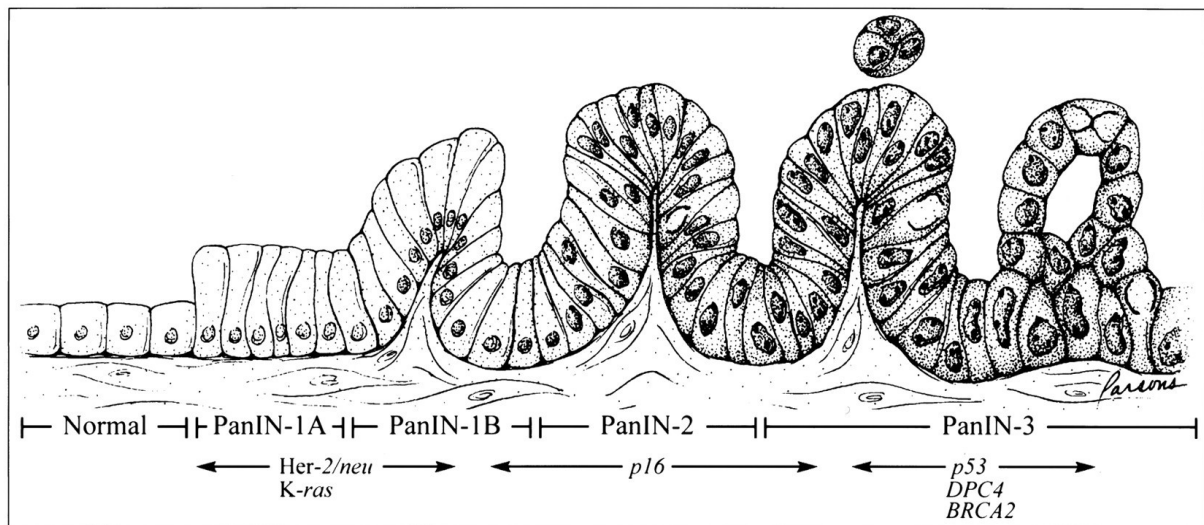
adjuvanten Chemotherapie haben Gemcitabin und 5-Fluoruracil/Folinsäure den höchsten Stellenwert. Die mediane Überlebenszeit beträgt auch dabei nur etwa zehn Monate. In palliativer Intention kommt die alleinige Chemotherapie mit Gemcitabin und ggf. Erlotinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor, 5-Fluoruracil/Folinsäure, Irinotecan oder Oxaliplatin zur Anwendung. Zusätzlich werden unter der Maßgabe des *'best supportive care'* mittels interventioneller Maßnahmen lokal verdrängende Wirkungen des Tumors wie Galleabflussstörungen oder Darmpassagestörungen behoben.

### **1.1.1 Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms**

Die Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms zum Vorbild nehmend, haben Hruban *et al.* 2000 ein Modell zur Karzinogenese und Tumorprogression beim PDAC entwickelt: Aus Vorläuferläsionen, den so genannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) Grad 1-3, entsteht das invasive Pankreaskarzinom (Abb. 1.1).

Ergänzend hierzu wurden durch genetische Analysen von neoplastischem Gewebe eine Reihe von Mutationen identifiziert, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression gehäuft auftreten. Mutationen in Kras sowie Amplifikationen von Her-2/neu konnten als frühe genetische Veränderungen identifiziert werden, wobei eine Kras-Mutation in Kodon zwölf des ersten kodierenden Exons von Glycin zu Asparaginsäure (genannt Kras<sup>G12D</sup>) in über 90% der PDAC gefunden wurde (Day *et al.* 1996; Moskaluk *et al.* 1997; Lüttges *et al.* 1999). Diese Punktmutation führt zu einem Verlust der intrinsischen GTPase-Aktivität, welche eine dauerhafte Aktivität von Kras zur Folge hat.

Mutationen im *CDKN2A*-Lokus, der für die Tumorsuppressoren p16<sup>INK4A</sup> und p19<sup>ARF</sup> kodiert, folgen im weiteren Verlauf der Tumorprogression (Moskaluk *et al.* 1997; Wilentz *et al.* 1998; Yamano *et al.* 2000). Verluste von p53, Dpc4, and BRCA2 konnten als späte Ereignisse identifiziert werden (DiGiuseppe *et al.* 1994; Wilentz *et al.* 2000; Goggins *et al.* 2000). Histomorphologisch sind PanINs Grad 1A durch ihr hochzylindrisches Epithel von den flachen, nicht-neoplastischen Duktusepithelien zu unterscheiden. Beim Grad 1B findet sich zudem eine zunehmende papilläre Anordnung der Gangepithelien. Diese beiden Vorläuferläsionen finden sich auch bei 40% der Pankreata ohne Nachweis eines invasiven Karzinoms von über 50-jährigen Patienten (Schneider *et al.* 2005). Die höhergradigen PanINs 2 zeigen zunehmende Zeichen der Atypie und Dysplasie, wie z.B. Verlust der Polarität und verändertes Kern-Zytoplasma-Verhältnis, während die PanIN 3 alle Malignitätszeichen des PDAC aufweisen und einem Karzinoma in situ entsprechen. (Hruban *et al.* 2000)



**Abb. 1.1: Progressionsmodell für das pankreatisch duktales Adenokarzinom**

Von links nach rechts sind die histologischen Veränderungen und dazugehörige genetische Alterationen vom normalen Pankreas zum invasiven Karzinom aufgetragen. (Modifiziert nach Hruban *et al.* 2000)

Obwohl morphologisch den Ductuli ähnlich, haben in-vitro-, wie auch Mausmodelle zeigen können, dass die PanINs in diesen Modellen azinären Ursprungs sind und zunächst eine azinär-duktales Metaplasie durchlaufen. Zudem konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass die Mutation  $Kras^{G12D}$  in duktales Zellen nicht zur Entwicklung von PanINs oder PDAC führt (Rooman *et al.* 2014). In neueren Arbeiten wiederum wurde gezeigt, dass in Mausmodellen mit simultaner Trp53- und  $Kras^{G12D}$ -Mutation auch aus duktales Zellen PDACs entstehen können (Leach *et al.* 2016).

### 1.1.2 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms

Genetisch veränderte Mausmodelle sind der Schlüssel zum Verständnis der Tumorentwicklung im lebenden Organismus. Durch die genetische und anatomische Ähnlichkeit der Maus zum Menschen bei zugleich hoher Reproduktionsrate haben sie sich in den vergangenen 30 Jahren zum wichtigsten Modellorganismus entwickelt. (Weinberg *et al.* 2003)

Um ein Mausmodell des PDAC zu generieren, wurde die beim humanen PDAC die am häufigsten auftretende  $Kras^{G12D}$ -Mutation mittels homologer Rekombination in den endogenen *Kras*-Lokus eingebracht (Hingorani *et al.* 2003). Hierzu wird das Cre-loxP-System verwendet. Dabei wird ein Gen von Interesse, das einen *knockdown* erfahren soll, von sogenannten *loxP-sites* flankiert. Dies sind Basensequenzen, die von der Rekombinase Cre erkannt werden können. Diese werden mit einem zugehörigen Promotor transgen in das Mausgenom eingebracht, wobei es für jedes Organ spezifische Cres mit eigenen Promotoren gibt, die dann organspezifisch das Gen von Interesse an den *LoxP-sites*

---

herausschneiden. Um einen negativen und ggf. letalen Einfluss durch Entfernung des Gens in der Embryogenese zu verhindern, kann der Promotor so gewählt werden, dass er erst auf die exogene Zufuhr von Tamoxifen im Futter der Maus hin aktiv wird und der konsekutive *knockdown* zu jedem beliebigen Zeitpunkt erfolgen kann.

Das oben erwähnte Kras ist dank des Cre-loxP-Systems zwar gewebsspezifisch, wird aber in allen Pankreazellen, also auch den azi- und zentroazinären Zellen, sowie den endokrinen Inselzellen, exprimiert. Wie oben erwähnt führt allerdings nur die Veränderung in den azinären Zellen zu neoplastischen Veränderungen. (Hezel *et al.* 2006; Brembeck *et al.* 2003; Grippo *et al.* 2003; Rooman *et al.* 2014).

Im Mausmodell, das mit o.g. Kras<sup>G12D</sup> arbeitet, steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Ptf1a-Promotors. In diesem Modell lassen sich ab der zweiten Woche p.p. PanINs beobachten (Hingorani *et al.* 2003), ab dem achten Monat auch invasive PDACs, wobei die mediane Überlebenszeit 16 Monate beträgt (unveröffentlichte Daten AG Saur, München; Seidler *et al.*, 2008). Dieses Modell rekapituliert mit großer Präzision die Genese des Pankreaskarzinoms im Menschen, weswegen es sich als das wichtigste genetisch modifizierte Mausmodell etabliert hat.

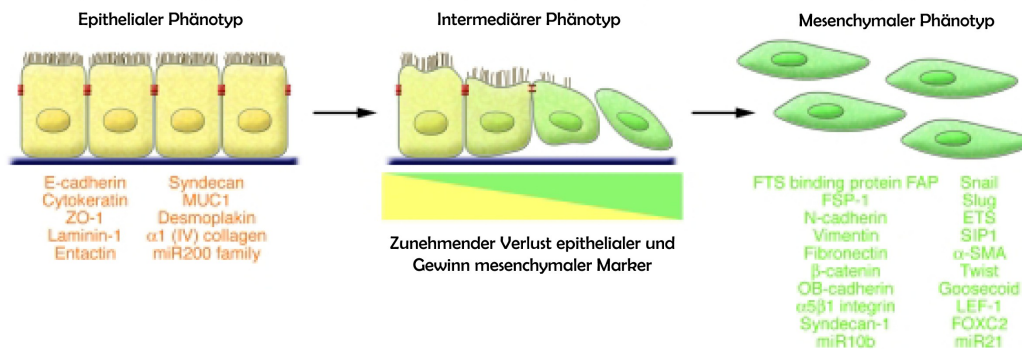
Kras gilt nicht nur wegen der in 1.1.1 genannten Beobachtungen als Auslösermutation für das PDAC, sondern auch aufgrund von Beobachtungen, die in Mausmodellen gemacht wurden. So führten alleinige Deletionen von p16<sup>INK4a</sup> oder Trp53 nicht zur Entwicklung von Neoplasien im Pankreas, sie beschleunigten mit Kras<sup>G12D</sup>-Hintergrund die Tumorprogression jedoch dramatisch. (Bardeesy *et al.* 2006). Ein weiteres Mausmodell hat eine *Missense*-Mutation in Kodon 172 des Tumorsuppressorgens Trp53, analog zu einer Mutation im Codon 175 des TP53 des Menschen, wie sie auch beim Li-Fraumeni-Syndrom auftritt, imitiert (Olive *et al.* 2004). Solche Ptf1a/p48<sup>Cre/+</sup>; LSL-Kras<sup>G12D</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/+</sup>-Mäuse entwickeln ab der zehnten Woche p.p. mit 100%-iger Penetranz invasive und metastasierende PDACs. Das mediane Überleben beträgt 120 Tage (Hingorani *et al.* 2005).

## 1.2 Epithelial-mesenchymale Transition

Unter Epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) versteht man die Änderung der Zellkonformation einer epithelialen zu einer mesenchymalen Zelle. Während erstere eine Polarität besitzt und Kontakt zu einer Basalmembran hat, ist letztere frei in der von ihr produzierten Extrazellulärmatrix lokalisiert. Zusammen mit der morphologischen Veränderung ändern sich auch die gesamte Genexpression und Funktion der Zelle. Die Relevanz der EMT in sich differenzierenden Geweben konnte erstmals bei der

Embryogenese aufgezeigt werden (Hey 1995; Nawshad *et al.* 2003).

Die EMT versteht sich als Paradigmenwechsel bei der Ansicht einer starren Trennung von epithelialen und mesenchymalen Zellen in einem Zellverband bzw. Organ. Während in der Vergangenheit die epithelialen Zellen als Träger der spezifischen Funktion des Organs angesehen wurden und mesenchymale Zellen eher supportative Funktionen wahrzunehmen schienen, so zeigen jüngere Veröffentlichungen, dass Zellen mithilfe von EMT oder MET (Mesenchymal-Epitheliale-Transition), dem Pendant zur EMT, sich den wechselnden Anforderungen des Zellverbandes anpassen können. (Kalluri *et al.* 2003; Kalluri *et al.* 2009) Neben den rein epithelialen und rein mesenchymalen Zellen wurde auch die Existenz von intermediären Zelltypen gezeigt, die sich sowohl morphologisch, als auch in der Expression ihrer Zellmarker zwischen den Erscheinungen der Erstgenannten befinden (Okada *et al.* 1996; Matsuzaki *et al.* 2012; Soltermann *et al.* 2011).



### Abb. 1.2: EMT

EMT beschreibt die funktionelle Transition von polarisierten epithelialen Zellen (links) zu mobilen mesenchymalen Zellen (rechts), welche EZM-Bestandteile sekretieren. Bekannte EMT-Marker sind mit aufgeführt. Expression von Markern beider Arten findet sich beim intermediären Typen und zeigen an, dass diese die EMT noch nicht abgeschlossen haben. Durchläuft eine Zellpopulation eine vollständige EMT oder MET, so finden sich nach Abschluss keine Marker ihrer ursprünglichen Konformation mehr. (Modifiziert nach Kalluri *et al.* 2009)

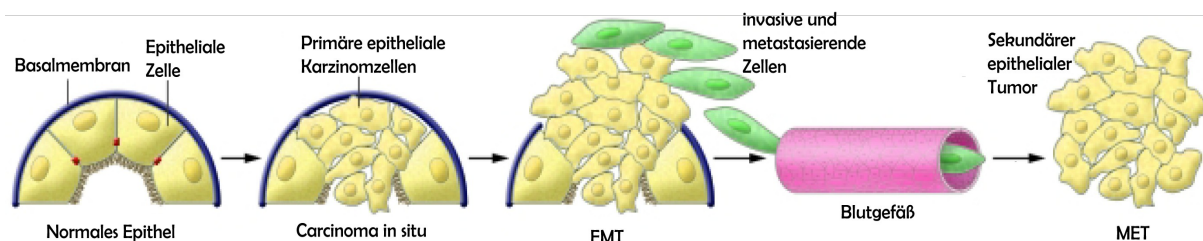
Neben ihrer Bedeutung bei der Embryogenese wurde gezeigt, dass EMT eine Schlüsselrolle in der Entzündungsreaktion mit konsekutiver Fibrosierung von Organen (Zeisberg *et al.* 2004) und bei der Metastasierung von malignen Tumoren (Thiery *et al.* 2009; Peinado *et al.* 2007) spielt.

Wenn auch die Signalwege, die eine EMT auslösen, noch nicht entschlüsselt sind, so konnte zumindest gezeigt werden, dass die auslösenden Mechanismen sich bei den drei genannten EMT-Typen unterscheiden. Da in der vorliegenden Arbeit die EMT im Rahmen der Tumorprogression untersucht wird, soll nur auf diese Unterform weiter eingegangen werden.

### 1.2.1 EMT in der Karzinogenese und im Metastasierungsprozess

Der maligne Charakter von Tumorzellen zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass diese Zellen imstande sind, ihren Zellverband zu verlassen. Ursächlich dafür sind diverse (epi-)genetische Alterationen, die zu einem breiten Spektrum an EMT-Erscheinungen führen. Mehrere Maus- und Zellkulturstudien zeigen, dass die Aktivierung von EMT-Programmen einen entscheidenden Einfluss bei der Metastasierung epithelialer Tumoren hat (Yang *et al.* 2008; Thiery 2002). Gleichzeitig konnte aber auch gezeigt werden, dass in Mausmodellen, in denen das EMT-Programm blockiert wurde, nichtsdestotrotz Fernmetastasen des Primarius nachgewiesen werden konnten (Han *et al.* 2005). Zumindest legen diese Ergebnisse nahe, dass EMT nicht der alleinige Mechanismus ist, der einer Absiedlung zugrunde liegt (Yang *et al.* 2008).

Unter der Annahme, dass Karzinomzellen eine EMT durchlaufen, muss wegen der histologisch und immunologisch starken Ähnlichkeit zwischen Fernmetastasen und Primärtumor auch die Existenz einer oben bereits erwähnten MET postuliert werden (Hugo *et al.* 2007, Kalluri *et al.* 2009).



**Abb. 1.3: Beitrag der EMT zur Tumorprogression**

Während der Progression vom normalen Epithel zum invasiven Karzinom verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und ihre Haftung zur Basalmembran. Es folgt ein Umbau der Basalmembran und der EZM, welche weitreichende Änderungen der Zell-Zell-Signalnetzwerke nach sich ziehen und den Tumorzellen ermöglichen die Umgebung zu infiltrieren. Nach Durchlaufen einer EMT können die Karzinomzellen in mesenchymaler Konformation Anschluss an das Kreislaufsystem finden und im Körper Mikro- und Makrometastasen setzen, wobei eine MET sie zurück zu einem epitheliale Phänotyp führt. (Modifiziert nach Kalluri *et al.* 2009)

### 1.2.2 TGF- $\beta$ ist ein Induktor der EMT

Der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  besitzt die Eigenschaft, Zellen in Cytostase zu versetzen, ihre Proliferation zu unterminieren und sie der Apoptose zuzuführen. In mehreren Zellkultur- und Mausmodellstudien wurde für unterschiedliche Tumortypen gezeigt, dass Karzinomzellen auf noch nicht vollständig verstandenem Wege auf TGF- $\beta$ -Stimulation mit erhöhter Proliferation und Aktivierung von EMT-Programmen reagieren (Song 2007; Lee *et al.* 2008), während TGF- $\beta$  in nicht-neoplastischen Zellen tumorsuppressive Eigenschaften wie Förderung der



---

Apoptose oder antiproliferative Effekte aufweist (Javelaud *et al.* 2005). Entscheidend für die Reaktion der Zelle auf TGF- $\beta$  scheint neben der eigenen (epi-)genetischen Ausstattung der Zelle auch ihre Mikroumwelt, insbesondere die dort vorkommenden Fibroblasten, zu sein. (Bierie *et al.* 2006)

Dass zwischen den Tumorzellen und ihrem Mikromilieu ein enges Wechselspiel besteht, zeigen neuere Studien an Mausmodellen, in denen Störungen im TGF- $\beta$ -Signalweg der Tumorzellen neben einer Tumorprogression zu einem matrixreichen Phänotyp mit fibrosiertem Stroma führen (Laklai *et al.* 2016).

Neben anderen Wachstumsfaktoren ist TGF- $\beta$  sogar der prominenteste Induktor der EMT (Kalluri *et al.* 2009). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass TGF- $\beta$  EMT bei verschiedensten Karzinomzellen induzieren kann (Oft *et al.* 1998, Song 2007). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  EMT über mindestens zwei unterschiedliche Signalwege induzieren kann. Über den Alk5-Rezeptor wird der Smad 2/3-Signalweg beschritten (Heldin *et al.* 1995; Piek *et al.* 1999). Alternativ erfolgt eine Aktivierung von WMT über den ERK/MAP-Kinase-Pfad (Lee *et al.* 2008). Einige Studien in Prostata- und Kolonkarzinomzellen legen nahe, dass die prokarzinogene Wirkung von TGF- $\beta$  Smad-unabhängig und stattdessen mit aktiviertem Ras wirkt. (Javelaud *et al.* 2005; Xie *et al.* 2004; Lehmann *et al.* 2000). Passend hierzu zeigen sich etablierte diagnostische Kriterien in der immunhistologischen pathologischen Diagnostik des Pankreaskarzinoms. Ein Verlust von Dpc4, einem Zielprotein von Smad 2/3 ist diagnostisch für invasive und in situ Karzinome des biliopankreatischen Systems. Dysplastische Epithelien zeigen in der Regel noch eine Dpc4-Expression (vgl. 1.1.1). (McCarthy *et al.* 2001; Tascilar *et al.* 2001)

Auch für andere Tumormausmodelle, die mit dem Protoonkogen Ras arbeiten, wurde eine Induktion der EMT durch TGF- $\beta$  beschrieben (Oft *et al.* 1996; Janda *et al.* 2002).

Belegt ist ebenfalls, dass die Induktion der EMT durch TGF- $\beta$  mit einem Verlust von E-Cadherin einhergeht (Yang *et al.* 2002). E-Cadherin gilt als bedeutender Marker für einen epithelialen Phänotyp (Thiery *et al.* 2006).

### 1.2.3 EMT-assoziierte Gene

Diese Gene werden in einem gut charakterisierten murinen Kras<sup>G12D</sup>-abhängigen PDAC-Tumorzelllinienkollektiv mit epithelialer, intermediärer und mesenchymaler Konformation differentiell exprimiert. (von Burstin *et al.* 2009; nicht publizierte Daten AG Saur, München).

**Tabelle 1-1: EMT-assoziierte Gene**

Epitheliale Marker	Mesenchymale Marker
Annexin 10 (Anxa10)	Biglykan (Bgn)

Epitheliale Marker	Mesenchymale Marker
Annexin 13 (Anxa13)	Cd34
Hepatozyten nukleärer Faktor 4a (Hnf4a)	Discoidin Domain Rezeptor Typ 2 (Ddr2)
Retinol bindendes Protein 4 (Rbp4)	Fibroblast Groth Factor Rezeptor Type 1 (Fgfr1)
Tetraspanin 8 (Tspan8)	Matrix Metalloproteinase (Mmp2)
Wnt7a	Protocadherin 19 (Pcdh19)
	Snai2
	Sex determining region Y)-box 2 (Sox2)
	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (Sparc)
	Tissue Growth Factor-beta Rezeptor Type 3 (Tgfbr3)
	Zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2)

Zuordnung der untersuchten EMT-Gene zu der entsprechenden Zellkonformation, in welcher sie hoch exprimiert werden.

Die Zahlenwerte hinter den Gennamen zeigt ihre relative Überexpression innerhalb ihrer Zellkonformation im Vergleich zur Expression über alle Zellpopulationen.

### 1.2.3.1 In epithelialen Zelllinien hochregulierte Gene

**Annexin A10 (Anxa10)** gehört zu einer Familie von Calcium und Phospholipid bindender Proteine mit vielfältigen biologischen Funktionen (Kim *et al.* 2009). Gezeigt wurde bisher, dass eine verminderte Expression von Anxa10 mit einem gehäuften Auftreten von Magenkarzinomen assoziiert ist und die Tumorprogression des hepatozellulären Karzinoms begünstigt (Kim *et al.* 2010, Lu *et al.* 2011). Außerdem wurde Anxa10 als Marker des serratierten Karzinogeneseweges im kolorektalen Karzinom identifiziert (Kim *et al.* 2014).

**Annexin A13 (Anxa13)** gehört nicht nur ebenfalls zu o.g. Familie, sondern es konnte für dieses Gen gezeigt werden, dass es wahrscheinlich das Ursprungsgen der gesamten vertebralen Annexinfamilie ist (Iglesias *et al.* 2002). Des Weiteren konnte auch bei diesem Gen eine Assoziation von reduzierter Expression und gastrointestinalen Adenokarzinomen gezeigt werden (van Duin *et al.* 2007).

Der **Hepatozyten nukleärer Faktor 4 alpha (Hnf4a)** wurde im Rahmen der Leberentwicklung entdeckt und scheint in selbiger eine übergeordnete regulatorische Rolle zu spielen (DeLa Forest *et al.* 2011, Bonzo *et al.* 2012). Dass seine Expression nicht auf die Leber beschränkt ist, konnten Cattin *et al.* (2009) zeigen. In einer Arbeit von Santangelo *et al.* (2011) wird Hnf4a erstmals als direkter Inhibitor der EMT-Schlüsselgene Snail, Slug und HMGA2 erwähnt.

---

**Retinol bindendes Protein 4 (Rbp4)** ist ein im Blut zirkulierendes Protein, welches hauptsächlich durch Hepatozyten sezerniert wird (Christou *et al.* 2012), mit einer Bindungsspezifität für Retinol. Des Weiteren konnten bei erhöhten Serumkonzentrationen von Rbp4 Interaktionen mit Rezeptoren des JAK2/STAT5-Signalweges gezeigt werden, die Apoptose in den betroffenen Zellen induzierten (Chen *et al.* 2012).

**Tetraspanin 8 (Tspan8)** gehört zu einer Familie von extrazellulären Rezeptoren, die untereinander, wie auch mit anderen Molekülen, wie Immunrezeptoren, Integrinen oder Zytokinen interagieren (Veenbergen *et al.* 2011), Multiproteinkomplexe bilden (Claas *et al.* 2005) und weitreichenden Einfluss auf Zellmotilität und -proliferation haben (Yáñez-Mó *et al.* 2011). So konnten Rana *et al.* 2011 zeigen, dass eine Überexpression die Zellmotilität von Tumorzellen erhöht und Angiogenese induziert (Nazarenko *et al.* 2010). Gesierich *et al.* konnten 2005 zeigen, dass Tspan8 in PDAC-Zellen hochreguliert ist. Außerdem zeigt eine neuere Studie, dass Tspan8 bei der Metastasierung des PDAC hochreguliert wird (Yue *et al.* 2015).

**Wnt7a** gehört zu den Mediatoren der Wnt-Signalfamilie, deren Funktion und Signalweg relativ gut erforscht sind und die essentielle Rollen in der Entwicklung und bei der Kanzerogenese spielen (Clevers, Nusse, 2012). Wnt7a ist bekannt als Aktivator des kanonischen Signalweges (Spinsanti *et al.* 2008, von Maltzahn *et al.* 2011). Ein Verlust von E-cadherin begünstigt die Wnt-Signalwege und ist mit hohen nukleären Snail-Leveln assoziiert (Blanco *et al.* 2002)

### 1.2.3.2 In mesenchymalen Zelllinien hochregulierte Gene

**Biglycan (Bgn)** gehört zur Familie der kleinen leucinreichen Proteoglykane, wird perizellulär exprimiert und spielt eine Rolle bei der Assemblierung von Kollagenfibrillen. Entsprechend greift es regulatorisch in Zelladhäsion und -migration ein (Brandan *et al.* 2008). In humanen Pankreaskarzinomzelllinien konnten ein G1-Arrest und folglich eine Reduktion der Tumorprogression bei Überexpression von Bgn gezeigt werden (Weber *et al.* 2001)

**CD34** ist als Oberflächenantigen bekannt, das charakteristischerweise auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Levantini *et al.* 2011). Allerdings konnte auch eine prognoserelevante Assoziation mit gehäuftem Auftreten des kolorektalen Karzinoms gezeigt werden (Ma *et al.* 2010).

Der **Discoidin Domain Rezeptor Typ 2 (Ddr2)** gehört zur Familie der Tyrosinkinase Rezeptoren und interagiert mit Kollagenfibrillen der EZM (Badiola *et al.* 2011). In dieser Funktion hat sich Ddr2 bereits als EMT-assoziiertes Gen in der Embryogenese und der Metastasierung verschiedener Tumoren gezeigt (Walsh *et al.* 2011). Für die Isoform Ddr1 ist

---

bekannt, dass sie den RhoE-Komplex aktiviert, der die Aktomysinkontraktilität an Zell-Zell-Kontakten hemmt (Hidalgo-Carcedo *et al.* 2011).

Vom **Fibroblast Growth Factor Receptor Type 1 (Fgfr1)** ist das Mitwirken bei unzähligen embryologischen Entwicklungsprozessen bekannt. Entsprechend konnte für verschiedene Gewebe eine alterierte Entwicklung beim *knockdown* von Fgfr1 im Mausmodell gezeigt werden (Miraoui *et al.* 2011, Bates 2011). In der Onkologie ist Fgfr1 im Gespräch als ein vielversprechender Kandidat für sog. zielgerichtete Therapien, da es in diversen malignen Tumoren hochreguliert wird (Tenhagen *et al.* 2012).

**Matrix Metalloproteinase Typ 2 (Mmp2)** gehört zu den Proteasen, die Zellen in die EZM sezernieren. Dort ist Mmp2 nicht nur in der Lage, Kollagen zu degradieren, so wie seine Isoformen, sondern kann auch TGF- $\beta$  aus Vorläuferstufen aktivieren (Jenkins *et al.* 2008).

Eine Einschränkung der Prognose von Krebserkrankungen konnte exemplarisch bei Brustkrebs gezeigt werden (Wadowska-Jaszczyńska *et al.* 2011).

**Protocadherin 19 (Pcdh19)** gehört zu einer Subgruppe der calciumabhängigen Cadherine, einer sehr heterogenen Superfamilie von transmembranären Adhäsionsmolekülen, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Speziell für Pcdh19 wurde eine starke Interaktion mit N-Cadherin nachgewiesen (Emond *et al.* 2011), die in der Embryogenese essentiell bei einem korrekten Ablauf der Gastrulation erscheint (Biswas *et al.* 2010).

**Slug**, auch **Snai2** genannt, gehört zur Familie der Snail-Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie EMT-Induktoren sind (Dhasarathy *et al.* 2011). Speziell genannt werden in der Literatur unter anderem Bedeutungen bei der Neurulation (Shi *et al.* 2011) und der Wundheilung (Aomatsu 2012). Für das Pankreaskarzinom konnten Shields *et al.* 2012 zeigen, dass die Snailfamilie die Tumorprogression vorantreibt.

**SRY (sex determining region Y)-box 2 (Sox2)** wurde bereits als Masterregulator bei embryonalen Stammzellen beschrieben (Rizzino 2009). *Knockdown* von Sox2 beeinträchtigte das Potential von humanen embryonalen Stammzellen zum Überleben und zur Selbsterneuerung erheblich (Fong *et al.* 2012).

**Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC)** ist ein in die EZM sezerniertes Protein, welches extrazellulär calciumabhängig als Chaperon zu fungieren und die Degradierung der EZM voranzutreiben scheint (Chlenski *et al.* 2011). Bekannt ist im Allgemeinen, dass SPARC bei Zelladhäsion, Proliferation, Tumorgenese und Metastasierung eine Rolle spielt (Bhoopathi *et al.* 2011) und beispielsweise beim Mammakarzinom signifikant erhöht exprimiert wird (Gerson *et al.* 2012).

**Tissue Growth Factor-beta Receptor Type 3 (Tgfb $\beta$ 3)** ist ein transmembranärer Rezeptor mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität und bindet an das Zytokin TGF- $\beta$ , welches mit einer

---

gesteigerten Zelldifferenzierung und -proliferation in Zusammenhang gebracht wird (Lambert *et al.* 2011; Hay, 2003) und außerdem EMT induzieren kann (Townsend *et al.* 2012, Lee, 2012 ). Die genaue Funktion des Tgfr3 als Corezeptor der TGF- $\beta$ -Familie ist noch unbekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass Tgfr3-Überexpression im Kolonkarzinommodell die Tumorprogression fördert (Gatza *et al.* 2011).

**Zinc finger E-box binding homeobox 2 (Zeb2)** gehört zu einer Familie von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, deren Bedeutung in der Embryonalentwicklung als gesichert gilt (Gheldof *et al.* 2012). Bei humanen Krebszellen konnten Nam *et al.* 2012 zeigen, dass Zeb2 EMT induziert. Gesichert ist auch, dass Zeb2 über den Smad-Signalweg wirkt (Xiong *et al.* 2012). Für die Isoform Zeb1 ist gezeigt worden, dass sie unter TGF- $\beta$ -Stimulation EMT induziert (Shi *et al.* 2003)

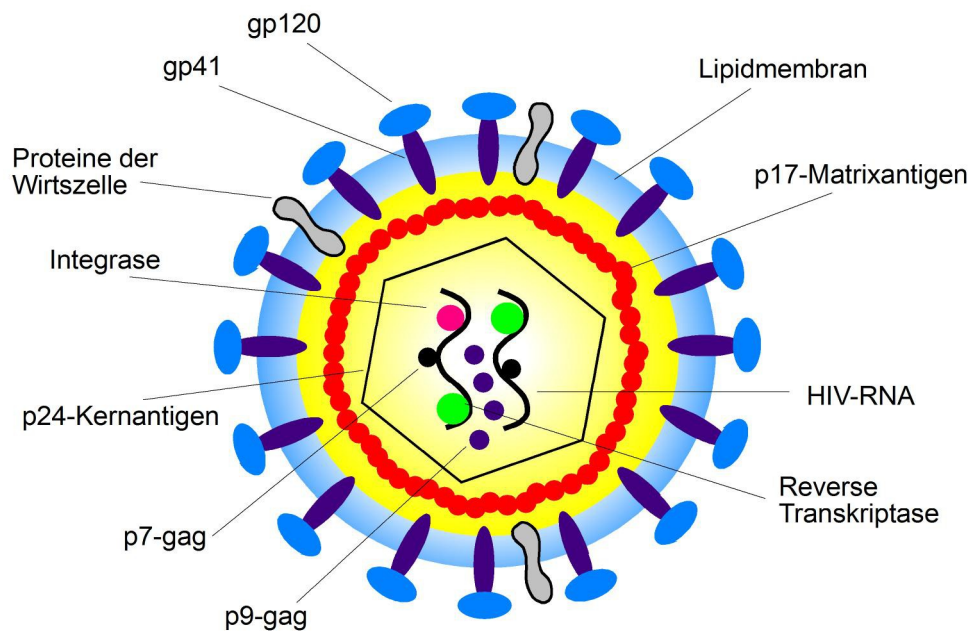
### **1.3 Gentransfer in Säugerzellen**

Die Transfektion von fremder DNA oder RNA in Säugerzellen ist ein essentielles Werkzeug, um zelluläre Mechanismen und Genfunktionen zu entschlüsseln. Ziel hierbei ist die Überexpression eines Gens oder seine Ausschaltung (*knockdown*). Neben transienten Methoden, bei denen beispielsweise nackte Ribonukleotide in die Zelle gebracht werden, hat vor allem die stabile Integration von genetischer Information mittels viraler Vektoren in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen (Kumar *et al.*, 2011). Deren Aufbau und Bedeutung in der Forschung soll hier kurz angerissen werden.

#### **1.3.1 Aufbau und Lebenszyklus von Lentiviren**

Das in dieser Arbeit verwendete System zum Gentransfer basiert auf dem Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 (HIV-1), welches zur Gattung der Lentiviren gehört. Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und sind von einer Doppelmembran umhüllt. In dieser finden sich die Glykoproteine gp41 und gp120. Auf der Innenseite der Membran findet sich die Matrix, die sich aus dem Protein p17 zusammensetzt. Das virale Genom umfasst etwa 9kb, besteht aus zwei einzelsträngigen RNA-Sequenzen und findet sich im Kapsid, welches aus p24 gebildet wird. Dort sind außerdem die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease zu finden. (Gelderblom *et al.* 1987; Gelderblom *et al.* 1994).

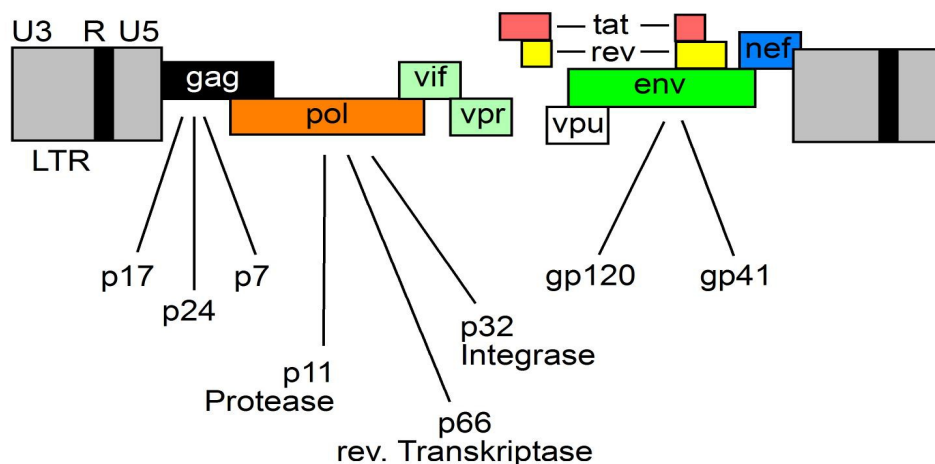
Zur Replikation müssen HI-Viren ihre genetische Information nach Eindringen in die Wirtszelle zunächst stabil in das Kerngenom selbiger integrieren (Zacket *et al.* 1990). Hierzu wird die virale RNA von der reversen Transkriptase in virale DNA umgeschrieben und dann von der Integrase in das Wirtsgenom eingefügt.



**Abb. 1.4: Struktur von HIV-1**

Nackte RNA mit Bezeichnung der replikationsrelevanten Enzyme sowie Benennung relevanter Kapsid- und Transmembranproteine.  
 (Aus: HIV 2011, Hoffmann C, Rockstroh JK. Mit freundlicher Genehmigung von C. Hoffmann, Hamburg)

Das virale Genom wird von den *long term repeats* (LTR) begrenzt, welche regulatorische Sequenzen enthalten: 5'LTR enthält einen Promotor, der die RNA-Polymerase der Wirtszelle zur Transkription viraler Proteine zwingt und das Verpackungssignal  $\psi$ ; die 3'LTR koordiniert die posttranskriptionelle Prozessierung der mRNA. Dazwischen befindet sich der codierende Bereich. Dieser besteht aus drei großen Leserastern (ORF: *open reading frame*), gag, pol und env, die sich teilweise überlappen und für Capsidproteine (gag), Enzyme (pol) und Hüllenglykoproteine (env) kodieren (Rein, 1994; Lever *et al.* 2004). Diese Bereiche finden sich in allen Lentiviren und sind in ihrer Form konserviert; bei HIV sind daneben noch Gene für akzessorische Proteine, die regulatorische Aufgaben wahrnehmen, nachweisbar (Zhang *et al.* 2006).



**Abb. 1.5: Organisation des HIV-1-Genoms**

Die LTR an den Enden des Genoms bestehen aus homologen Sequenzen und enthalten regulatorische Sequenzen für die Transkription und Prozessierung und Verpackung der viralen genetischen Information. Neben den drei großen ORFs gag, pol und env, die für die Proteine kodieren, die letztlich zu neuen Virionen verpackt werden und obligat für alle Lentiviren sind, enthält das Genom noch Sequenzen von vif, vpr, vpu, tat, rev und nef – akzessorische Proteine, welche in der infizierten Zelle nachweisbar sind und hauptsächlich die antivirale, zelluläre Antwort unterminieren.

(Aus: HIV 2011, Hoffmann C, Rockstroh JK. Mit freundlicher Genehmigung von C. Hoffmann, Hamburg)

### 1.3.2 Anwendung von Lentiviren zum Gentransfer

HIV-1-basierte, lentivirale Vektoren haben eine Reihe von Vorzügen, die sie zu einem häufig gebrauchten Werkzeug in der Gentechnik haben werden lassen. Da Lentiviren natürlicherweise ein Genom von knapp 10kb besitzen, lassen sich Expressionsvektoren dieser Größe effizient in Zellen einbringen. Außerdem können sie sowohl teilende, als auch ruhende Zellen transduzieren und rufen bei der Wirtszelle nur mäßige bis keine immunologische Antwort hervor. Da das virale Progenom fest in das Wirtsgenom integriert wird, kann eine permanente Expression des Gens von Interesse garantiert werden. Zwar kann es dadurch zu Insertionsmutationen kommen, jedoch sind diese im Vergleich zu anderen viralen Systemen vergleichsweise selten relevant (Naldini, 1998; Trono *et al.* 2000; Beard *et al.* 2007).

Die heute (handels-)üblichen Systeme der dritten und vierten Generation enthalten nur noch gag, pol und rev als originale HIV-Gene. Die Gene, die für die Verpackungsproteine kodieren, wurden durch funktionsäquivalente Sequenzen aus dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G Gen) ersetzt. (Burns *et al.* 1993; Yee *et al.* 1994) Außerdem besitzt die 3'LTR des Expressionsvektors eine 400 bp lange Deletion – diese verhindert die Desintegration des

---

viralen Genoms in der transduzierten Zelle und somit die Produktion weiterer infektiöser Partikel, ohne die Virion-Produktion in der transfizierten Zelllinie zu behindern. Um die Sicherheitsvorkehrungen zu komplettieren, wurden die Verpackungsgene auf mehrere Vektoren, je nach Generation zwei oder drei, verteilt. Diese haben untereinander keinerlei homologe Sequenzen, so dass durch homologe Rekombination kein Vektor entstehen könnte, der alle Gene enthält, die zu Herstellung neuer Viruspartikel nötig sind. Zusätzlich haben diese Plasmide keine LTRs und kein Verpackungssignal  $\psi$  wodurch sie die transfizierten Zellen nicht verlassen können und in der Zielzelllinie nicht nachweisbar sind. (Yu *et al.* 1986; Dull *et al.* 1998; Zufferey *et al.* 1998)

In der Summe sind die HIV-1-basierten, lentiviralen Systeme zum Gentransfer in Säugerzellen als überaus effizient bei der Transduktion beschrieben, bei gleichzeitig absoluter Sicherheit für den Anwender.

### 1.3.3 RNA-Interferenz mit Hilfe von sh-RNA

RNA-Interferenz ist eine effektive Methode, um zwischen Transkription und Translation einen funktionellen *knockdown* eines Gens in Zellkulturen zu erreichen. Hierbei wird Einzelstrang (ss)- oder Doppelstrang (ds)-RNA in die Zelle transfiziert, wobei Fire *et al.* 1998 zeigen konnten, dass ds-RNA einen effektiveren *knockdown* garantiert. Die sogenannte Interferenz-RNA (RNAi) bindet nach Transfektion an ihre komplementäre Sequenz der mRNA und führt zu deren Degradierung, was sich letztendlich einen natürlichen Abwehrmechanismus der Zelle gegen Fremd-, wie beispielsweise Virusribonukleotide zu Nutze macht (Jayachandran *et al.* 2012).

Der Mechanismus, der dem intrazellulären *silencing* des Zielgens zu Grunde liegt, beginnt mit der Abspaltung des Loops der shRNA mittels *Dicer* (Gregory *et al.* 2004), der einen 21-27 bp umfassenden Doppelstrang hinterlässt. Einer der beiden Stränge, der Führerstrang, den *RNA-induced silencing complex* (RISC) rekrutiert (Schwarz *et al.* 2003) und dieser Komplex den komplementären mRNA-Strang bindet und die Translation unterminiert.

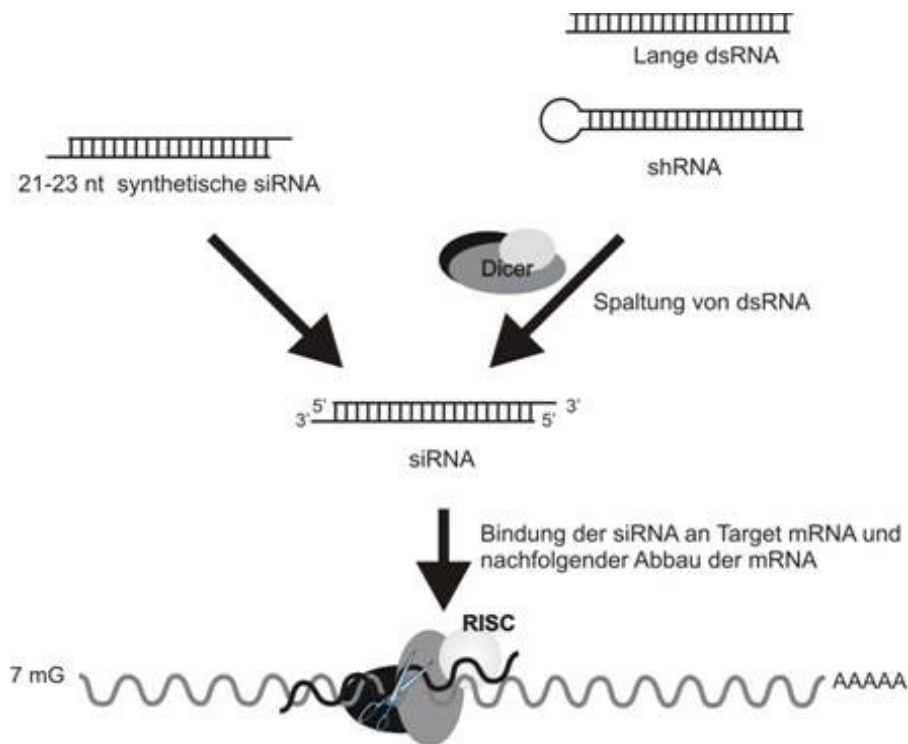
Die Effektivität des *knockdown* hängt kritisch von der Wahl der RNAi-Sequenz ab. Sehr kurze Sequenzen zeigen eine geringere Spezifität in ihrem *knockdown* und können so genannte *off-target*-Effekte erzeugen (Behlke, 2008). Sequenzen mit mehr als 27bp führen gehäuft zur Aktivierung von Interferon-Signalkaskaden (Kawai *et al.* 2006), wobei auch gezeigt wurde, dass eine Beeinträchtigung der Zellviabilität schon ab 23bp Länge auftreten kann (Reynolds *et al.* 2006; Leaman *et al.* 1998). Ursächlich dafür ist die direkte Aktivierung der RNA-abhängigen Proteinkinase PRKR und des *toll-like*-Rezeptors Typ 3 durch die dsRNA, welche zu einer ungezielten Degradierung der mRNA in der Zelle führen (Elbashir *et*



al. 2001; Reynolds *et al.* 2006).

Da auch die RNAi in der Zelle schnell abgebaut wird, kann ihr Effekt nur etwa zwei Tage aufrecht erhalten werden. Abhilfe schafft hier die Verwendung von *short hairpin* (sh)-RNA, bei der mittels lentiviraler Vektoren eine Kasette mit sh-Sequenz und Promotor stabil in das Genom der Zelle integriert und dann permanent exprimiert wird. Die transfizierte Zelle und alle ihre Tochterzellen erfahren einen stabilen *knockdown* mit signifikanter Reduktion der synthetisierten Zielproteinmenge. Anders als bei der homologen Rekombination kann hier aber nicht mit einem absoluten *knockdown* gerechnet werden.

Da der *knockdown*-Mechanismus auf der Posttranskriptionsebene stattfindet, ist seine Effektivität sowohl von der Transskriptionsrate des Gens, als auch von der Lebensdauer des Proteins abhängig. Sehr hoch exprimierte Gene oder Gene, deren Proteine eine besonders lange Halbwertszeit haben, lassen sich mit dieser Methode unter Umständen nicht signifikant unterdrücken (Boudreau *et al.* 2012).



**Abb. 1.6: Funktionsprinzip von RNAi**

Doppelsträngige, lange oder shRNA Moleküle werden vom DICER, einem Enzym mit Endonukleaseaktivität, in 21-27bp große siRNA-Moleküle geschnitten. Einer dieser Stränge rekrutiert den RISC-Enzymkomplex, bindet an die homologe mRNA-Sequenz und führt sie dem Abbau durch Exosomen zu.

(Mit freundlicher Genehmigung von M. Scherr, Hannover)

---

#### **1.4 Ziel dieser Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Aufklärung der molekularen Mechanismen im epithelial-mesenchymalen Phänotypenwechsel metastasierender Pankreaskarzinomzellen voranzutreiben. Zur Identifikation von Schlüsselstellen in diesem Signalweg wird die Etablierung von *knock-out*-Mausmodellen angestrebt. In dieser Arbeit werden zunächst Plasmide erstellt, die eine permanente Überexpression bzw. einen permanenten *knockdown* jeweils eines der genannten 17 EMT-Gene (s. 1-1) in murinen Pankreastumorzelllinien ermöglichen. Die Klonierungen wurden derart geplant und durchgeführt, dass in einer Zielzelllinie simultan mehrere Genexpressionen alteriert werden können. Zur Beurteilung einer erfolgreichen Überexpression bzw. eines erfolgreichen *knockdown* wird der Goldstandard der Zellmorphologie nach lentiviraler Transduktion mit einem Expressionsvektor dokumentiert und ausgewertet. Weitere Arbeiten müssen im Anschluss bei der Analyse der im Rahmen der EMT aktivierten Signalwege geleistet werden, um Schlüsselproteine zu identifizieren und ihre Abhängigkeit von bekannten EMT-induzierenden Signalwegen wie TGF- $\beta$  untersuchen.

---

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

**Tabelle 2-1: Geräte**

Gerät	Hersteller
Analytische Waage A 120 S	Sartorius AG, Göttingen
AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
CO <sub>2</sub> Inkubator HERAcCell®	Heraeus Holding GmbH, Hanau
CO <sub>2</sub> Inkubator MCO-5AC 17AI	Sanyo Sales & Marketing Europe GmbH, München
Dewar Transportbehälter, type B	KGW-Isotherm, Karlsruhe
Einschweißgerät Folio FS 3602	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern
Elektrophorese Netzgerät Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluorometer FLUOstar Optima	BMG Labtech GmbH, Offenburg
Flu-o-blu	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Gel Doc™ XR+ System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
HERAsafe® Mikrobiologische Sicherheitswerkbänke	Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA
Horizontales Gelelektrophorese System	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Horizontaler Schüttler	Titertek Instruments, Inc., Huntsville, AL, USA
Inkubator Schüttler Thermoshake	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Kipptisch WT 17	Biometra GmbH, Göttingen
Laborglasware, Schott Duran®	Schott AG, Mainz
Magnetischer Rührer, Ikamag® RCT	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop DM LB	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrozentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrozentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle	Siemens, München
Mini Zentrifuge MCF-2360	LMS Consult GmbH & Co. KG, Brigachtal
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette® stream	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Netzgeräte E844, E822, EV243	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Odyssey® Infrarot Bildgebungssystem	Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA
pH-Meter 521	WTW Wissenschaftlich-Technische

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Pipetten Reference®, Research® Pipetus®	Werkstätten GmbH, Weilheim Eppendorf AG, Hamburg Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Spektrophotometer NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Stereomikroskope Stemi SV 11	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Thermozykler T1	Biometra GmbH, Göttingen
Thermozykler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
Thermozykler TPersonal	Biometra GmbH, Göttingen
Thermozykler UNO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genius 3	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Western blot System SE 260 Mighty Small II	Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA
Zentrifuge Avanti® J25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifuge Rotina 46R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

## 2.2 Verbrauchsgegenstände

**Tabelle 2-2: Verbrauchsgegenstände**

<b>Verbrauchsgegenstand</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham Hybond-N+ Membran	GE Healthcare Europe GmbH, München
Combitips BioPur®	Eppendorf AG, Hamburg
CryoPure Gefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Einmalspritzen Omnifix®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Filterspitzen, professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Filtropur S 0.2	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filtropur S 0.45	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konische Gefäße, 15 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Konische Gefäße, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Küvetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PCR Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim;

<b>Verbrauchsgegenstand</b>	<b>Hersteller</b>
	Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1.5 ml and 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Safe-lock Reaktionsgefäße BioPur®	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Transfer membrane Immobilon-P	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
Zellkultur Flaschen	Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes, NJ, USA; Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

## 2.3 Reagenzien und Enzyme

**Tabelle 2-3: Reagenzien und Enzyme**

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
2-Log DNA Leiter (0.1–10.0 kb)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
2-Mercaptoethanol, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co.
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ampicillinnatriumsalz (100 mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
BBXF Agarose Gel Ladepuffer Mix	BIO 101, Inc., Carlsbad, CA, USA
Blottin Fettarmes Milchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovines Serum Albumin – Fraktion V	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bradford Reagenz	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chloramphenicol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dNTP Mix, je 10mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dodecylsulfat Natriumsalz in Tabletten	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
(SDS)	
Dulbecco's phosphatgepuffertes Kochsalz, Puder	Biochrom AG, Berlin
Ethanol (100%)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gateway® LR Clonase™ Enzymmix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GDP (10x)	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
Gel Ladepuffer, blue	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
GelStar®	Biowhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA
GeneRuler™ 100bp DNA Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HEPES Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
Isotone Kochsalzlösung	Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
LB Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Nonidet P40	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
N,N-dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Orange G	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
PfuUltra™ high fidelity DNA Polymerase	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
Phosphataseinhibitor Mix I	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Precision Plus Protein™ all blue standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteinase K, rekombinant	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
rAPid alkalische Phosphatase	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktionsmix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNase-freies DNase set	Qiagen GmbH, Hilden

Reagenz	Hersteller
RNase A	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Roti® Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat Puffer Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid Lösung (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
SSC Puffer concentrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TE Puffer, pH 8.0	AppliChem GmbH, Darmstadt
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TGFβ1, rekombinantes, humanes, aus Säugern stammend	PeproTech GmbH, Hamburg
Tris Hydrochlorid	J.T.Baker® Chemicals, Phillipsburg, NJ, USA
Tris Pufferan®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vollständige, EDTA-freie, Proteaseinhibitorcocktail-Tabletten	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 2-4: Antikörper.**

Antikörper	Hersteller
AlexaFluor® 680 Ziege Anti-Maus IgG (H+L), 2 mg/ml, A21058	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aufgereinigter Maus anti-E-cadherin, 610181	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Monoklonaler anti-α-Tubulin Antikörper hergestellt in Maus, T6199	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

---

## 2.5 Molekularbiologie

**Tabelle 2-5: Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Aneinanderlagerungspuffer	200mM Tris-Hcl, (pH 7,9) 40mM MgCl 1M NaCl 20mM EDTA
KCM Puffer (5x)	500 mM KCl 150 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM MgCl <sub>2</sub>
Ladepuffer Orange G (6x)	60% Glycerol 60 mM EDTA 0.24% Orange G
IP Puffer, pH 7.9	50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 mM EDTA 0.5% Nonidet P40 10% Glycerol Phosphatase Inhibitor Protease Inhibitor
Gel Ladepuffer	0.5 M Tris, pH 6.8
Gel Trennpuffer	1.5 M Tris, pH 8.8
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1% SDS
Transferpuffer, pH 8.3	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1% SDS 20% Methanol
Protein Ladepuffer (5x, Laemmli), pH 6.8	10% SDS 50% Glycerol 228 mM Tris Hydrochlorid 0.75 mM Bromphenolblau 5% 2-Mercaptoethanol
Tris gepuffere Kochsalzlösung (TBS), pH	0.5 M Tris



<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
7.6	1.5 M Natriumchlorid
TAE Puffer (50x), pH 8.5	2 M Tris 100 mM EDTA 5.71% (v/v) Essigsäure(100%)

Alle Puffer wurden mit destilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt.

**Tabelle 2-6: Kits für die Molekularbiologie**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
EndoFree® plasmid maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
EndoFree® plasmid midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAfilter plasmid midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep® spin miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® gel extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAshredder	Qiagen GmbH, Hilden
Quick Blunting™ Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNeasy mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan® reverse transcription reagents	Applied Biosystems, Inc., Carlsbad, CA, USA
Topo® TA cloning® Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

**Tabelle 2-7: Bakterienstämme**

<b>Bakterienstamm</b>	<b>Hersteller</b>
One Shot® TOP10 chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Library Efficacy® DB3.1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
One Shot® Stbl3™ chemically competent <i>E. coli</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

**Tabelle 2-8: Plasmide und cDNA**

<b>Plasmid/cDNA</b>	<b>Hersteller</b>
pENTR™-MCS-IRES-Puromycin	Modifiziert von AG Saur aus pENTR™/TOPO-D®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pENTR™-MCS-EF1α-EGFP	Modifiziert von AG Saur aus

<b>Plasmid/cDNA</b>	<b>Hersteller</b>
	pENTR <sup>TM</sup> /TOPO-D <sup>®</sup> , Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pENTR <sup>TM</sup> -MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed	Modifiziert von AG Saur aus pENTR <sup>TM</sup> /TOPO-D <sup>®</sup> , Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pENTR <sup>TM</sup> - pSupr.Puromycin	Hergestellt von AG Saur, München aus pENTR <sup>TM</sup> /TOPO-D <sup>®</sup> und pSuper.Puro, beide von Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pCR <sup>®</sup> 4Blunt-TOPO <sup>®</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pLenti-CMV-GFP-DEST	Addgenes, Cambridge, Vereinigtes Königreich
pLenti4-TO-V5dest-EGFP	Modifiziert von AG Saur aus pLenti4-TO-/V5-DEST, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pLenti4/V5-DEST	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pLenti6.2/V5-DEST	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pLP 1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pLP 2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PLVTHM (control-shBim-EGFP)	Freundlicherweise bereitgestellt von AG Schneider, München
PmD2.G	Freundlicherweise bereitgestellt von AG Schneider, München
PsPAX2	Freundlicherweise bereitgestellt von AG Schneider, München
Anxa10 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Kana, in pCR4-TOPO Klon: IRCLp5022G039D	ImaGenes GmbH, Berlin
Anxa13 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968F0628D	ImaGenes GmbH, Berlin
Bgn cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968E0698D	ImaGenes GmbH, Berlin
Cd34 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968C1121D	ImaGenes GmbH, Berlin
Ddr2 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Kana, in pCR4-TOPO Klon: IRCKp5014B079Q	ImaGenes GmbH, Berlin
Fgfr1 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968B0448D	ImaGenes GmbH, Berlin
Hnf4a cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968E0761D	ImaGenes GmbH, Berlin

<b>Plasmid/cDNA</b>	<b>Hersteller</b>
Mmp2 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pYX-ASC Klon: IRAVp968H04129D	ImaGenes GmbH, Berlin
Rbp4 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968C1046D	ImaGenes GmbH, Berlin
Snai2 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6.1 Klon: IRAVp968F01104D	ImaGenes GmbH, Berlin
Sox2 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pYX-ASC Klon: IRAVp068C04116D	ImaGenes GmbH, Berlin
Sparc cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968B038D	ImaGenes GmbH, Berlin
Tgfbr3 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pYX-Asc Klon: IRAVp968H10127D	ImaGenes GmbH, Berlin
Tspan8 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pCMV-SPORT6 Klon: IRAVp968B0177D	ImaGenes GmbH, Berlin
Wnt7a cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pYX-Asc Klon: IRAVp968G11158D	ImaGenes GmbH, Berlin
Zeb2 cDNA Maus verifiziert volle Länge, Amp, in pYX-Asc Klon: IRAVp968A03115D	ImaGenes GmbH, Berlin

### 2.5.1 Primer

Alle Primer und Oligonukleotide wurden durch Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert und in destilliertem H<sub>2</sub>O verdünnt.

**Tabelle 2-9: Screeningprimer für Vektor pEntr**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
pEntrsc-for	GTTGTAAAACGACGGCCAGTCTT
Anxa10-rev	TGCTCTGATAGGTCCCAGCT
Anxa13-rev	TTGGCATCCTGACCAGCCAA
Bgn-rev	CGCAGAGGGCTAAAGGCCTT
Cd34-rev	CAGTTGGGGAAGTCTGTGGT
Ddr2-rev	CCTGCTTCCCATGCCGGTTA
Fgfr1-rev	GCTCCAGGTGGCATAGCGAA
Hnf4a-rev	TCCTTCTTCATGCCAGCCCG
Mmp2-rev	GACATCGCCGGGGAACCTTGA
Rbp4-rev	CTTGCAAAAAGAGACCCTCG
Snai2-rev	GTTCGCTGTAGTTGGGCTTC

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
Sox2-rev	ACCATACCATGAAGGCGTTC
Sparc-rev	TCACACACCTTGCCATGTT
Tgfbr3-rev	GCTTGTGGTGAGTGTGCACG
Tspan8-rev	AAGCATGCACCGGCTTTCT
Wnt7a-rev	CTATGCCCAGGCTGAGAAAG
Zeb2-rev	TGCGTCCACTACGTTGTCAT
ari-dsRed-RP1	CAGATCCGAATTCTCCGGG
pEntrEF2seq-RP1	GGACTGTGGGCGATGT
pIRES-RP1	CATATAGACAAACGCACACCG
pSup-RP1	TGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAG

**Tabelle 2-10: Primer zur PCR Amplifikation**

<b>Produkt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
Pcdh19	Pcdh19-for	AGCCATGGAGTCTCTCCTGCTG
	Pcdh19-rev	ACCCAGATGGCTTTAGAGAACGATATC
Rbp4	Rbp4-SpeI-for	GACTAGTGAGATGGAGTGGGTGTGGG
	Rbp4-SpeI-rev	TACTAGTCTACAAACTGTTTCTGGAGGGCCT
Tspan8	Tspan8-XhoI-for	TCCTCGAGACCGAAATGGCAGGTGTGAGC
	Tspan8-XhoI-rev	GTCTCGAGGTCACTTGCTTCCAATCTGGCAG
Wnt7a	Wnt7a-XhoI-for	TCCTCGAGACTATGACCCGGAAAGCGC
	Wnt7a-XhoI-rev	GTCTCGAGGTTTCACTTGACAGTATACATCTCCG

**Tabelle 2-11: Primer zur Sequenzierung**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>
pEntrsc-for	GTTGTAAAACGACGGCCAGTCTT
Pcdh19Topo-1700RP	TGAGAGCAGATAGGCACCAG
pSup-RP1	TTGCATGTCGCTATGTGTTCTG
Pcdh19 screen for	GACAGAAGGTGACCGAGGTTT
Pcdh19 screen rev	AAGTGCTCTCAGAGCGACGAC
M13-for	GTAAAACGACGGCCAG
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA

**Tabelle 2-12: Oligonukleotide für sh-Design**

Name des Gens	Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' - 3')	Referenz
sh für Anxa10	shAnxa10-for	GATCCCCCAAAGACATGCTGATTGACATC CTATTCAAGAGATAGGATGTCAATCAGCAT GTCTTTGTTTTTC	
	shAnxa10-rev	TCGAGAAAAACAAAGACATGCTGATTGAC ATCCTATCTCTTGAATAGGATGTCAATCAG CATGTCTTTGGGG	
sh für Anxa13	shAnxa13-for	GATCCCCCATCGGAGGAGAGGCAACAGA TAAATTCAAGAGATTTATCTGTTGCCTCTC CTCCGATGTTTTTC	
	shAnxa13-rev	TCGAGAAAAACATCGGAGGAGAGGCAAC AGATAAATCTCTTGAATTTATCTGTTGCCTC TCTCCGATGGGG	
sh für Bgn	shBgn-for	GATCCCCGGGTTTCTGGGACTTCACCTTT TCAAGAGAAAAGGTGAAGTCCCAGAAACC CTTTTTTC	Moreno <i>et al.</i> (2005)
	shBgn-rev	TCGAGAAAAAGGGTTTCTGGGACTTCACC TTTCTCTTGAAAAGGTGAAGTCCCAGAAA CCCGGG	
sh für Cd34	shCd34-for	GATCCCCCCTACTACTTCAGACAGTATTTTC CATTCAAGAGATGGAAATACTGTCTGAAG TAGTAGGTTTTTC	
	shCD34-rev	TCGAGAAAAACCTACTACTTCAGACAGTA TTTCCATCTCTTGAATGGAAATACTGTCTG AAGTAGTAGGGGG	
sh für Ddr2	shDdr2-for	GATCCCCCGAAAGTGCTACCAACGGTTTT TCAAGAGAAAACCGTTGGTAGCACTTTTCG TTTTTC	Shyu <i>et al.</i> (2008)
	shDdr2-rev	TCGAGAAAAACGAAAGTGCTACCAACGGT TTTCTCTTGAAAACCGTTGGTAGCACTTT CGGGG	
sh für Fgfr1	shFgfr1-for	GATCCCCGATGTTGAAGTCCGACGCATTC AAGAGATGCGTCCGACTTCAACATCTTTTT C	Yang <i>et al.</i> (2008)
	shFgfr1-rev	TCGAGAAAAAGATGTTGAAGTCCGACGCA TCTCTTGAATGCGTCCGACTTCAACATCG GG	
sh für Hnf4a	shHnf4a-for	GATCCCCGGTGCCAACCTCAATTCATCCTT CAAGAGAGGATGAATTGAGGTTGGCACCT TTTTTC	
	shHnf4a-rev	TCGAGAAAAAGGTGCCAACCTCAATTCAT CCTCTCTTGAAGGATGAATTGAGGTTGGC ACCGGG	
sh für Mmp2	shMmp2-for	GATCCCCCGCGTAAAGTATGGGAACGCT	

Name des Gens	Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' - 3')	Referenz
	shMmp2-rev	GATTTCAAGAGAATCAGCGTTCCCATACTT TACGCGGTTTTTC TCGAGAAAAACCGCGTAAAGTATGGGAAC GCTGATTCTCTTGAAATCAGCGTTCCCATA CTTTACGCGGGGG	Mosig <i>et al.</i> (2007)
sh für Pcdh19	shPcdh19-for shPcdh19-rev	GATCCCCCGGCTGCCCTGATTAACCTTAA ATATTCAAGAGATATTTAAGGTTAATCAGG GCAGCCGTTTTTC TCGAGAAAAACGGCTGCCCTGATTAACCT TAAATATCTCTTGAAATTTAAGGTTAATCA GGCAGCCGGGG	
sh für Rbp4	shRbp4-for shRbp4-rev	GATCCCCTCGTAGTCCGTGTCGATGATCC AGTTTCAAGAGAACTGGATCATCGACACG GACTACGATTTTTTC TCGAGAAAAATCGTAGTCCGTGTCGATGA TCCAGTTCTCTTGAAACTGGATCATCGACA CGGACTACGAGGG	
sh für Snai2	shSnai2-for shSnai2-rev	GATCCCCGCTCCACTCCACTCTCCTTTTCA AGAGAAAGGAGAGTGGAGTGGAGCTTTT TC TCGAGAAAAAGCTCCACTCCACTCTCCTT TCTCTTGAAAAGGAGAGTGGAGTGGAGC GGG	Olmeda <i>et al.</i> (2008)
sh für Sox2	shSox2-for shSox2-rev	GATCCCCGAAGGAGCACCCGGATTATTTTC AAGAGAATAATCCGGGTGCTCCTTCTTTTT C TCGAGAAAAAGAAGGAGCACCCGGATTAT TCTCTTGAAAATAATCCGGGTGCTCCTTCG GG	Chew <i>et al.</i> (2005)
sh für Sparc	shSparc-for shSparc-rev	GATCCCCAACAAGACCTTCGACTCTTCCTT CAAGAGAGGAAGAGTCGAAGGTCTTGTTT TTTTTC TCGAGAAAAAACAAGACCTTCGACTCTT CCTCTCTTGAAGGAAGAGTCGAAGGTCTT GTTGGG	Song <i>et al.</i> (2010)
sh für Tgfbr3	shTgfbr3-for shTgfbr3-rev	GATCCCCGAAATGACATCCCTTCCACTTCA AGAGAGTGAAGGGATGTCATTTCTTTTT C TCGAGAAAAAGAAATGACATCCCTTCCAC TCTCTTGAAGTGAAGGGATGTCATTTG GG	Gordon <i>et al.</i> (2008)
sh für Tspan8	shTspan8-for	GATCCCCAATCTGGCAGTATAGCACCATA GAATTCAAGAGATTCTATGGTGCTATACTG CCAGATTTTTTTC	Berthier-Vergnes <i>et al.</i> (2011)

Name des Gens	Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz (5' - 3')	Referenz
	shTspan8-rev	TCGAGAAAAAATCTGGCAGTATAGCACC ATAGAATCTCTTGAATTCTATGGTGCTATA CTGCCAGATTGGG	
sh für Wnt7a	shWnt7a-for	GATCCCCCTCTTCACAGTAATTGGGTGA CTTTTCAAGAGAAAGTCACCCAATTACTGT GAAGAGGTTTTTC	
	shWnt7a-rev	TCGAGAAAAACCTCTTCACAGTAATTGGG TGACTTTCTCTTGAAAAGTCACCCAATTAC TGTGAAGAGGGGG	
sh für Zeb2	shZeb2-for	GATCCCCGAAACACTGTTGTGGTCTAAGT TTATTCAAGAGATAAACTTAGACCACAACA GTGTTTCTTTTC	
	shZeb2-rev	TCGAGAAAAAGAAACACTGTTGTGGTCTA AGTTTATCTCTTGAATAAACTTAGACCACA ACAGTGTTCGGG	
sh Kontrolle	shKontrolle-for	GATCCCCCAGTCGCGTTTGCGACTGGTTC AAGAGACCAGTCGCAAACGCGACTTTTTT C	Schneider et al. (2007)
	shKontrolle-rev	TCGAGAAAAACAGTCGCGTTTGCGACTGG TCTCTTGAACCAGTCGCAAACGCGACTGG GG	

## 2.6 Zellkultur

**Tabelle 2-13: Zelllinien**

Zelllinie	Genotyp	Hersteller
HEK 293 FT	-	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
16992 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Kras <sup>G12D/+</sup>	Isoliert von AG Saur, München
3107 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Trp53 <sup>R172H/+</sup>	Isoliert von AG Saur, München
5193 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Trp53 <sup>R172H/+</sup>	Isoliert von AG Saur, München
5320 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Kras <sup>G12D/+</sup>	Isoliert von AG Saur, München
53631 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Kras <sup>G12D/+</sup>	Isoliert von AG Saur, München
5436 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Kras <sup>G12D/+</sup> , LSL- Trp53 <sup>R172H/R172H</sup>	Isoliert von AG Saur, München
6554 PPT	Ptf1a <sup>Cre/+</sup> , LSL-Kras <sup>G12D/+</sup> , Trp53 <sup>FL/FL</sup>	Isoliert von AG Saur,

Zelllinie	Genotyp	Hersteller
		München

**Tabelle 2-14: Reagenzien and Kits für die Zellkultur**

Reagenz/Kit	Hersteller
Blasticidin S HCl in 10 mg/ml in 20mM HEPES	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM) mit L-glutamine	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphategepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
G418, Geneticin®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-Glutamine 200 mM (100X)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Lipofectamin 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MEM nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Natriumpyruvat MEM 100 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PEI (Polyethylenimin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin (10000 units/ml)-streptomycin (10000 µg/ml) Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Puromycindihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TGFβ, human, rekombinant	Peptotech, Hamburg
Trypsin, 0.05% mit 0.53 mM EDTA 4Na	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zeocin™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

**Tabelle 2-15: Medien für die Zellkultur**

Medium	Zusammensetzung
Tumorzell Medium	D-MEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin
O-Medium	D-MEM 1% Penicillin-Streptomycin
HEK-Medium	D-MEM 10% FCS



<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
	1% Penicillin-Streptomycin
	1% L-Glutamin
	1% Natriumpyruvat MEM
	1% MEM nicht essentielle Aminosäuren
	500 µg/ml Geneticin
Einfrriermedium	70% D-MEM
	20% FCS
	10% DMSO

---

## 3 Methoden

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Methoden gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 DNA Analyse

##### 3.1.1.1 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Kommerziell erworbene Hitzeschock-kompetente Bakterien (s. 2-7) wurden transformiert.

Um KCM-kompetente Bakterien herzustellen, wurde zunächst ein Ausstrich einer vorhandenen Kultur auf einer Agarplatte angefertigt. Davon wurde eine einzelne Kolonie entnommen und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Davon wurden 4 ml entnommen und damit 250 ml LB-Medium beimpft und nochmals 1-2 h bei 37°C inkubiert, bis eine OD von 0,3-0,6, welche der logarithmischen Wachstumsphase entspricht, erreicht wurde. Sodann wurden die Bakterien 10 min bei 1000g und 4°C abzentrifugiert, um dann in 25 ml TSB-Puffer resuspendiert zu werden. Nach Aliquotierung wurden die Bakterien in N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die KCM-kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. In der Zwischenzeit wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 20 µl KCM-Puffer mit 200-500 ng der DNA von Interesse gemischt und die Menge mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf eine Gesamtmenge von 100 µl aufgefüllt. Dazu wurden 100 µl der kompetenten Bakterien gegeben und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und auf Eis für 20 min inkubiert. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT wurde 1 ml S.O.C.-Medium hinzugefügt und das Reaktionsgefäß 50 min bei 37°C (Top10) oder 2 h bei 25°C (Stbl3) horizontal geschüttelt, um die Expression des Resistenzgens sicherzustellen. Die Bakteriensuspension wurde danach auf mehreren, mit entsprechendem Antibiotikum (100µg/ml) versetzten, Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C bzw. 25°C inkubiert.

Der Bakterienstamm Stbl3 wurde bei besonders großen, wie den lentiviralen Plasmiden verwendet, da hier die Rekombinationsrate geringer ist.

##### 3.1.1.2 Isolation von Plasmid DNA und Ansetzen einer Dauerkultur

Um Plasmid DNA zu gewinnen, wurden einzelstehende Kolonien der Bakterien, in die das Plasmid von Interesse transformiert worden ist, von der Agarplatte aufgenommen und in 5 ml

---

Selektions LB-Medium etwa 16 h bei 37°C oder etwa 36 h bei 25°C bis zu einer OD von 1 in einem Schüttler inkubiert. Die weitere Isolation der DNA mittels alkalischer Lyse erfolgte mit den Kits QIAprep® spin miniprep. Für die Isolation größerer DNA-Mengen wurden 50 ml LB-Medium beimpft und die Präparation mit dem QIAfilter™ plasmid midi Kit durchgeführt. Für die Isolation von Plasmiden, welcher einer Transfektion zugeführt werden sollten, wurden entweder eine Isolation aus 50 ml LB-Medium mit dem EndoFree® plasmid midi Kit oder aus 250 ml LB-Medium mit dem EndoFree® plasmid maxi Kit durchgeführt. Die DNA Konzentration wurde mit dem Spektrophotometer NanoDrop bestimmt. Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden 750 µl Bakterien vor der Präparation abgenommen und mit 750 µl Glycerol gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Konzentration und Aufreinigung der DNA wurde eine Ethanolpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurde zum Isolat 1/10 des Volumens Natriumacetat (3M, pH 5,2) und das 3-fache des neuen Volumens 100% Ethanol hinzugegeben und für 2 h bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde bei 4°C mit 15000 g für 30 min abzentrifugiert, dann zwei mal mit 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Resuspension im gewünschten Medium wurde die DNA bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

### **3.1.1.3 Klonierungen**

#### **3.1.1.3.1 DNA-Spaltung mithilfe von Restriktionsendonukleasen**

Um DNA-Fragmente für Klonierungen zu generieren oder um positive Klone nach einer Ligation zu identifizieren, wurden Plasmide mit Restriktionsenzymen gemäß den Angaben des Herstellers (s. 2-3) verdaut. Hierbei wurden für analytische Verdau Ansätze mit einer DNA-Menge von bis zu 1 µg und Enzymmengen von 2 U in einem Reaktionsvolumen von 20 µl hergestellt und je nach Aktivität des Enzyms 1-3 h bei gegebener Temperatur inkubiert. Der Erfolg wurde mittels Gelelektrophorese (s. 3.1.1.8) überprüft.

Präparative Ansätze wurden mit bis zu 20 µg DNA und bis zu 5 U Enzymen 2-12 h verdaut. Bei bekannter Sternaktivität der Enzyme wurde die o.g. Enzymmengen halbiert.

Bei Doppelverdau mit Enzymen, die in gleichen Puffern ausreichend Aktivität zeigten, wurden die Enzyme simultan eingesetzt. Ansonsten wurde der Verdau zweizeitig durchgeführt, wobei an erster Stelle der Verdau im Niedrigsalzpuffer durchgeführt wurde. Bei Enzymen, die ihre Aktivitätsmaxima bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten, wurde zuerst mit dem Enzym mit geringeren Aktivitätsmaximum verdaut und dann das zweite Enzym hinzugegeben und bei entsprechender Temperatur inkubiert.

Sollte bei Doppelverdau o.g. Vorgehen nicht möglich gewesen sein, wurde die DNA

---

zwischen den Schritten mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt.

#### **3.1.1.3.2 Herstellung glatter DNA-Enden**

Prinzipiell wurde die gerichtete Ligation mit überhängenden Enden bevorzugt. In Fällen, in denen dies nicht möglich war, wurden, nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen, die Überhänge der DNA-Fragmente entfernt. Hierzu wurde das Quick Blunting™ Kit in einem 25 µl fassenden Ansatz eingesetzt.

#### **3.1.1.3.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Bei Bedarf wurde der linearisierte Zielvektor dephosphoryliert, um ihn für das Insert empfänglich zu machen. Hierfür wurde in einem 25 µl-Ansatz 1U rAPid alkalische Phosphatase mit dazugehörigem rAR-Puffer verwendet.

#### **3.1.1.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten und Screening**

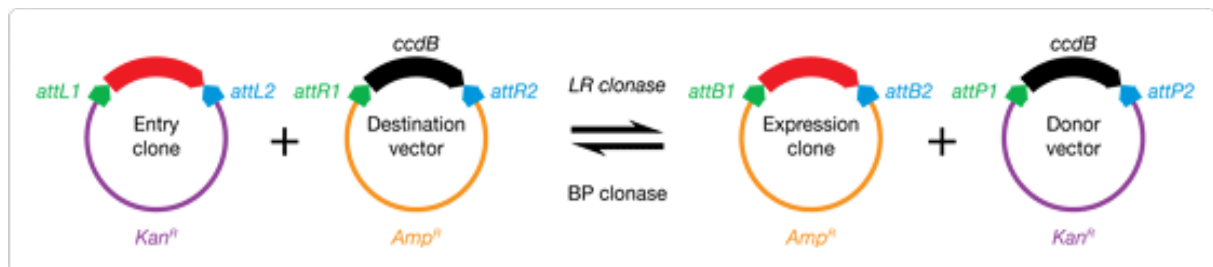
Zu ligierende DNA-Fragmente wurden im Verhältnis 90:30 fM (Insert:Vektor) mit T4 DNA-Ligase in 20 µl Gesamtvolumen für 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit der Hälfte des Ligationsansatzes eine Transformation in kompetente Bakterien durchgeführt (s. 3.1.1.1).

Um positive Klone zu finden, wurden bis zu 96 Einzelkolonien mit autoklavierten Zahnstochern gepickt, auf separaten Agarplatten ausgestrichen und mit dem Zahnstocher dann Bakterien in ein PCR Reaktionsgefäß gebracht, in welchem selbige mit 50 µl H<sub>2</sub>O bei 95°C für 5 min in einem Thermozykler aufgeschlossen wurden. Ein Screening jedes gepickten Klons wurde mittels PCR (s. 3.1.1.7) durchgeführt. Hierbei wurden 5 µl der aufgeschlossenen Bakterien und spezifische Screeningprimer (s. 2-9) verwendet. Die Primer wurden so erstellt, dass nur bei Insertion in richtiger Richtung ein PCR-Produkt entstehen konnte. Bei grenzwertig positiver PCR wurde, um unnötige Isolation von Plasmiden zu vermeiden, eine Negativ-PCR durchgeführt, die bei Religationen ein kleines PCR-Produkt (200-300 bp) und bei erfolgter Insertion des Gens ein um die Gengröße verlängertes PCR-Produkt zeigte. Aus der Zusammenschau beider PCRs ließ sich mit großer Sicherheit eine Auswahl wahrscheinlich positiver Klone treffen. Bei bis zu 3 positiven Kolonien wurden dann die Plasmide mittels alkalischer Lyse isoliert (s. 3.1.1.2) und bis zu zwei Kontrollverdau mit etwa 1 µg DNA durchgeführt (s. 3.1.1.3.1).

#### **3.1.1.3.5 Das Gateway® LR-System und die Clonasereaktion**

Das Gateway® LR-System von Invitrogen ist ein sehr effizientes System, um ein Gen von Interesse samt Expressionsmarkern in verschiedene Plasmide zu klonieren. Voraussetzung

hierfür ist, dass Ausgangs- und Zielvektor homologe Regionen vorweisen, sogenannte Att-sides. Gene von Interesse, die einmal in einen Entryvektor mit Att-L-sides kloniert wurden, können mit einer einfachen und zuverlässigen Clonasereaktion unter Zuhilfenahme von Gateway® LR Clonase™-Enzymmix, einer Mischung verschiedener Rekombinasen, der ebenfalls von Invitrogen zur Verfügung gestellt wird, in diverse verschiedenen Zielvektoren mit Att-R-sides kloniert werden.



**Abb. 3.1: Prinzip der Clonase-Reaktion**

Das Gen von Interesse wurde mittels homologer Rekombination in den Zielvektor verbracht. Alle Vektoren, die am Ende der Reaktion ohne das Gen von Interesse sind, enthalten entsprechend die *ccdB*-Todeskassette.

Um den Zielvektor trotz *ccdB*-Todeskassette anzuzüchten, wurden die *ccdB*-resistenten Library Efficacy® DB3.1 verwendet, zur Anzucht nach der Reaktion nicht-resistente One Shot® Stbl3™. (Invitrogen, Karlsruhe)

Die Durchführung dieser Klonasereaktion erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Da die *ccdB*-Todeskassette das Anwachsen negativer Klone fast vollständig verhindert, wurde auf ein PCR-Screening verzichtet und die Plasmide von bis zu drei Kolonien direkt isoliert (s. 3.1.1.2), verdaut (s.3.1.1.3.1) und der Analyse mittels Gelelektrophorese zugeführt (s.3.1.1.8).

#### 3.1.1.4 DNA-Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen zur Verifizierung der Basenabfolge wurden von GATC Biotech AG, Konstanz durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software Chromas lite.

#### 3.1.1.5 Generierung von sh-Sequenzen

Zur Herstellung valider sh-Sequenzen wurde primär die Literatur über das Portal US National Library of Medicine und des National Institutes of Health, PubMed, nach publizierten, effizienten sh- oder si-Sequenzen durchsucht. Bei Genen ohne entsprechende Publikationen fand das von Invitrogen zur Herstellung von si-Sequenzen zur Verfügung gestellte Werkzeug "BLOCK-iT™ RNAi Designer" Anwendung. Die Sequenzen wurden dann in eine Oligonukleotisstruktur (s. 4.2) eingebettet, die ein effizientes Klonieren in den Vektor pENTR-pSupr.Puromycin zuließ (s. 4.2), in lyophilisierter Form bestellt und gemäß 3.1.1.6

aneinandergelagert.

### 3.1.1.6 Aneinanderlagerung von Oligonukleotiden

Die komplementären Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 3 µg/µl verdünnt und dann jeweils 1 µl jeden Stranges mit 20x Aneinanderlagerungspuffer und destilliertem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl in ein PCR Reaktionsgefäß gebracht. Alsdann wurde der Ansatz in einem Thermozykler auf 95°C erhitzt und in 1°C-Schritten auf 24°C abgekühlt. Bis 65°C wurden dabei 2 min pro Schritt eingehalten, danach 1 min. Bis zur Weiterverwendung wurden die aneinandergelagerten Oligonukleotide bei 4°C gelagert.

### 3.1.1.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Screening-PCRs zur Identifizierung positiver Klone wurden mit REDTaq® ReadyMix™ durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen sind 3-1 zu entnehmen.

Die Aneinanderlagerungstemperaturen wurden nach Beschaffenheit der Primer gewählt. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben bei 4°C gelagert oder direkt der Analyse mittels Gelelektrophorese (s. 3.1.1.8) zugeführt.

**Tabelle 3-1: Reaktionsansatz und Bedingungen für eine Screening-PCR**

Reaktionsansatz		Bedingungen		
12,5 µl	REDTaq® ReadyMix™	95°C	3 min	40x
0,7 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)	95°C	45 sec	
0,7 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)	53°C - 66°C	1 min	
xxx µl	DNA (20 ng)	72°C	1 min, 30 sec	
auf 25 µl	H <sub>2</sub> O	72°C	5 min	

Die PCR-Amplifikation von Genen zur Klonierung erfolgte mit PfuUltra™ high fidelity DNA Polymerase, welche eine Korrekturlesefunktion hat (sog. proof-reading), um eine absolut präzise Wiedergabe der Basenabfolge bei der PCR zu erreichen. Die Reaktionsbedingungen finden sich in 3-2.

**Tabelle 3-2: Reaktionsansatz und Bedingungen für eine PCR mit PfuUltra™**

Reaktionsansatz		Bedingungen		
5 µl	10x PfuUltra PCR Puffer	95°C	3 min	18x
1 µl	dNTP Mix, je 10mM	95°C	30 sec	
2 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)	58°C	30 sec	
2 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)	72°C	1 min 30 sec	

Reaktionsansatz		Bedingungen	
1.5 µl	PfuUltra™ high fidelity DNA Polymerase	72°C	5 min
1 µl	Plasmid (100 ng/µl)		
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O		

### 3.1.1.8 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurden analytische Gelelektrophoresen durchgeführt. Hierbei wurde ein, je nach erwarteter Größe der Fragmente 0,8% - 2%iges Agarosegel gegossen. Als Laufpuffer diente TAE. Um die Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde auf 400 ml Gelvolumen 24 µl 0,1% Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Die aufgetragene DNA Menge variierte je nach erwartetem Bandenmuster. Bei PCRs, die nicht mit REDTaq® ReadyMix™ durchgeführt worden sind oder bei Auftragen eines Verdau wurde der Probe Orange G als Ladepuffer hinzugefügt. Je nach Zweck und Bandengröße wurde eine Spannung von 20-110 V angelegt und nach Auftrennung der Banden mit Gel Doc™ XR+ System dokumentiert, die Auswertung der Bilder erfolgte mit der kostenlosen Software Qunatity One; beides von BioRad, Hercules, USA.

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Gel und zur Weiterverwendung dieser im Rahmen von Klonierungen wurde GelStar® als Ladepuffer verwendet. Des weiteren wurde auf die Anwendung von UV-Licht verzichtet und stattdessen das Gel auf dem Flu-o-blu mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Isolation aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick® gel extraction Kit.

### 3.1.2 RNA Analyse

#### 3.1.2.1 RNA Isolation and cDNA Synthese

Die RNA Gewinnung aus Zellen erfolgte aus Zellschalen mit eine Durchmesser von 10 cm, bei einer Zelldichte von 80%. Dass Zellkulturmedium wurde durch 600µl RLT-Puffer mit 1% 2-Mercaptoethanol ersetzt, die Zelllysate von der Schale gekrazt und bei -80°C gelagert.

Isolation von RNA aus dem Zelllysate erfolgte mit Hilfe von QIAshredder-Säulchen und dem RNeasy mini Kit. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration- und reinheit wurde NanoDrop 1000 verwendet.

Die Synthese von cDNA erfolgte durch die Verwendung der Reagenzien von TaqMan® reverse transcription. Für die Produktion von 50µl cDNA wurde 1µg RNA eingesetzt. Die

---

Bestimmung der cDNA-Konzentration erfolgte mit NanoDrop 1000.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Die Zellkulturmedien können 2-15 entnommen werden. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Bei 80%-iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert, nach spätestens 48h mit frischem Medium versorgt. Zum Umsetzen und Aussäen der Zellen wurden selbige mit PBS gewaschen, trypsinisiert und mit frischem, vorgewärmtem Medium in eine neue Schale gegeben. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit einer Neubauerzählkammer.

Zellen, welche zur Kryokonservierung bestimmt waren, wurden nach Trypsinierung in Tumorzell-Medium aufgenommen, 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert, das Pellet in kaltem Einfriermedium aufgenommen und in CryoPure Gefäße aliquotiert. Die Lagerung erfolgte 24h bei -80°C, danach wurden die Zellen zeitlich unbegrenzt in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 3.2.2 Stimulation von murinen PDAC-Zellen mit TGF-β

Die PDAC-Zellen wurden in normalem Tumorzellmedium gezogen und dann dünn in 12x 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach etwa 24h, wenn die Schalen eine 50%-ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das Tumorzellmedium durch 0-Medium ersetzt. Nach genau 24h wurde bei der Hälfte der Schalen 10 ng/ml TGF-β, gelöst in 10nM Zitronensäure und 2mg/ml BSA, hinzugegeben. Die sechs Kontrollschalen wurden nur mit der Trägerlösung aus Zitronensäure und BSA behandelt. Nach einer, zwei, sechs und 24h wurde RNA von den Zellen asserviert. Nach 72h wurde die Zellmorphologie dokumentiert, RNA und Protein wurden geerntet.

### 3.2.3 Transfektion von HEK-Zellen und Generierung lentiviralen Überstandes mit PEI

Am Tag vor der Transfektion wurden 3,5x10<sup>6</sup> HEK-293-FT-Zellen, maximal der sechsten Passage, in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Als Medium wurde normales Tumorzellmedium ohne Zusatz von Antibiotika gewählt.

**Tabelle 3-3: Transfektionsbedingungen**

Reaktionsansatz mit 2. Generation Verpackungsvektoren		Bedingungen
4,9 µg	Expressionsvektor	Zugabe von 25 µl PEI
3,6 µg	PsPAX2	vortexen



Reaktionsansatz mit 2. Generation Verpackungsvektoren		Bedingungen	
1,5 µg	PmD2.G	Inkubation	15 min
ad 500 µl	DMEM ohne Serum, ohne Antibiotika	Tropfenweise auf HEK-Zellen geben	
Reaktionsansatz mit 3. Generation Verpackungsvektoren		Bedingungen	
4,5 µg	Expressionsvektor	Zugabe von 25 µl PEI	
1,1 µg	pIP1	Vortexen	
2,8 µg	pIP2	Inkubation	15 min
1,6 µg	PmD2.G	Tropfenweise auf HEK-Zellen geben	
ad 500 µl	DMEM ohne Serum, ohne Antibiotika		

Die Transfektionsansätze können 3-3 entnommen werden. Am nächsten Morgen wurde das Transfektionsmedium durch 6 ml neues Tumorzellmedium ohne Antibiotika ersetzt. Nach weiteren 24h wurde der virushaltige Überstand abgenommen, 5 min. bei RT und 3000rpm zentrifugiert und anschließend durch 0,45 µm Filter steril filtriert. Dieser Überstand konnte nun direkt zur Transduktion (s. 3.2.5) verwendet werden oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die Ernte des Virusüberstandes kann am vierten und fünften Tag wiederholt werden. Bei guter Viabilität der HEK-Zellen kann die erste Ernte auch erst nach 48h erfolgen, um eine höhere Viruskonzentration im Überstand zu garantieren. (Wirth *et al.* 2011, Tiscornia *et al.* 2006, Kutner *et al.* 2009)

#### 3.2.4 Transfektion von HEK-Zellen mit Lipofectamin2000

Die Transfektion mit Lipofectamin2000 wurde gemäß der Angaben von Invitrogen, Karlsruhe mit den in 3-3 angegebenen Plasmidmengen durchgeführt.

#### 3.2.5 Transduktion von Tumorzellen

Zu transduzierende Tumorzellen wurden am vorigen Tag passagiert. Die Transduktion selbst erfolgte mit  $2 \times 10^5$  Zellen, welche in 1 ml Virusüberstand aufgenommen und in ein Well einer 6-Well-Platte ausgesät wurden. Zusätzlich wurde Polybrene mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml hinzugegeben. Nach 6-8h wurde 1 ml Tumorzellmedium ohne Antibiotika zugefügt und am nächsten Morgen das gesamte Transduktionsgemisch durch Tumorzellmedium ersetzt. 48-72h nach Transduktion konnte nach den entsprechenden Merkmalen selektioniert werden. (Wirth *et al.* 2011, Tiscornia *et al.* 2006, Kutner *et al.* 2009)

---

### **3.2.6 Selektion von Tumorzellen mit Chemotherapeutika**

Die Selektion von transduzierten Tumorzellen mit Puromycin, Blasticidin und Zeocin erfolgte nach Erstellen einer Todeskurve für jedes Chemotherapeutikum für jede der verwendeten Zelllinien. Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in jedes Well einer 6-Well-Platte ausgesät und zum Tumorzellmedium Chemotherapeutika in unterschiedlicher Konzentration gemäß den Angaben der Hersteller zugegeben. Das Medium inklusive der Selektiva wurde alle zwei Tage gewechselt. Zur Selektion nach Transduktion wurde die minimale Konzentration gewählt, unter der noch alle Tumorzellen im Vorversuch zugrunde gingen.

### **3.2.7 Fotodokumentation der Zellmorphologie**

Die Aufnahme von Zellen erfolgte bei 200-facher Vergrößerung. Zur Auswertung der Bilder wurde die kostenfreie Software AxioVision Rel. 4.8 von Carl Zeiss AG, Jena genutzt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung lentiviraler Vektoren zur Überexpression eines Gens von Interesse

In dieser Arbeit wurden Expressionsvektoren kloniert, welche eine permanente Überexpression bzw. einen permanenten *knockdown* eines Zielgens ermöglichen.

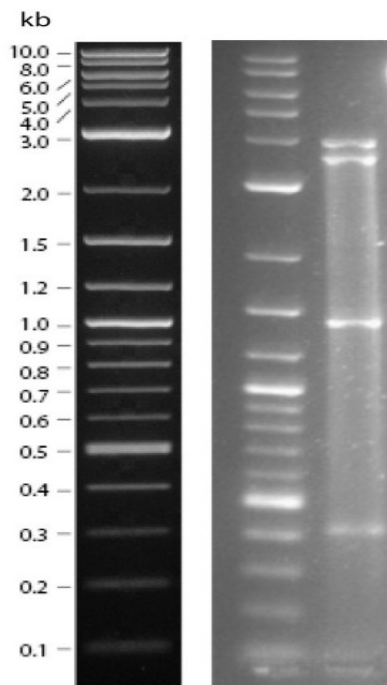
Die Expressionsvektoren wurden so kloniert, dass prinzipiell auch Mehrfachtransduktionen in eine Zelllinie möglich sind. Die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen soll dann mit unterschiedlichen Fluoreszenzen und Resistenzen möglich sein. Hierzu mussten die Gene von Interesse zunächst in einen Entr-Vektor mit einem entsprechenden Fluoreszenzgen (pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed mit rot fluoreszierendem Protein, pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP mit grün fluoreszierendem Protein) oder Puromycinresistenz (pENTR-MCS-IRES-Puromycin) kloniert werden. Anschließend erfolgte die Klonierung des Gens sowie der Selektionsmarker in einen lentiviralen Expressionsvektor. Welches Gen mit welchen Markern assoziiert ist, ist Tabelle 4-1 zu entnehmen. Die wichtigsten Plasmidkarten sind im Anhang zu finden.

**Tabelle 4-1: Übersicht Expressionsvektoren.**

Gen	Expressionsvektor	Fluoreszenz	Resistenzen
Anxa10	pLenti6.2/V5-DEST	dsRed	Blasticidinresistenz
Anxa13	pLenti4/V5-DEST	EGFP	Zeocinresistenz
Bgn	pLenti6.2/V5-DEST	dsRed	Blasticidinresistenz
Cd34	pLenti6.2/V5-DEST	dsRed	Blasticidinresistenz
Ddr2	pLenti4/V5-DEST	dsRed	Zeocinresistenz
Fgfr1	pLenti6.2/V5-DEST	EGFP	Blasticidinresistenz
Hnf4a	pLenti6.2/V5-DEST	-	Blasticidinresistenz Puromycinresistenz
Mmp2	pLenti6.2/V5-DEST	-	Blasticidinresistenz Puromycinresistenz
Pcdh19	pLenti6.2/V5-DEST	-	Blasticidinresistenz Puromycinresistenz
Rbp4	pLenti6.2/V5-DEST	EGFP	Blasticidinresistenz
Snai2	pLenti6.2/V5-DEST	EGFP	Blasticidinresistenz
Sox2	pLenti4/V5-DEST	dsRed	Zeocinresistenz
Sparc	pLenti4/V5-DEST	dsRed	Zeocinresistenz
Tgfbr3	pLenti4/V5-DEST	EGFP	Zeocinresistenz
Tspan8	pLenti6.2/V5-DEST	-	Blasticidinresistenz Puromycinresistenz

Gen	Expressionsvektor	Fluoreszenz	Resistenzen
Wnt7a	pLenti4/V5-DEST	-	Zeocinresistenz Puromycinresistenz
Zeb2	pLenti4/V5-DEST	-	Zeocinresistenz Puromycinresistenz
Kontrolle-dsRed	pLenti6.2/V5-DEST	dsRed	Blasticidinresistenz
Kontrolle-EGFP	pLenti6.2/V5-DEST	EGFP	Blasticidinresistenz
Kontrolle-Puro	pLenti6.2/V5-DEST	-	Blasticidinresistenz Puromycinresistenz

#### 4.1.1 Klonierungsstrategie von Anxa10

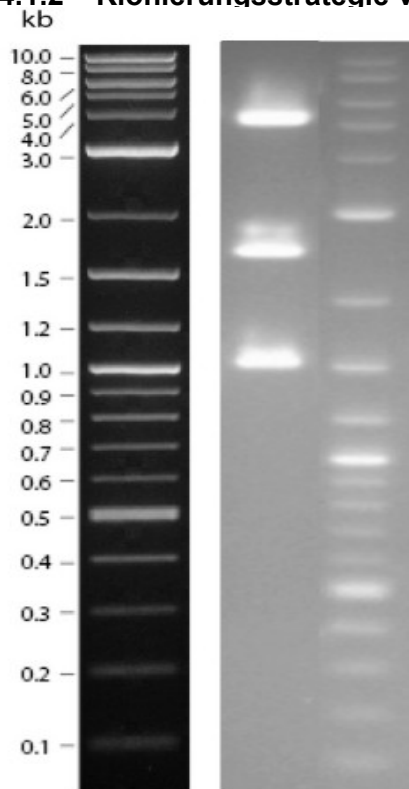


**Abb. 4.1: Kontrollverdau von Anxa10 in pLenti6.2:**

Nach erfolgreicher Insertion der cDNA von Anxa10 sowie des Selektionsmarkers dsRed in den Expressionsvektor pLenti6.2 entstehen im Kontrollverdau mit AflII vier DNA-Fragmente mit einer Größe von 4029; 3624; 1427 und 417 bp.

Die für Anxa10 codierende cDNA wurde von ImaGenes im Vektor pCR4-Topo bezogen. Aus diesem Vektor wurde das Gen mit der Restriktionsendonuklease EcoRI ausgeschnitten. Da pCR4-Topo sowohl Kanamycin-, als auch Ampicillinresistenz besitzt, ein Resistenzwechsel zum neuen Vektor also ausschied, wurde das Fragment mit der Länge von 1116 bp mittels Geleluatation extrahiert. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed wurde ebenfalls mit EcoRI geöffnet, dann dephosphoryliert und das DNA-Fragment, welches die cDNA enthielt, ungerichtet einkloniert. Eine Selektion der in Leserichtung einklonierten cDNA erfolgte mittels PCR (s. 3.1.1.3.4). Anschließend wurden die DNA von Interesse und der Selektionsmarker dsRed mit Hilfe der Clonasereaktion (s. 3.1.1.3.5) aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST gebracht.

#### 4.1.2 Klonierungsstrategie von Anxa13

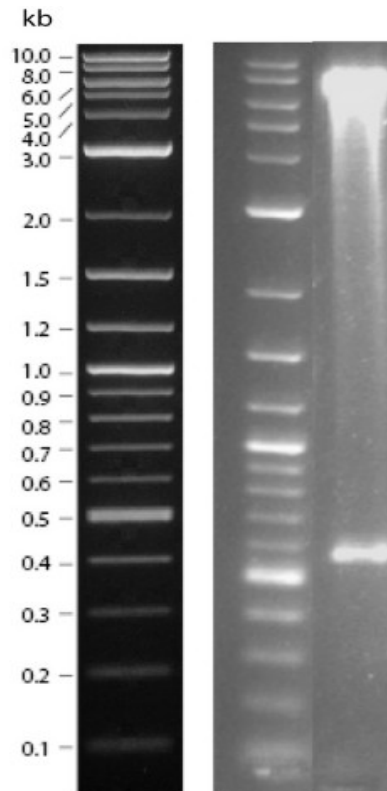


**Abb. 4.2: Kontrollverdau von Anxa13 in pLenti4:**

Zur Kontrolle der erfolgreichen Insertion der cDNA von ANxa13 und dem Selektionsmarker EGFP in den Zielvektor pLenti4, erfolgt ein Kontrollverdau mit NotI. Hierbei entstehen drei Fragmente mit den Längen 5391; 2468 und 1548 bp

Die für das Gen Anxa13 codierende cDNA wurde im Vektor pCMV-Sport6 geliert. Zum Ausschneiden des Gens wurde ein Ansatz mit den Restriktionsendonukleasen Bsu36I, NcoI und NsiI verdaut und das Insert mit einer Größe von 983 bp mittels Gelelektion isoliert. Anschließend wurden die Überhänge der Schnittstellen entfernt. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP wurde mit PmeI geöffnet. Die hierbei entstehenden glatten Enden wurden dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte ungerichtet. Zur Selektion positiver Klone wurden zwei PCRs durchgeführt (s. 3.1.1.3.4). Anschließend wurden das Gen und der Selektionsmarker EGFP mit Hilfe der Clonasereaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST kloniert.

### 4.1.3 Klonierungsstrategie von Bgn

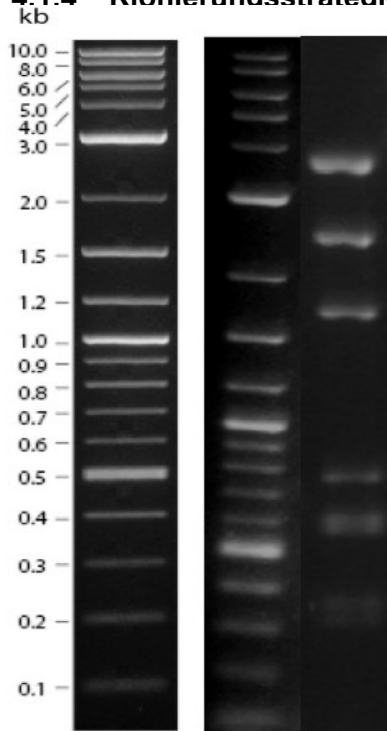


**Abb. 4.3: Kontrollverdau von Bgn in pLenti6.2:**

Der erfolgreiche Transfer der cDNA von Bgn und des Selektionsmarkers dsRed in den Expressionsvektor pLenti6.2 wird mittels Kontrollverdau mit Bsu36I verifiziert. Es entstehen ein 9011 und ein 617 bp langes Fragment.

Die Lieferung der kodierenden DNA von Bgn erfolgte im Vektor pCMV-Sport6. Zum Ausschneiden des Gens wurde ein Ansatz mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und PvuII verdaut und das DNA-Fragment mit einer Größe von 1238 bp mittels Gelelektrophorese isoliert. Anschließend wurden die Überhänge der Schnittstellen entfernt. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed wurde mit SmaI geöffnet. Die hierbei entstehenden glatten Enden wurden dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte ungerichtet. Die Selektion positiver Klone erfolgte mittels PCR (s. 3.1.1.3.4). Anschließend wurden das Gen und der Selektionsmarker dsRed mit Hilfe der Clonase-reaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST überführt.

#### 4.1.4 Klonierungsstrategie von Cd34

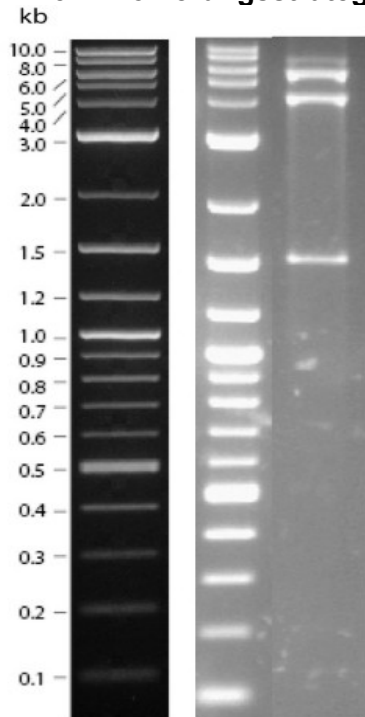


Die cDNA-Sequenz des Gens von Cd34 wurde von ImaGenes im Vektor pCMV-Sport6 geliefert. Das Gen wurde mit den Enzymen XmnI und SmaI aus dem Vektor ausgeschnitten und der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed mit der Restriktionsendonuklease SmaI geöffnet. Das gewünschte Fragment mit 1348 bp Länge wurde aus einem Gel eluiert und ungerichtet, mit stumpfen Enden in den dephosphorylierten Entr-Vektor ligiert. In den Ligationsansatz wurde SmaI gegeben, um eine Religation des Entr-Vektors zu vermeiden. Zur Selektion positiver Klone wurden zwei PCRs durchgeführt. Anschließend wurden das Gen und der Selektionsmarker dsRed mit Hilfe der Clonasereaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST eingebracht.

#### Abb. 4.4: Kontrollverdau von CD34 in pLenti4:

Der Kontrollverdau des Expressionsvektors mit HindIII illustriert den erfolgreichen Transfer der cDNA von Cd34 und dsRed in pLenti4. Es entstehen Fragmente mit den Längen 3344; 2260; 1599; 734; 584; 556; 353 und 321 bp.

#### 4.1.5 Klonierungsstrategie von Ddr2

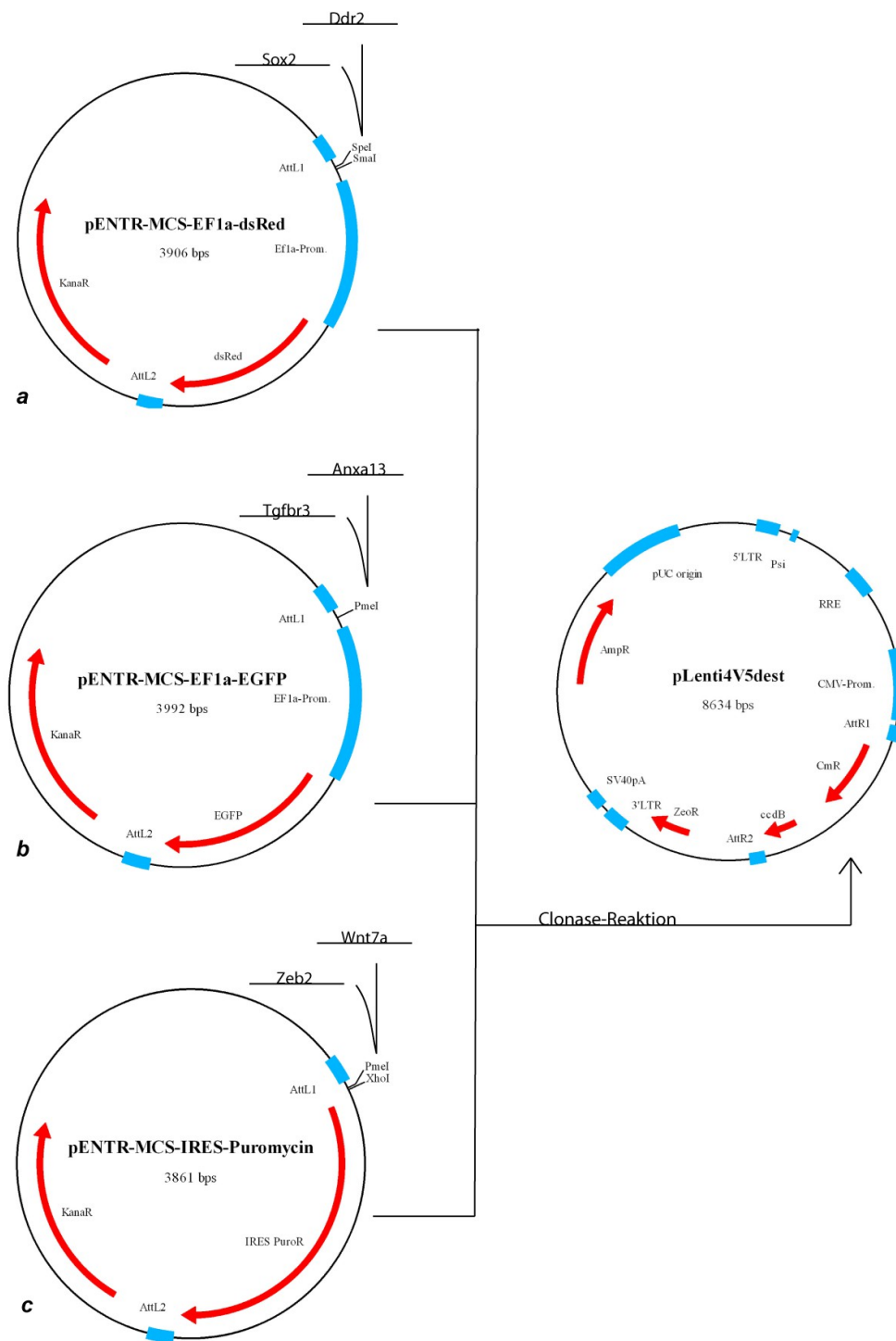


Die kodierende Sequenz von Ddr2 wurde im Vektor pCR4-TOPO geliefert. Die cDNA wurde mit PstI und EcoRI ausgeschnitten und mittels Geleluatation isoliert. Die Enden des 2673 bp langen Fragments wurde geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed wurde mit Spe I geöffnet, ebenfalls geglättet und dann dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte ungerichtet, zur Selektion positiver Klone wurden zwei PCRs durchgeführt. Aus einem positiven Klon wurden die Sequenzen von Ddr2 und des Selektionsmarkers dsRed mit Hilfe der Clonasereaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST gebracht.

#### Abb. 4.5: Kontrollverdau von Ddr2 in pLenti4:

Die erfolgreiche Einklonierung der cDNA von Ddr2 und dsRed wird mittels Kontrollverdau mit NotI bestätigt. Die entstehenden Basenfragmente sind 5391; 4075 und 1548 bp lang.

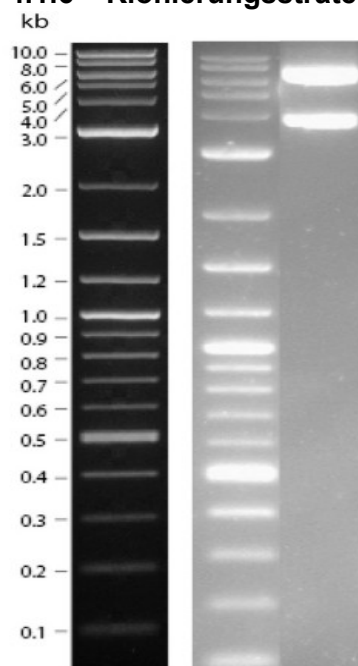




**Abb. 4.6: Übersicht über die Klonierungsstrategien mit dem Zielvektor pLenti4V5dest:**

- a) Zeigt die Strategie für Ddr2 und Sox2: Über den Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1α-dsRed wird die Sequenz per Clonasereaktion in pLenti4V5dest übertragen.
- b) Zeigt die Strategie für Anxa13 und Tgfr3: Über den Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1α-EGFP wird die Sequenz per Clonasereaktion in pLenti4V5dest übertragen.
- c) Zeigt die Strategie für Wnt7a und Zeb2: Über den Entr-Vektor pENTR-MCS-IRES-Puromycin wird die Sequenz per Clonasereaktion in pLenti4V5dest übertragen.

#### 4.1.6 Klonierungsstrategie von Fgfr1

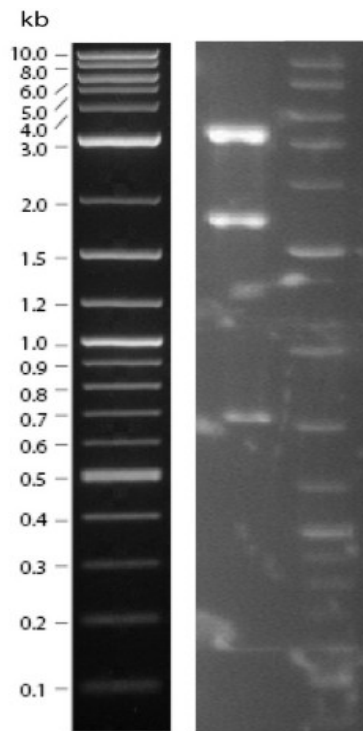


Die cDNA von Fgfr1 wurde bei ImaGenes im Vektor pCMV-SPORT6 erworben. Die 2352 bp lange Sequenz wurde mit EcoNI und AflIII ausgeschnitten, aus einem Gel eluiert und die Schnittstellen geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP wurde mit Pmel linearisiert. Die Ligation erfolgte nicht gerichtet, so dass zur Selektion positiver Klone zwei *screening*-PCRs durchgeführt wurden. In den Ligationsansatz wurde 1U Pmel gegeben, um Religationsereignisse zu minimieren. Anschließend wurden das Gen und der Selektionsmarker EGFP mit Hilfe der Clonasereaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST kloniert.

#### Abb. 4.7: Kontrollverdau von Fgfr1 in pLenti6.2:

Nach Einklonieren der cDNA von Fgfr1 und EGFR in den Expressionsvektor pLenti6.2 entstehen im Kontrollverdau mit Sac II ein 6967 und ein 3864 bp langes DNA-Fragment.

#### 4.1.7 Klonierungsstrategie von Hnf4a

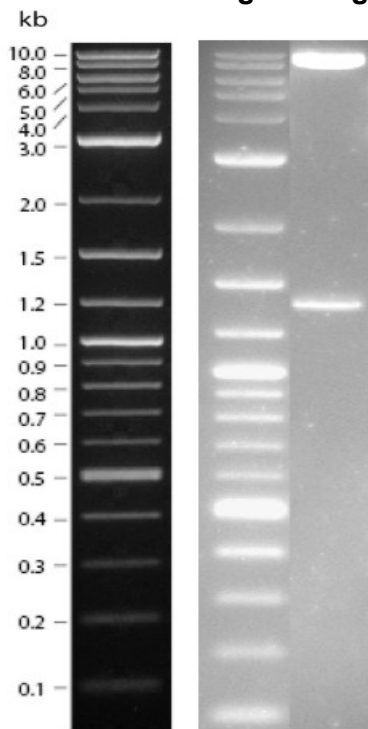


**Abb. 4.8: Kontrollverdau von Hnf4a in pLenti6.2:**

Die erfolgreiche Insertion von kodierender DNA von Hnf4a und der Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti6.2 wird mittels Kontrollverdau mit NotI illustriert. Die Basenfragmente haben eine Länge von 5444; 3395 und 1548 bp.

Die kodierende DNA von Hnf4a wurde im Vektor pCMV-SPORT6 geliefert. Aus diesem wurde die 2041 bp fassende Sequenz mit Bsu36I und EcoRV ausgeschnitten, mittels Gelelektion aufgereinigt und ihre Enden dann geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-IRES-Puromycin wurde mit PmeI geöffnet und anschließend dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte ungerichtet, zum Ligationsansatz wurde PmeI hinzugegeben, um Religanden wieder zu öffnen. Zum Auffinden positiver Klone wurden zwei Such-PCRs durchgeführt. Zuletzt wurden via Clonase-Reaktion das Gen und die Puromycinresistenz aus pENTR-MCS-IRES-Puromycin in den lentiviralen Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST gebracht.

#### 4.1.8 Klonierungsstrategie von Mmp2

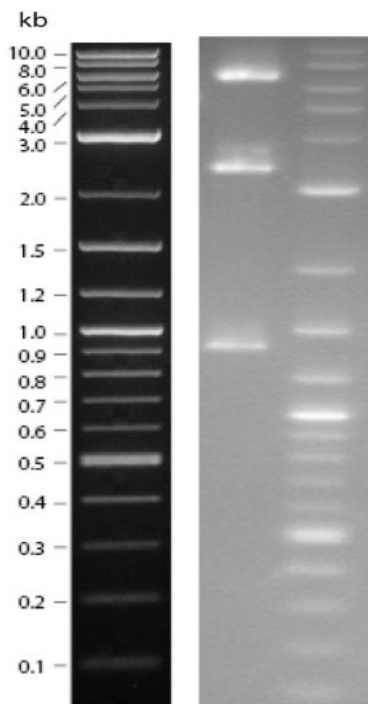


Die cDNA von Mmp2 wurde im Vektor pYX-Asc geliefert und mittels HincII und Bsu36I ausgeschnitten, anschließend geleluert und auf eine Gesamtlänge von 2113 bp geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-IRES-Puromycin wurde mit PmeI geöffnet und dephosphoryliert, das Einfügen der Gensequenz erfolgte ungerichtet, weshalb Screening-PCRs durchgeführt wurden, um positive Klone zu identifizieren. Die Anzahl der Religanden wurde durch die Zugabe von PmeI in den Ligationsansatz reduziert. Im Anschluss wurden per Clonasereaktion die Sequenzen von Mmp2 und Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST überführt.

#### Abb. 4.9: Kontrollverdau von Mmp2 in pLenti6.2:

Der Nachweis eines erfolgreichen Transfers der Sequenzen von Mmp2 und Puromycinresistenz in den Zielvektor pLenti6.2 wird mittels Verdau mit XhoI geführt. Es entstehen zwei Basenfragmente mit einer Länge von 9126 und 1339 bp.

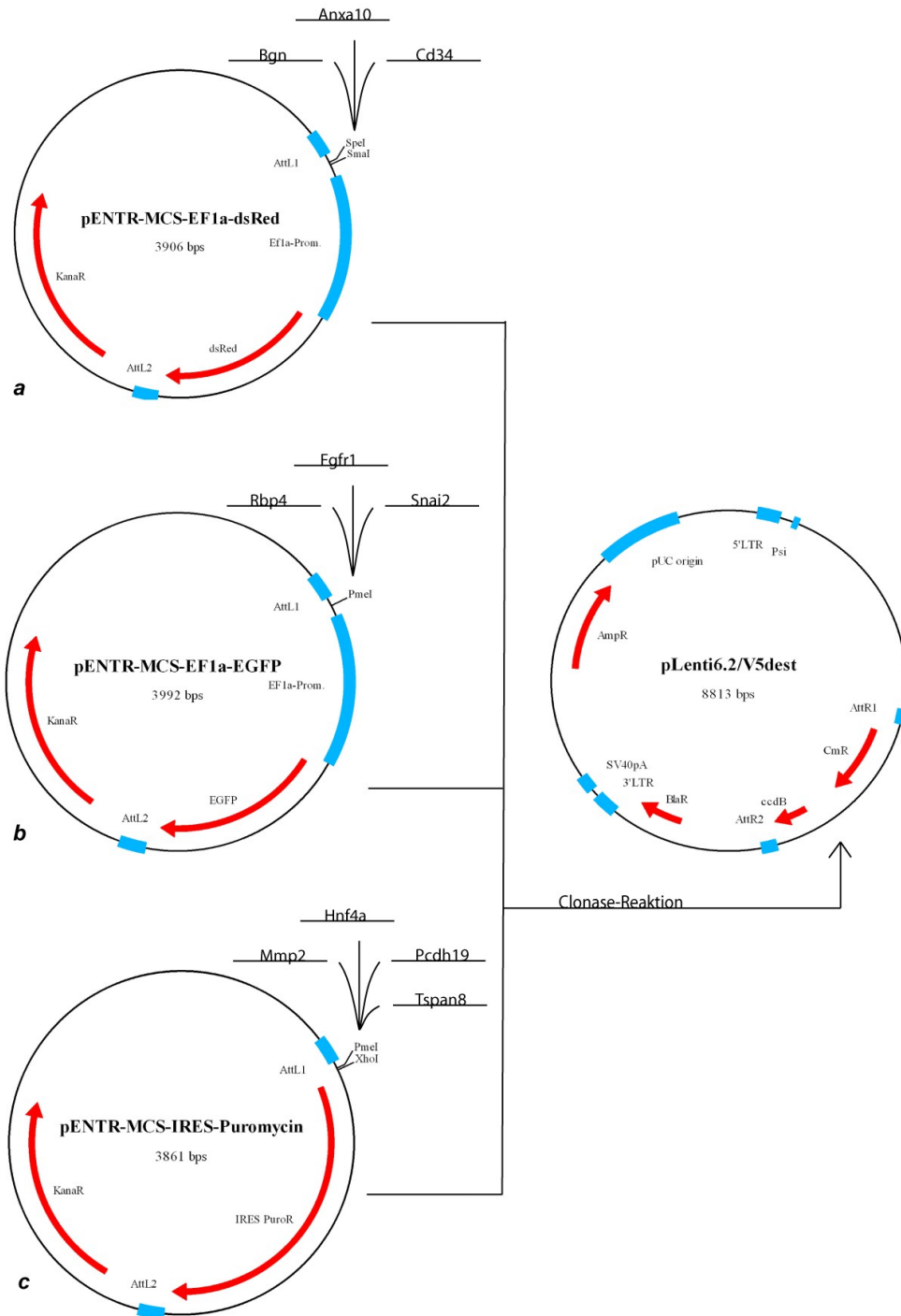
#### 4.1.9 Klonierungsstrategie von Pcdh19



**Abb. 4.10: Kontrollverdau von Pcdh19 in pLenti4:**

Bei erfolgreicher Einklonierung der Sequenzen von Pcdh19 und der Puromycinresistenz, entstehen beim Kontrollverdau mit EcoRV DNA-Fragmente mit einer Länge von 6974; 3337 und 1362 bp.

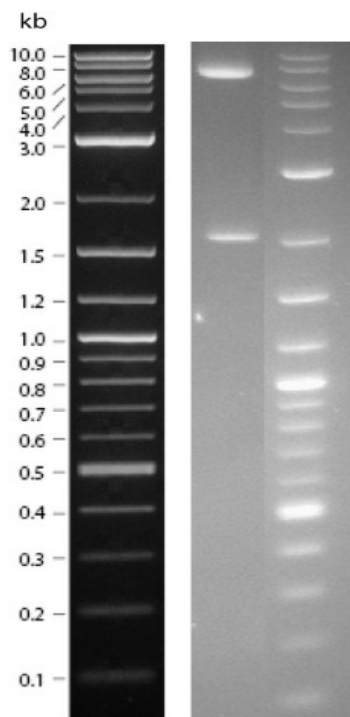
Pcdh19 wurde mittels PCR aus einem cDNA-Isolat einer Zelllinie mit bekannt hoher Expression von Pcdh19 amplifiziert und dann gemäß den Angaben von Invitrogen ungerichtet in den Vektor pCR®4Blunt-TOPO® ligiert. Die Primersequenzen können Tabelle 2-10 entnommen werden. Sie wurden so gewählt, dass am PCR-Produkt stumpfe Enden entstanden. Nach Verifizierung der korrekten Basenabfolge durch Sequenzierung, wurde die Gensequenz mit PmeI und NotI mit einem glatten und einem überhängenden Ende ausgeschnitten und mittels Geleluatation isoliert. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-IRES-Puromycin wurde ebenfalls mit o.g. Restriktionsendonukleasen geöffnet, überzählige DNA-Fragmente mittels Säulenaufreinigung entfernt, die Enden dephosphoryliert und die 3454 bp lange Gensequenz gerichtet einligiert. Nach erfolgreichem PCR-Screening wurden per Clonasereaktion Gen und Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST überführt.



**Abb. 4.11: Übersicht über die Klonierungsstrategien mit dem Zielvektor pLenti6.2V5dest:**

- a) Zeigt die Strategie für Anxa10, Bgn und Cd34: Über den Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed wird die Sequenz per Clonasereaktion in pLenti6.2V5dest übertragen.
- b) Zeigt die Strategie für Egfr1, Rbp4 und Snai2: Über den Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP wird die Sequenz per Clonasereaktion in pLenti6.2V5dest übertragen.
- c) Zeigt die Strategie für Hnf4a, Mmp2, Pcdh19 und Tspan8: Über den Entr-Vektor pENTR-MCS-IRES-Puromycin wird die Sequenz per Clonasereaktion in pLenti6.2V5dest übertragen.

#### 4.1.10 Klonierungsstrategie von Rbp4

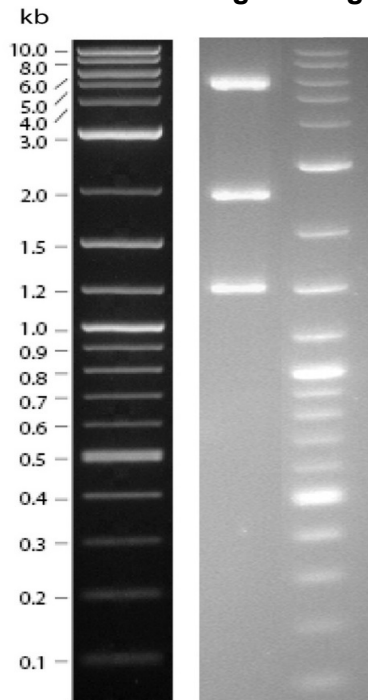


Die kodierende Sequenz von Rbp4 wurde mittels PCR aus einem cDNA-Isolat einer Zelllinie mit bekannt hoher Expression von Rbp4 amplifiziert. Die Primersequenzen können Tabelle 2-10 entnommen werden und wurden so gewählt, dass das Amplifikat mit *SpeI* verdaut werden konnte und entsprechende Überhänge entstehen. Das 620 bp große Amplifikat wurde nach Eröffnung des Entr-Vektors pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP mit *SpeI* und Dephosphorylierung desselben ungerichtet einkloniert. Die Verifizierung der korrekten Basenabfolge erfolgte mittels Sequenzierung im Entr-Vektor. Anschließend wurden per Clonasereaktion Gen und Selektionsmarker EGFP in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST überführt.

**Abb. 4.12: Kontrollverdau von Rbp4 in pLenti6.2:**

Eine erfolgreiche Einklonierung der kodierenden Sequenzen von Rbp4 und dem Selektionsmarker EGFP erfolgt mittels Kontrollverdau mit *SacI*. Es entstehen DNA-Fragmente mit einer Länge von 6967 und 2128 bp.

#### 4.1.11 Klonierungsstrategie von Snai2



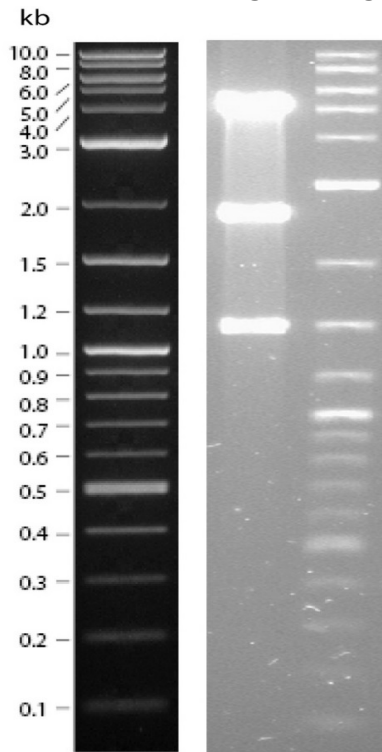
Die cDNA von Snai2 wurde von ImaGenes im Vektor pCMV-SPORT6.1 geliefert. Die cDNA-Sequenz wurde mit Hilfe von BsaBI und SmaI auf einer Länge von 1266 bp bereits mit stumpfen Enden herausgeschnitten und anschließend aus einem Agarosegel isoliert. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP wurde mit PmeI linearisiert, dephosphoryliert und die Sequenz von Snai2 dann ungerichtet hineinligiert. Zur Reduktion von Religanden wurde in den Ligationsansatz PmeI hinzugegeben. Durch zwei Screening-PCRs wurden die positiven Klone identifiziert. Danach wurden das Gen und der Selektionsmarker EGFP mit Hilfe der Clonase-Reaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST kloniert.

**Abb. 4.13: Kontrollverdau von Snai2 in pLenti6.2:**

Der erfolgreiche Transfer der kodierenden DA von Snai2 und EGFR in den Zielvektor pLenti6.2 wird mittels Kontrollverdau mit NotI bestätigt. Es entstehen 5444; 2754 und 1548 bp lange DNA-Fragmente.



#### 4.1.12 Klonierungsstrategie von Sox2

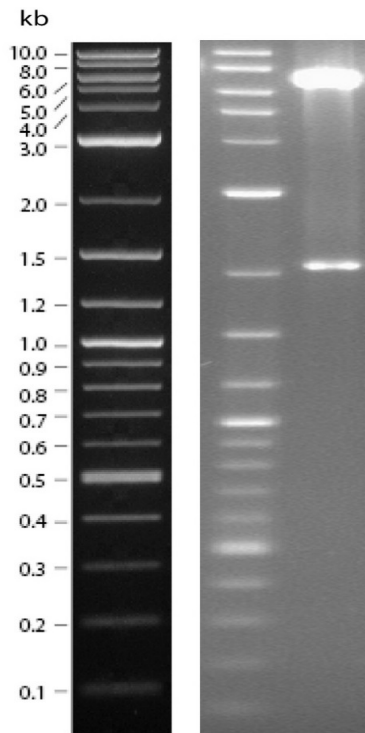


Die kodierende Gensequenz von Sox2 wurde im Vektor pYX-Asc geliefert. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NotI und BglI wurde die Sequenz ausgeschnitten und mittels Geleluatation aufgereinigt. Anschließend wurden die Schnittstellen des 1173 bp großen Fragments geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed wurde mit SmaI geöffnet und anschließend dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte ungerichtet, weswegen zwei PCRs zur Identifikation positiver Klone durchgeführt wurden. Zuletzt wurden das Gen und der Selektionsmarker dsRed mit Hilfe der Clonasereaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST transferiert.

**Abb. 4.14: Kontrollverdau von Sox2 in pLenti4:**

Nach Einklonierung der Sequenzen von Sox2 und dem Selektionsmarker dsRed in den Expressionsvektor pLenti4 finden sich im Kontrollverdau mit NotI Fragmente mit einer Länge von 5391; 2571 und 1548 bp.

#### 4.1.13 Klonierungsstrategie von SPARC

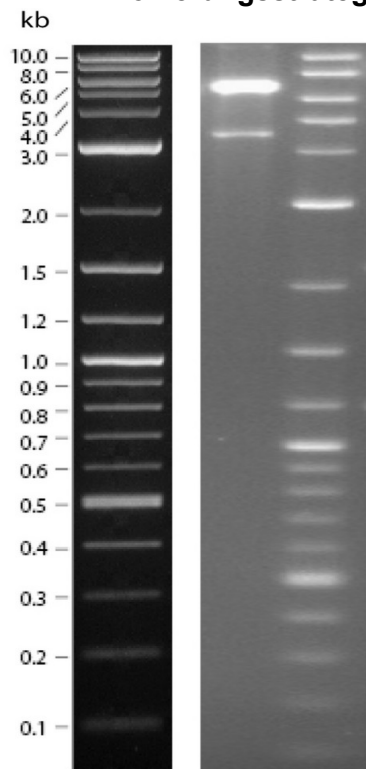


Die kodierende Sequenz von SPARC wurde von ImaGenes im Vektor pCMV-SPORT6 geliefert. Aus diesem wurde das Gen mit den Restriktionsendonukleasen Sall und PstI ausgeschnitten, mit Hilfe einer Geleluatation wurde das 1014 bp umfassende Fragment aufgereinigt und dann die Enden geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed wurde mit SmaI geöffnet und anschließend dephosphoryliert. Die Ligation, in deren Ansatz 1U SmaI zur Reduktion der Religationsereignisse gegeben wurde, erfolgte ungerichtet, so dass zwei PCRs zur Suche nach positiven Klonen durchgeführt wurden. Anschließend wurden das Gen und der Selektionsmarker dsRed mit Hilfe der Clonasereaktion aus dem Entr-Vektor in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST kloniert.

**Abb. 4.15: Kontrollverdau von SPARC in pLenti4:**

Nach erfolgreichem Transfer der cDNA von SPARC und dsRed, entstehen im Kontrollverdau mit PstI DNA-Fragmente mit Längen von 7296 und 2059 bp.

#### 4.1.14 Klonierungsstrategie von Tgfbr3

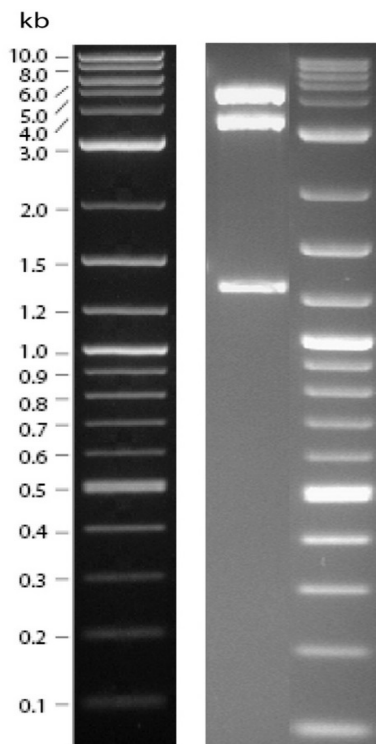


Die kodierende Sequenz von Tgfbr3 wurde im Vektor pYX-Asc geliefert und mit Hilfe von NotI und NdeI ausgeschnitten. Anschließend wurde eine Geleluatation durchgeführt, um das 3005 bp große DNA-Fragment zu isolieren. Anschließend wurden die Überhänge der Schnittstellen entfernt. Mit der Restriktionsendonuklease PmeI wurde der Entr-Vektor pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die Ligation erfolgte bei Anwesenheit von PmeI, um das Auftreten von Religanden zu minimieren und ungerichtet, weswegen PCRs zur Suche von positiven Klonen durchgeführt wurden. Dann wurde mittels Clonase-Reaktion das Gen samt Selektionsmarker dsRed in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST überführt.

#### Abb. 4.16: Kontrollverdau von Tgfbr3 in pLenti4:

Die erfolgreiche Einklonierung der Sequenzen von Tgfbr3 und EGFP wird mittels Kontrollverdau mit SacII bestätigt. Dabei entstehen zwei 6914 und 4516 bp lange Fragmente.

#### 4.1.15 Klonierungsstrategie von Tspan8

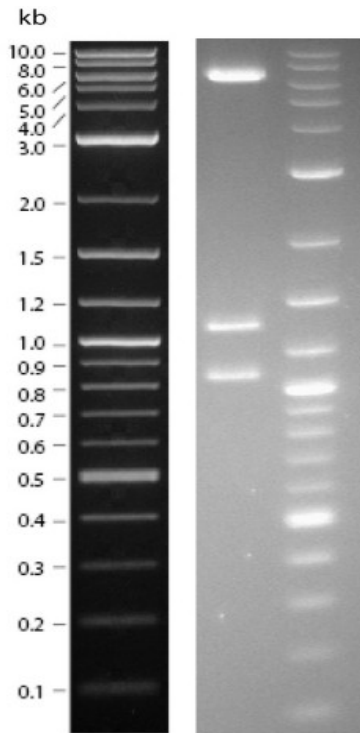


Die kodierende Sequenz von Tspan8 wurde mittels PCR aus einem cDNA-Isolat einer Zelllinie mit bekannt hoher Expression von Tspan8 amplifiziert. Die Primersequenzen können Tabelle 2-10 entnommen werden und wurden so gewählt, dass das Amplifikat danach mit der Restriktionsendonuklease XhoI verdaut werden konnte und entsprechende Überhänge entstehen. Das 725 bp große Amplifikat wurde nach Eröffnung des Entr-Vektors pENTR-MCS-IRES-Puromycin mit XhoI und Dephosphorylierung ungerichtet einkloniert. Die Verifizierung der korrekten Basenabfolge erfolgte mittels Sequenzierung im Entr-Vektor. Anschließend wurden per Clonasereaktion Gen und Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti6.2/V5-DEST überführt.

**Abb. 4.17: Kontrollverdau von Tspan8 in pLenti6.2:**

Die Bestätigung einer korrekten Überführung der kodierenden Sequenzen für Tspan8 und die Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti6 erfolgt mittels Kontrollverdau mit ApaLI. Es entstehen Fragmente mit einer Länge von 4491; 3344 und 1246 bp.

#### 4.1.16 Klonierungsstrategie von Wnt7a

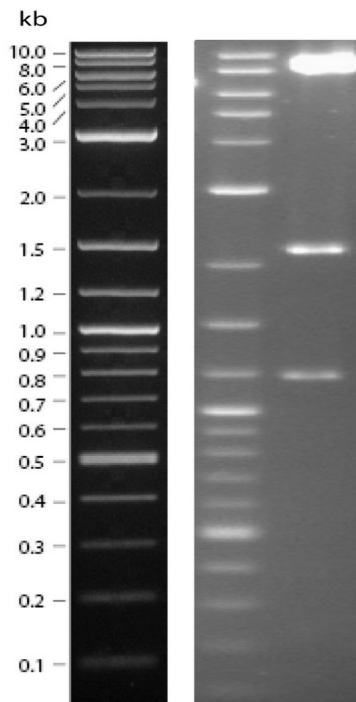


Die kodierende Sequenz von Wnt7a wurde mittels PCR aus einem cDNA-Isolat einer Zelllinie mit bekannt hoher Expression von Wnt7a amplifiziert. Die Primersequenzen können Tabelle 2-10 entnommen werden und wurden so gewählt, dass das Amplifikat danach mit der Restriktionsendonuklease XhoI verdaut werden konnte und entsprechende Überhänge entstanden. Das 1066 bp große Amplifikat wurde nach Eröffnung des Entr-Vektors pENTR-MCS-IRES-Puromycin mit XhoI und Dephosphorylierung ungerichtet einkloniert. Die Verifizierung der Basenabfolge erfolgte mittels Sequenzierung im Entr-Vektor. Anschließend wurden per Clonasereaktion Gen und Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST überführt.

**Abb. 4.18: Kontrollverdau von Wnt7a in pLenti4:**

Eine erfolgreiche Einklonierung der kodierenden Sequenzen von Wnt7a und der Puromycinresistenz in den Zielvektor pLenti4 wird mittels Kontrollverdau mit XhoI illustriert. Es entstehen Fragmente mit 6957; 1339 und 1062 bp Länge.

#### 4.1.17 Klonierungsstrategie von Zeb2

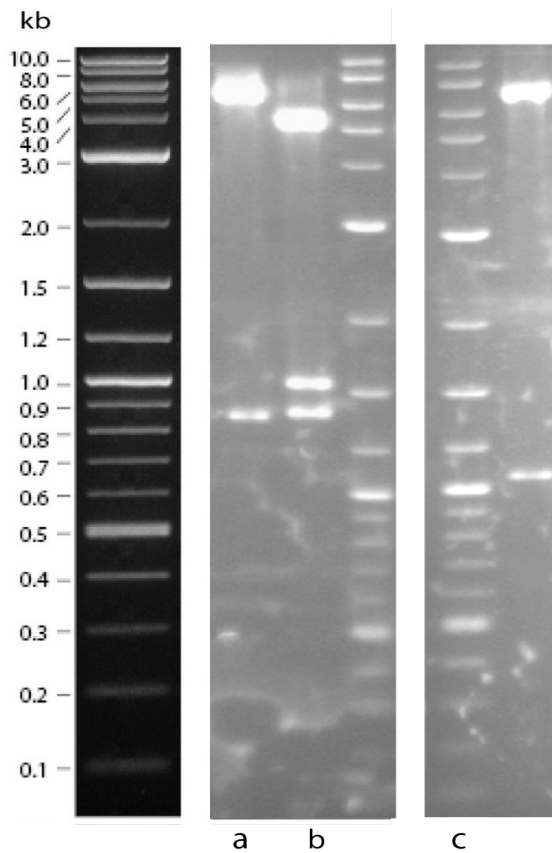


**Abb. 4.19: Kontrollverdau von Zeb2 in pLenti4:**

Nach erfolgreicher Einklonierung der Sequenzen für Zeb2 und die Puromycinresistenz in den Zielvektor pLenti4 finden sich im Kontrollverdau mit PspOml Fragmente mit 8992; 2145 und 1172 bp Länge.

Die cDNA-Sequenz von Zeb2 wurde im Vektor pYX-Asc geliefert. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen Sall und BsaAI wurde die entsprechende Sequenz ausgeschnitten, aus einem Agarosegel eluiert und anschließend die Enden auf eine Gesamtlänge von 4013 bp geglättet. Der Entr-Vektor pENTR-MCS-IRES-Puromycin wurde mit PmeI geöffnet und dann dephosphoryliert. In den Ligationsansatz wurde PmeI hinzugefügt, um die Rate an Religationen zu senken. Die Einklonierung erfolgte ungerichtet, weswegen zwei Screening-PCRs durchgeführt wurden. Zuletzt wurden per Clonase-reaktion Gen und Puromycinresistenz in den Expressionsvektor pLenti4/V5-DEST überführt.

#### 4.1.18 Klonierungsstrategie der Kontrollvektoren



Als Kontrollvektoren für die Überexpressionsexperimente dienten Expressionsvektoren, in die per Clonasereaktion die leeren pEntr-Kassetten einkloniert wurden. Diese enthielten lediglich den entsprechenden Selektionsmarker und dazugehörigen Promotor, aber keine kodierende Sequenz für ein Gen.

**Abb. 4.20: Kontrollverdau von Kontrolle EGFP (a), Puro (b) und dsRed (c):**

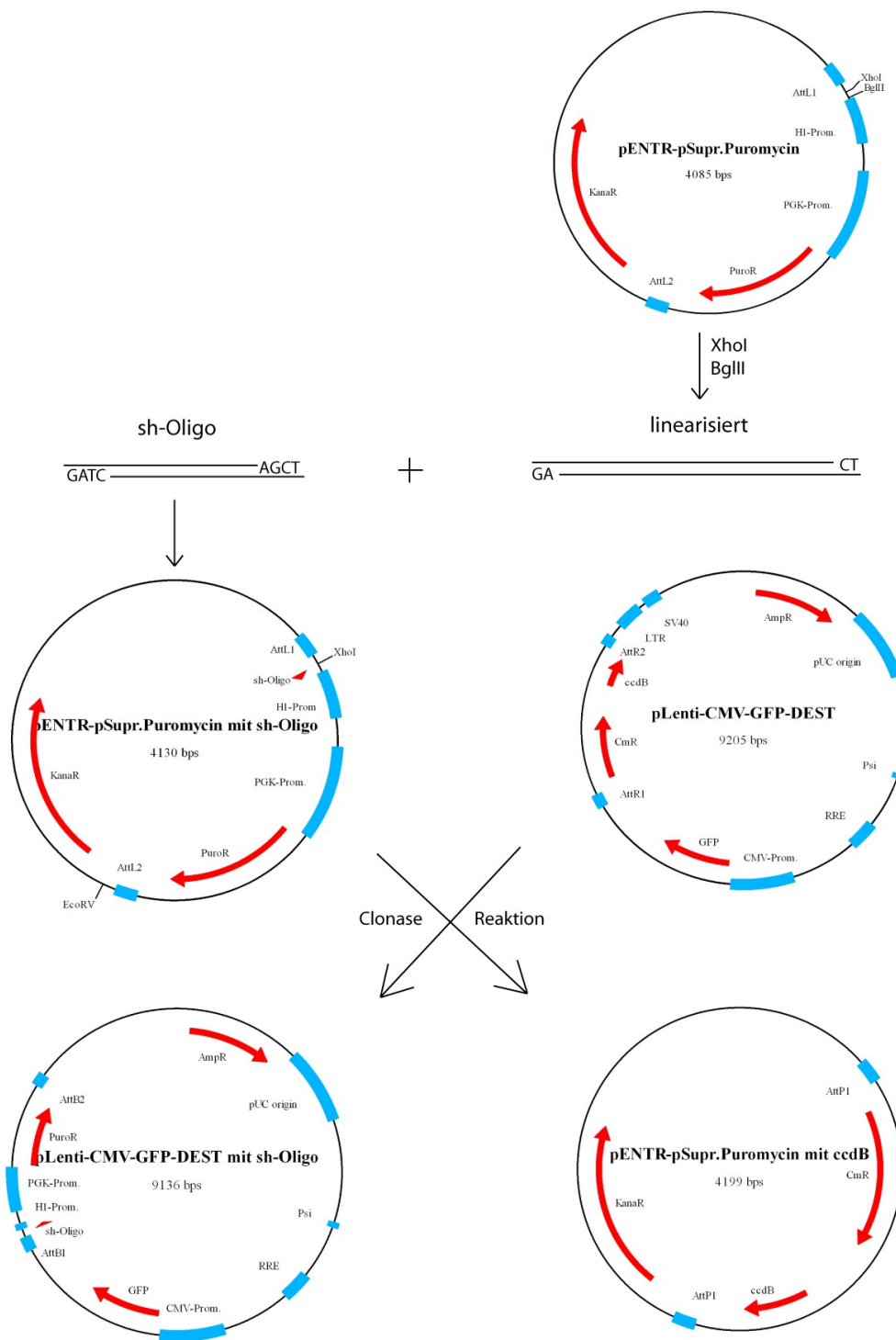
a) Nach erfolgreicher Überführung der pEntr-Kassette finden sich im Kontrollverdau mit SacII DNA-Fragmente mit einer Länge von 7067 und 1413 bp.

b) Nach erfolgreicher Überführung der pEntr-Kassette finden sich im Kontrollverdau mit NotI DNA-Fragmente mit einer Länge von 5444; 1548 und 1357 bp

c) Nach erfolgreicher Überführung der pEntr-Kassette finden sich im Kontrollverdau mit PstI Fragmente mit 7349 und 1045 bp Länge.

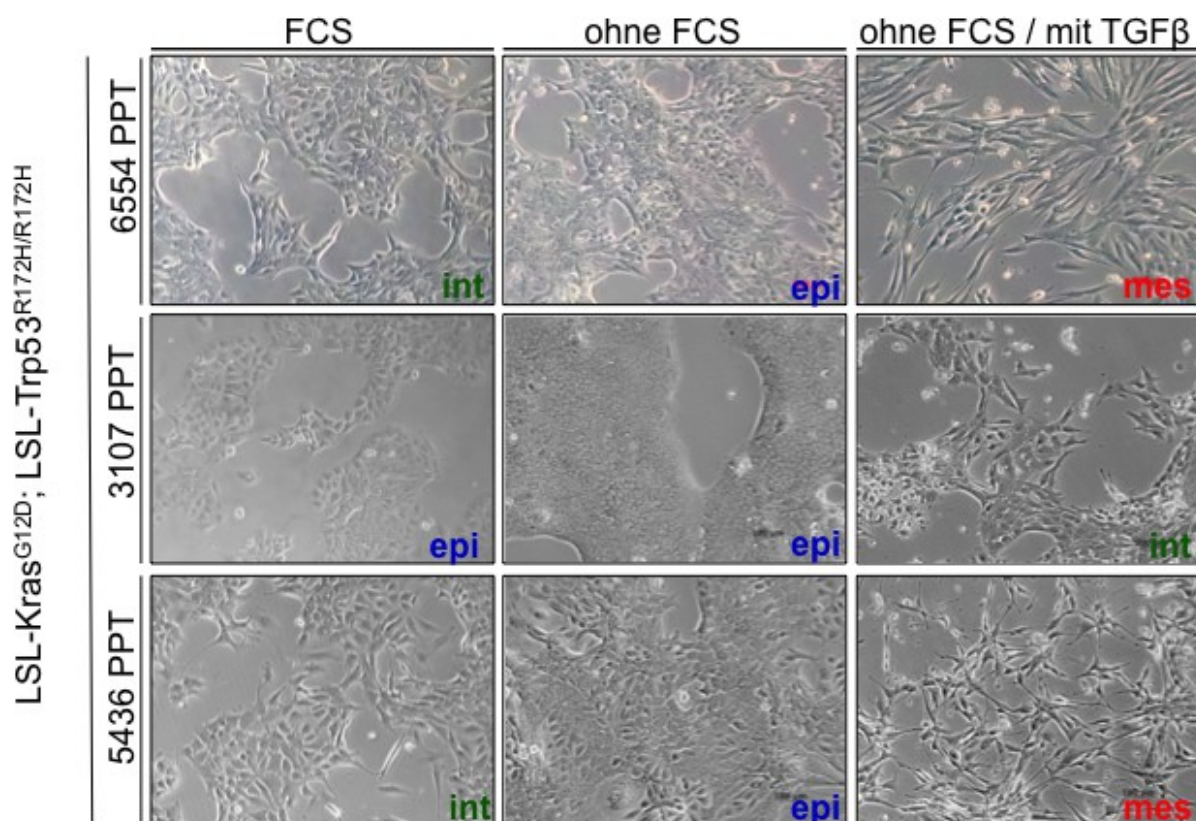






**Abb. 4.22: Übersicht über die Herstellung von Vektoren, die sh-RNA-Sequenzen exprimieren:** Der linearisierte pENTR-Vektor wird mit dem sh-Oligonukleotid aneinandergelagert. In der nachfolgenden Clonasereaktion wird das Insert mit sh-Sequenz und Selektionsmarkern in den Zielvektor übertragen.

### 4.3 TGF- $\beta$ -Stimulation muriner PDAC-Zellen induziert EMT



**Abb. 4.23: Morphologische Änderungen unter TGF- $\beta$ -Stimulation:**

Pankreatisch duktales Maustumorzellen mit intermediärem oder epithelialem Phänotyp und LSL-Kras<sup>G12D</sup>; LSL-Trp53<sup>R172H/R172H</sup>-Genotyp sind in der linken Spalte in normalem Tumorzellmedium zu sehen. In 0-Medium (mittlere Spalte) zeigen alle Zelllinien bereits nach 24h einen Wechsel zu einer eher epithelialen Konformation. 72h nach Stimulation der Zellen mit TGF- $\beta$  haben die Zellen bereits eine EMT durchlaufen. (epi = epithelial; int = intermediär; mes = mesenchymal)

Murine PDAC-Zellen mit epithelialem oder intermediärem Phänotyp durchlaufen unter TGF- $\beta$ -Stimulation eine EMT. Um die Einflüsse anderer Wachstumsfaktoren und Hormone auszuschalten, wurden die Zellen in 0-Medium gehalten. Hierunter konnte vor allem bei Zellen mit intermediärem Phänotyp zunächst eine stärkere Ausprägung der epithelialen Morphologie beobachtet werden, aber auch epitheliale Zellpopulationen fielen durch eine noch stärkere Ausprägung epithelialer Morphologie auf. Unter TGF- $\beta$ -Einfluss haben sich alle untersuchten Zelllinien zu einem mesenchymalen oder mesenchymal-intermediärem Phänotyp verändert.

Die Negativkontrollen (nicht gezeigt) wiesen im 0-Medium ebenfalls einen Wechsel zu einem epithelialen Phänotyp auf – dieser änderte sich aber unter Zugabe der Kontrolllösung ohne TGF- $\beta$  nicht. Der in diesem Teil der Arbeit erreichte morphologische Wechsel soll als Beispiel für eine vollständig durchlaufene EMT zur Beurteilung der Überexpressionsexperimente dienen.

---

#### 4.4 Überexpression von EMT-assoziierten Genen

Die Überexpressionsversuche von EMT-assoziierten Genen erfolgten in Zelllinien des jeweils anderen Phänotyps. Epitheliale Marker wurden demnach in 16992 PPT und 5320 PPT, mesenchymale Marker in 53631 PPT und 5193 PPT transduziert. In dieser Versuchsreihe wurden Aussagen darüber erwartet, ob die Überexpression eines Gens eine Veränderung des Phänotyps mit sich bringen und eine Schlüsselrolle dieses Gens in der EMT-Induktion suggerieren könnte.

Die Versuche mit Genen, die mit den Selektionsmarkern dsRed und EGFP in einem Expressionsvektor eingebettet waren, zeigten keine Überexpression des Zielgens nach Transduktion. Nach Transfektion der Plasmide in HEK-Zellen zeigten sich diese schon mit einer stark verminderten Viabilität mit massivem Absterben der Zellen, so dass eine unzureichende Virusproduktion als Ursache des ausbleibenden Transduktionserfolgs ursächlich sein dürfte. Auch eine Justierung verschiedener Versuchsparameter, wie Plasmidkonzentration und Verhältnis der Plasmidmengen zueinander sowie die Menge des Transfektionsagens führten diese Versuchsreihe nicht zum Erfolg. Mit dem Überstand der wenig viablen HEK-Zellen transduzierte Tumorzellen zeigten keine Fluoreszenz und starben nach Selektion mit Blasticidin bzw. Zeocin rasch ab. Die Konstrukte selbst können als funktionsfähig angesehen werden, da die HEK-Zellen nach Transfektion ausgeprägte Fluoreszenz zeigten. Wiederholte Kontrollversuche zeigten stets die erwarteten Fragmentgrößen.

Bei den Plasmiden, die eine Puromycin-Resistenz unter einer promotorfreien IRES-Expression hatten und nicht mit Fluoreszenz-Proteinen ausgestattet waren, konnte für das Gen Wnt7a eine puromycinresistente Zelllinie aus dem Tumor 5320 PPT erzeugt werden, bei der allerdings kein signifikanter Wechsel in der Morphologie zu beobachten war. Auch das leere Kontrollplasmid zeigte in einer Zelllinie eine puromycinresistente Zellreihe, allerdings hier aus dem Tumor 16992, so dass ein direkter Vergleich mit dem Wnt7a-Klon nicht möglich ist.

#### 4.5 Knockdown von EMT-assoziierten Genen

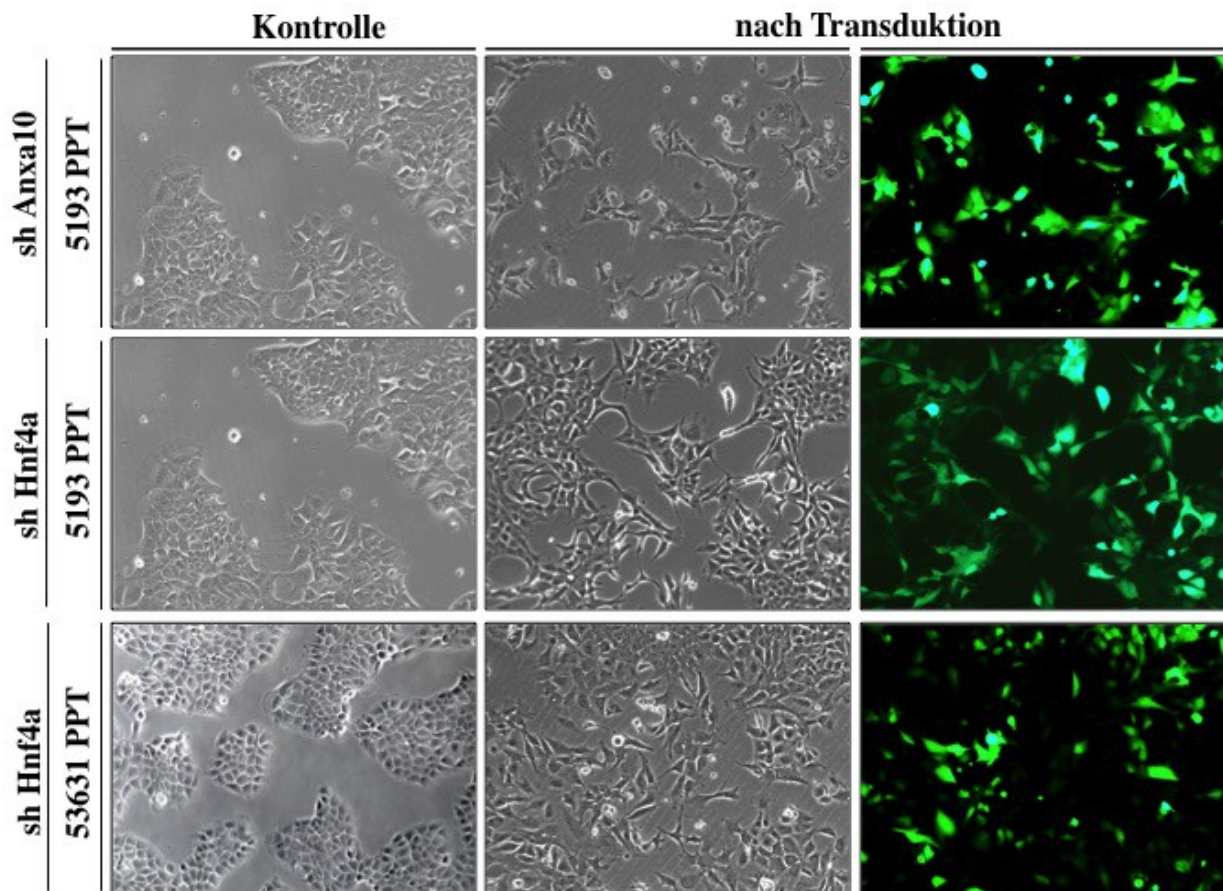
Die *knockdowns* wurden ebenfalls in den o.g. Zelllinien durchgeführt. Der Logik des Versuchsaufbaus folgend, erfolgte der *knockdown* epithelialer Marker in Zelllinien epithelialen Phänotyps, für die mesenchymalen Marker vice versa. Die Konstruktion der Expressionsplasmide für die *knockdown*-Experimente unterscheidet sich im Aufbau völlig von denen der Überexpressionsexperimente. Hier zeigten die HEK-Zellen nach Transfektion eine gute bis mäßige Viabilität, starke Fluoreszenz und die Tumorzellen ließen sich

ausnahmslos gut mit dem viralen Überstand transduzieren. Die morphologischen Änderungen können Tabelle Error: Reference source not found entnommen werden.

**Tabelle 4-2: Morphologische Ergebnisse der *knockdown*-Versuche**

Name des Gens	16992 PPT					5320 PPT					53631 PPT					5193 PPT				
	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30	5	10	15	20	30
Anxa10											e	e	e	e	e	e	e	i	i	i
Anxa13											e	e	e	e	e	nb	nb	nb	nb	nb
Bgn	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Cd34	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Ddr2	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Fgfr1	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Hnf4a											i	i	i	i	e	i	i	i	i	i
Mmp2	m	m	m	m	m	m	m	i	m	m										
Pcdh19	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Rbp4											e	i	i	i	i	e	i	i	i	i
Snai2	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Sox2	i	m	m	i	i	m	m	m	i	i										
SPARC	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Tgfbr3	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
Tspan8											e	e	e	e	i	nb	e	i	e	i
Wnt7a											e	i	i	i	i	nb	i	i	i	i
Zeb2	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m										
shMock	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	e	e	e	e	e	nb	e	e	e	e

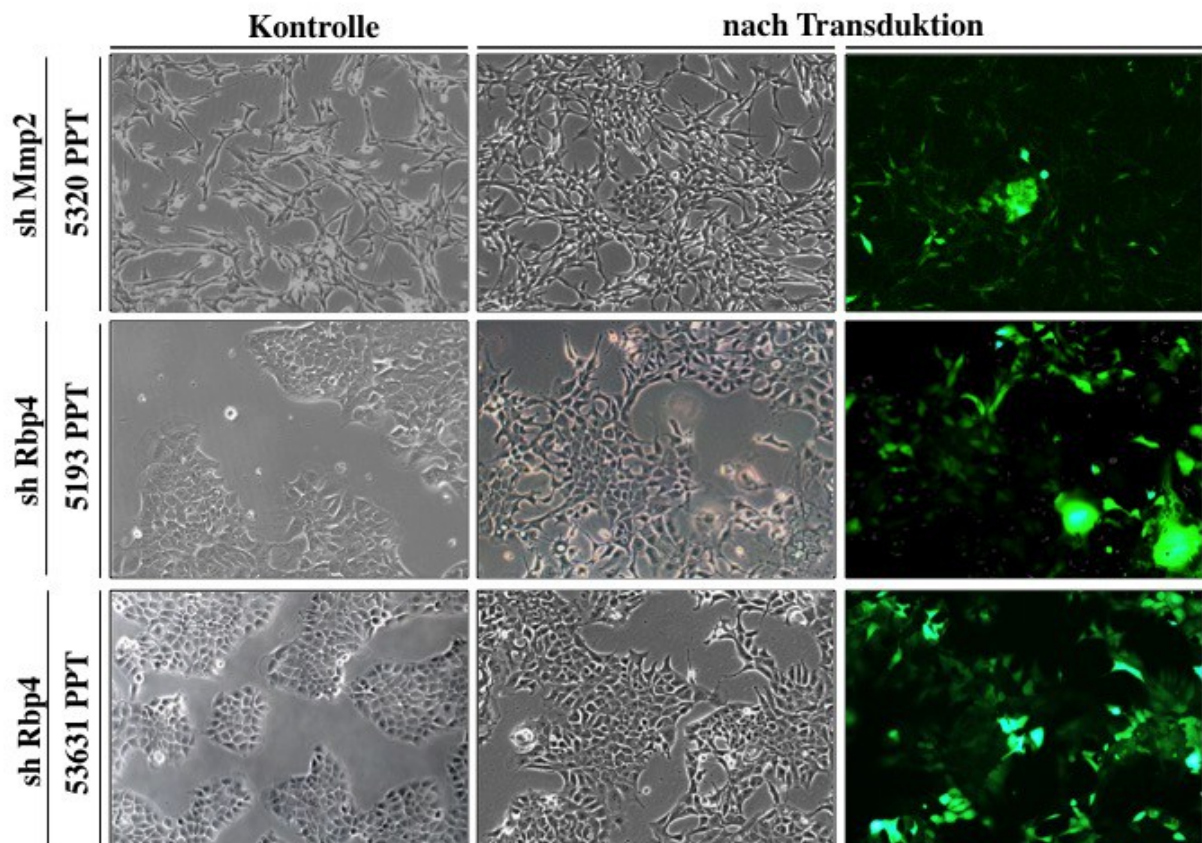
Übersicht über die Morphologie der Zelllinien 5; 10; 15; 20 und 30 Tage nach Transduktion mit dem sh-Konstrukt. e = epithelialer Phänotyp; m = mesenchymaler Phänotyp; nb = nicht beurteilbar (da nur vereinzelte Zellen). Farblich hervorgehoben sind Zelllinien, die eine morphologische Änderung im Sinne einer EMT durchlaufen.



**Abb. 4.24: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5193 PPT und 53631 PPT mit viralem Überstand aus den *knockdown*-Experimenten mit shAnxa10 und shHnf4a.**

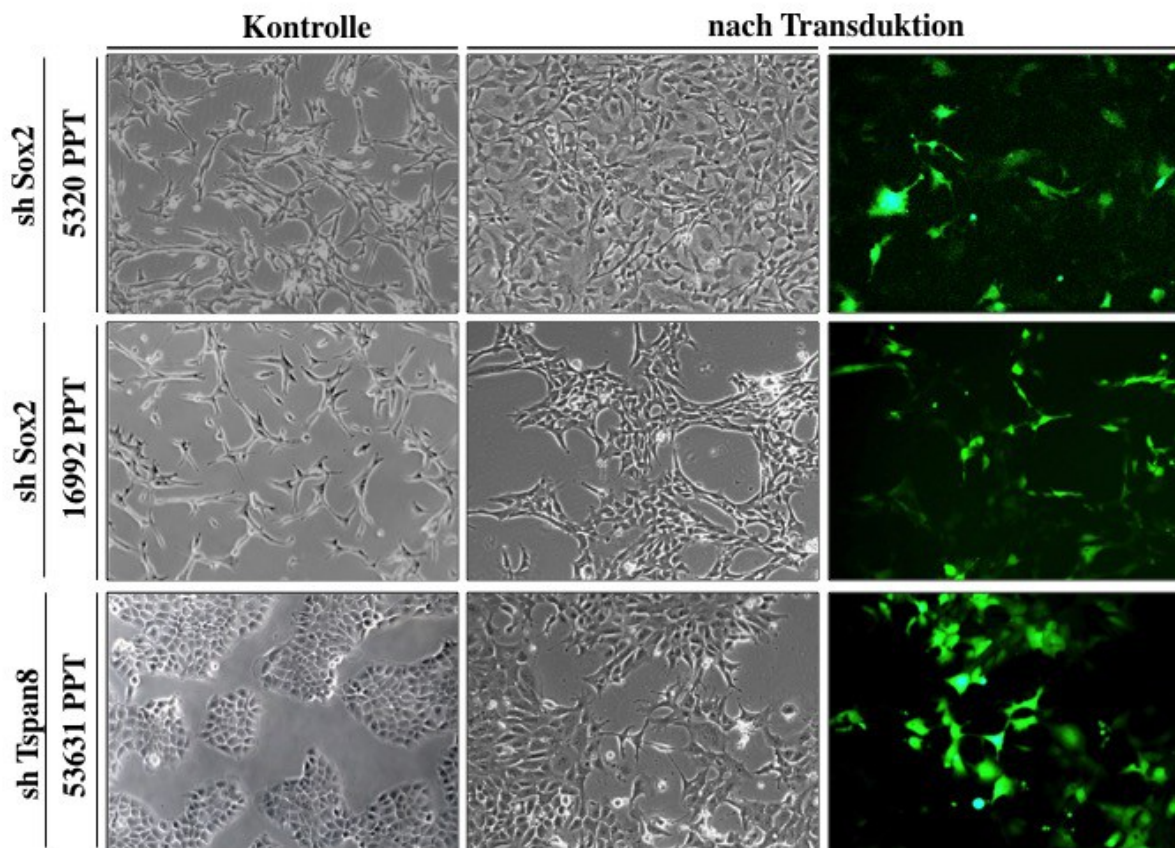
Gezeigt sind die morphologischen Veränderungen der epithelialen Zelllinien 5193 PPT und 53631 PPT nach Transduktion mit sh-RNA der Zielgene Anxa10 und Hnf4a. In allen drei Experimenten zeigen die transduzierten Zellen nach 20 Tagen einen intermediären Phänotyp, welcher weder eindeutig epithelial noch mesenchymal erscheint.





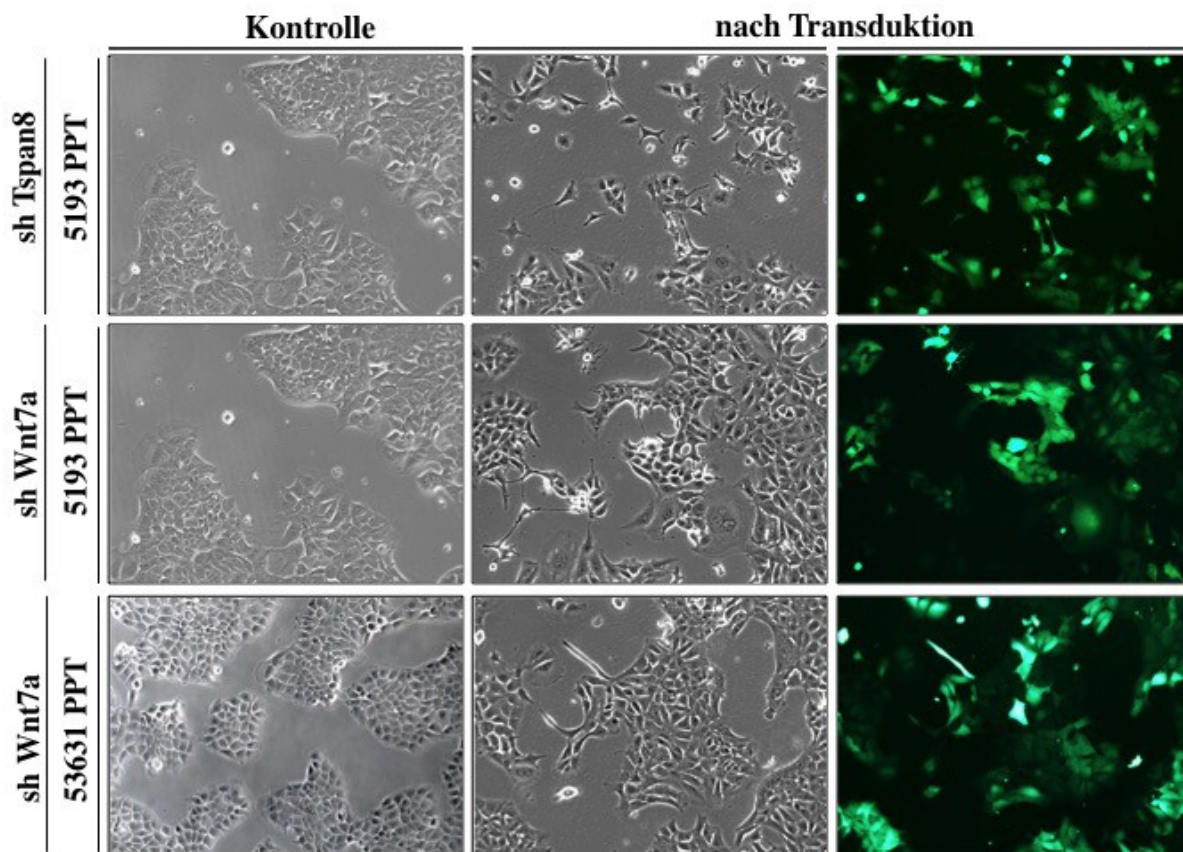
**Abb. 4.25: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5193 PPT mit viralem Überstand aus den *knockdown*-Experimenten mit shMmp2 sowie der Zelllinien 5193 PPT und 53631 PPT mit viralem Überstand von shRbp4.**

Die mesenchymale Zelllinie 5320 PPT zeigt 15 Tage nach Transduktion des viralen Überstands mit shMmp2 einen intermediären Phänotyp. Die epithelialen Zelllinien 5193 PPT und 53631 PPT zeigen 20 Tage nach Transduktion ebenfalls einen intermediären Phänotyp und damit eine Veränderung hin zu einer eher mesenchymalen Morphologie.



**Abb. 4.26: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5320 PPT und 16992 PPT mit viralem Überstand aus den *knockdown*-Experimenten mit shSox2 sowie der Zelllinie 53631 PPT mit viralem Überstand von shTspan8.**

Die mesenchymalen Zelllinien 5320 PPT und 16992 zeigen 20 Tage nach Transduktion des viralen Überstands mit shSox2 einen intermediären Phänotyp. Die epithelialen Zelllinien 53631 PPT ändern ihre Morphologie 15 Tage nach Transduktion ebenfalls hin zu einem intermediären Phänotyp.



**Abb. 4.27: Morphologische Änderungen nach Transduktion der Tumorzelllinien 5193 PPT mit viralem Überstand aus den *knockdown*-Experimenten mit shTspan8 sowie der Zelllinien 53631 PPT und 5193 PPT mit viralem Überstand von shWnt7a.**

Die epithelialen Zelllinien 5193 PPT und 53631 PPT zeigen sowohl nach der Transduktion mit sh-RNA von Tspan8 als auch von Wnt7a nach 30 Tagen einen Wechsel hin zu einem intermediären Phänotyp.



---

## 5 Diskussion

Schon vor über zehn Jahren wurde postuliert, dass EMT eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und -metastasierung spielt. Bislang sind die komplexen Mechanismen, die den Wandel einer epithelialen in eine mesenchymale Zelle regulieren, größtenteils unverstanden. Die in dieser Arbeit erstellten lentiviralen Vektoren sollen dazu beitragen, Schlüsselgene zu identifizieren, die *in vitro* eine EMT in Pankreaskarzinomzellen induzieren und letztlich sogar ein potentielles therapeutisches Ziel darstellen, wenn durch einen gezielten *knockout* dieser Metastasierungsweg ausgeschaltet würde.

### 5.1 Die lentiviralen Überexpressionsvektoren mit dsRed und EGFR führen nicht zur Viruspartikelproduktion

Auch nach Änderung der Verpackungsplasmide von einem Drei- zu einem Zweikomponentensystem, der Nutzung kommerzieller Transfektionsagenzien und Anpassung des Durchführungsprotokolls in mehreren Anläufen, zeigten sich die zur Virusproduktion gedachten HEK-Zellen nach Transfektion mit den lentiviralen Vektoren, die dsRed oder EGFR als Selektionsmarker exprimieren, binnen 24 Stunden als *aviabel*. Es muss davon ausgegangen werden, dass auf diesen Expressionsvektoren eine für HEK-Zellen toxische Komponente enthalten ist.

Die lentiviralen Systeme mit einer Puromycinresistenz an Stelle eines fluoreszierenden Selektionsmarkers zeigten in einzelnen Fällen erfolgreich transduzierte Tumorzellen. Beim Vergleich der Expressionsvektoren liegt der einzige Unterschied darin, dass die puromycinselektierten Konstrukte keinen zusätzlichen Promotor besitzen, sondern die Puromycinresistenz unter der Kontrolle von IRES steht, welches eine intrinsische Ribosomenbindungsstelle aufweist (Hudder *et al.* 2000). Es ist davon auszugehen, dass dieses Fehlen an zellulärem Stress in den HEK-Zellen bei Transfektion mit diesen Plasmiden zu einer besseren Viabilität und daher zur Virusproduktion geführt hat. Qin *et al.* zeigten 2010, dass die Potenz eines Promotors entscheidend von der Wahl der Zelllinien abhängt. In HEK-Zellen zeigt die überwiegende Mehrheit der Promotoren eine sehr starke Proteinexpression. Dies gilt insbesondere für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Promotoren des CMV-Virus, EF1a und PGK. In genannter Studie wird auch aufgeführt, dass die Transfektion lentiviraler Vektoren in einer *Drosophila*-Zelllinie zum Absterben der Zellen geführt hat. Vor diesem Hintergrund scheint es zumindest möglich, dass die Vielzahl und hohe Expression von Genen auf dem Expressionsvektor zu der stark verminderten Viabilität

---

der HEK-Zellen geführt hat.

Zu diskutieren wäre auch eine direkte toxische Komponente der Gene von Interesse. Dass diese sich aber in der überwiegenden Mehrheit der Experimente so negativ auf die HEK-Zellen auswirkt, darf als eher unwahrscheinlich erachtet werden.

Bei den Experimenten mit einer IRES-abhängigen Transkription des Selektionsmarkers wurde in zwei Versuchen eine erfolgreiche Selektion von Tumorzellen nach Transduktion erreicht. Erklärbar wäre die geringe Ausbeute erfolgreich selektionierter Zelllinien mit der stark schwankende Effektivität der IRES-abhängigen Translation, die in der Regel nur etwa 20-50% an Genprodukt im Vergleich zu einer konventionellen Translation erreicht (Mizuguchi *et al.* 2000; Bochkov *et al.* 2006). Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch erfolgreich transduzierten Tumorzellen bei Selektion eine unzureichende Puromycinresistenz aufgewiesen haben und falsch negativ selektioniert worden sind.

Zur weiteren Verifizierung dieser These sollten die Überexpressionsvektoren, die eine IRES-abhängige Puromycinresistenz aufweisen, nochmals transfiziert und transduziert werden. Die Puromycinkonzentration zur Selektion der Tumorzellen sollte hierbei niedriger gewählt werden.

## **5.2 Der *knockdown* EMT-assoziiierter Gene kann einen Wechsel im morphologischen Zelltypus induzieren**

Beim funktionellen *knockdown* von EMT-assoziierten Genen mittels sh-RNA zeigt sich bei mehreren Genen und in mehreren Zelllinien ein Wechsel der Morphologie zu einem intermediären Phänotyp.

Für die in Tabelle Error: Reference source not found markierten Gene Sox2, Mmp2, Anxa10, Hnf4a, Rbp4, Tspan8 und Wnt7a kann dies zumindest als Hinweis darauf gewertet werden, dass das Ausschalten dieser Gene einen Einfluss auf EMT-assoziierte Signalwege hat.

Für **Anxa10** wird in der Literatur kein Bezug zu EMT oder PDAC beschrieben, wobei eine Überexpression dieser Genfamilie gehäuft in Adenokarzinomen des Gastrointestinaltraktes beobachtet wird. Wie in 1.2.3.1 beschrieben, wurde für dieses Gen erst in der jüngsten Vergangenheit ein Zusammenhang mit dem serratierten Karzinogeneseweg des Kolonkarzinoms aufgezeigt.

Auch für **Rbp4** findet sich in der Literatur keine Assoziation zur EMT. Zusammen mit Anxa10 wäre es somit ein vielversprechender Kandidat, einen noch unbekanntem Mitspieler in der EMT zu verstehen und seine Funktion zu beschreiben.

In einer neuen Arbeit von Cicchini *et al.* aus 2015 wird die direkte Inhibition von Slug und anderen EMT-Schlüsselgenen durch **Hnf4a** in Hepatozyten beschrieben. Hnf4a kommt damit eine Schlüsselrolle in der Induktion der MET zu, indem es über epigenetische Modulation

---

des Promotors von Slug EMT-Signalwege inhibiert. Dies erklärt die in dieser Arbeit beschriebene Veränderung weg von einer epithelialen Morphologie nach *knockdown* von Hnf4a. Notwendig ist hier die Untersuchung der Slug-Expression, um die beschriebene Assoziation dieser beiden Gene zu verifizieren.

**Sox2** und **Wnt7a** sind Schlüsselgene bei wichtigen embryologischen Prozessen und regulieren übergeordnete und komplexe Mechanismen in der Zelle. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen sich mit früher beschriebenen Assoziationen dieser Gene mit EMT-Prozessen (vgl. 1.2.3) konklusiv. Da EMT in der Embryologie eine wichtige Rolle spielt, ist nachvollziehbar, dass Mutationen oder Änderungen des Expressionsverhaltens dieser Gene prokanzerogen wirken können. Hier sind Untersuchungen der Protein- und Genexpression der transduzierten Tumorzellen notwendig, ehe dazu weitere Aussagen gemacht werden können.

**Mmp2** zeigt sich als weiterer vielversprechender Kandidat für weitergehende Untersuchungen. In den *knockdown*-Versuchen wechseln die Tumorzellen morphologisch von einem mesenchymalen zu einem intermediären Phänotyp. MMP2 ist bereits als relevantes Gen in EMT beschrieben. Jenkins führt 2007 in einer Arbeit aus, dass die MMPs in der extrazellulären Matrix (EZM) latente TGF- $\beta$ -Komplexe in ihre biologisch aktive Form überführen und damit zusammen mit anderen Proteasen einer der entscheidenden Mechanismen der TGF- $\beta$ -Regulation darstellen. MMP2 selbst ist eines der Enzyme, das direkt und ohne Zusammenspiel mit anderen Proteinen TGF- $\beta$  aus seinem latenten Komplex abspalten und aktivieren kann (Karsdal *et al.* 2002). Der eher epitheliale Phänotyp, den die Tumorzellen nach Ausschaltung von MMP2 annehmen, könnte in einer verminderten Aktivität dieser TGF- $\beta$ -Rekrutierung begründet liegen. Eine Behandlung der transduzierten Zellen mit TGF- $\beta$  dürfte hierüber weiteren Aufschluss geben.

Obwohl **Tspan8** in der Literatur noch nicht als EMT-assoziiertes Protein beschrieben wird, gehört dieser Rezeptor zu einer Familie, mit deren Hilfe die Zelle mit der sie umgebenden EZM kommuniziert. Über ihn werden Zellmobilität, Angiogenese und die Homöostase der EZM beeinflusst. Außerdem wird beschrieben, dass Tetraspanine mit mehreren Angehörigen der MMP-Familie kommunizieren (Shi *et al.* 2010; Shiomi *et al.* 2005). Auch diese Genkombination wäre ein Kandidat für einen simultanen *knockdown* mehrerer Gene innerhalb einer Zelllinie.

Auch bei den Versuchen ohne morphologisch sichtbare Veränderungen sollte eine Untersuchung EMT-assoziiierter Signalwege erfolgen. Es kann nicht erwartet werden, dass alle untersuchten Gene Schlüsselpositionen in den EMT-Signalwegen einnehmen und ihre alleinige Ausschaltung einen ähnlichen morphologischen Einfluss ausüben wie eine

---

Behandlung von Zelllinien mit TGF- $\beta$ , welches als Schlüsselregulator mehrere Signalkaskaden beeinflusst.

### **5.3 TGF- $\beta$ ist ein Induktor der EMT in murinen Pankreaskarzinomzellen**

Zahlreiche Autoren (Ellenrieder *et al.* 2001; Song 2007; Lee *et al.* 2008) haben die TGF- $\beta$ -abhängige Induktion der EMT bereits im PDAC und auch in anderen Tumorentitäten beschrieben. Die Wirkung lässt sich auch an den in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen belegen. Der vollständige Wechsel des Phänotyps nach Behandlung mit TGF- $\beta$  erfolgt prompt und eindrücklich. Diese Ergebnisse dienen als Blaupause dafür, wie eine vollständig durchlaufene EMT morphologisch erscheint.

Der Wechsel zu einem eher epithelialen Phänotyp im 0-Medium lässt sich durch den Entzug von FCS erklären. Dieses wird gerade wegen seiner hohen Konzentration an Hormonen und anderen pro-proliferativen Mediatoren in Zellkulturen eingesetzt, um die Generationszeiten zu verkürzen und eine gute Viabilität der Zellen zu garantieren. In zahlreichen Studien werden die Veränderungen des FCS auf den Zellstoffwechsel, Proliferation, Seneszenz und Morphologie in der Zellkultur diskutiert (Manello *et al.* 2007; Liu *et al.* 2015). Um Verzerrungen durch diesen Effekt auszuschliessen, wurde die Beurteilung von Morphologien und morphologischen Veränderungen in den Experimenten dieser Arbeit stets in 0-Medium durchgeführt.

Mausmodelle zeigen erste vielversprechende Ansätze, dass eine anti-TGF- $\beta$ -Behandlung ein neues Werkzeug in der Therapie maligner epithelialer Tumore sein könnte. Neben dem Entzug der direkt wachstumsfördernden Effekte von TGF- $\beta$  hat eine anti-TGF- $\beta$ -Behandlung offenbar auch eine demaskierende Wirkung der Tumorzellen auf das Immunsystem, insbesondere auf natürliche Killerzellen. Ein interessanter Effekt insbesondere im Rahmen der neu aufkeimenden Immuntherapie solider Tumoren. Unerwarteterweise zeigen die Mausmodelle auch nach lang andauernder anti-TGF- $\beta$ -Behandlung keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. (Bierie *et al.* 2006)

Eine neuere Studie von Moon *et al.* aus 2017 zeigt im Mausmodell sowie an humanen Proben die direkte Abhängigkeit von Slug von TGF- $\beta$  bei der Entstehung hepatozellulärer Karzinome. Die Aktivierung des TGF- $\beta$ -Signalweges führte zu einer Slug-Hochregulierung und zur Tumorentstehung. Dieser Zusammenhang ist insofern interessant, als dass unter 5.2 bereits die Bedeutung von Hnf4a in der epigenetischen Modulation des Slug-Promotors diskutiert wurde. In weiterführenden Studien könnte durch Blockade des TGF- $\beta$ -Signalweges bei Hnf4a-*knockout*-Zelllinien untersucht werden, ob der Hnf4a abhängig oder unabhängig

---

von TGF- $\beta$  wirkt. Interessant wäre auch die Expression von Slug vor und nach Inhibition des TGF- $\beta$ -Signalweges.

Auch die oben beschriebene Wirkung von Mmp2 und Tspan8 auf die EZM via direkter Rekrutierung von TGF- $\beta$  ist eine gute Grundlage für weitere Untersuchungen des TGF- $\beta$ -Signalweges in den entsprechend transduzierten Tumorzellen, zumal hier eine direkte Abhängigkeit der Aktivierung von TGF- $\beta$  durch Matrixmetalloproteasen beschrieben ist.

Für Anxa10, Rbp4, Sox2 und Wnt7a finden sich in der Literatur keine weiterführenden Anhaltspunkte für einen Zusammenhang mit dem TGF- $\beta$ -Signalweg. Die Behandlung der *knockout*-Zelllinien mit TGF- $\beta$  könnte hier Aufschluss darüber geben, inwieweit diese Gene eine bislang unbekannte Rolle in der Wirkung von TGF- $\beta$  spielen. Ansonsten wären diese Gene auch gute Kandidaten für eine TGF- $\beta$ -unabhängige Induktion der EMT. Vor dem Hintergrund einer möglichen therapeutischen Bedeutung des TGF- $\beta$ -Rezeptors, wären solche TGF- $\beta$ -unabhängigen Induktoren der EMT besonders interessant, da hier mit einer kombinierten, gezielten Therapie gleich zwei EMT-induzierende Signalwege blockiert werden könnten.

#### **5.4 Ausblick**

Dass allein der *knockdown* eines einzelnen Gens in sieben Fällen zu morphologischen Änderungen führt, stimmt optimistisch, dass in den tieferführenden Analysen auf RNA- und Proteinebene bei weiteren Genen der in dieser Arbeit untersuchten vorselektierten Kohorte Effekte auf die EMT und mit ihr assoziierte Signalwege entdeckt werden.

Ferner ist zu hoffen, dass sich die Überexpressionsvektoren dergestalt anpassen lassen, dass auch diese Experimentreihe zu einer stabilen Überexpression der Gene von Interesse führt.

Alle beschriebenen Vektoren erlauben, dank ihrer unterschiedlichen Selektionsmerkmale, eine simultane Überexpression und *knockdown* diverser Gene. So könnte *in vitro* ein Zusammenhang mehrerer der in dieser Arbeit untersuchten Gene aufgedeckt werden.

Hier bleibt die Frage offen, welche Transkriptionsfaktoren und Signalwege im Einzelnen entscheidend in der Initiation der EMT sind. Eine Behandlung der transduzierten Tumorzellen mit TGF- $\beta$  und anschließende Untersuchung von Genexpressionsmustern sollte differenziertere Aufschlüsse über TGF- $\beta$ -abhängige und -unabhängige Effekte der *knockdowns* aufdecken. Möglicherweise lässt sich für einige Gene auch ein TGF- $\beta$ -unabhängiger Einfluss auf die EMT nachweisen.

Die dann beschriebenen Effekte sollten mittels *knockout* und transgener Überexpression *in vivo* in Mausmodellen untersucht werden. Die *knockdown*-Ergebnisse und die in 5.2

---

diskutierten Erkenntnisse in der Literatur stimmen optimistisch, dass zumindest einige der in dieser Arbeit untersuchten Gene sehr aussichtsreiche Kandidaten für eine Schlüsselrolle in der EMT sind. Übergeordnetes Ziel dieser *in vitro*- und späterer *in vivo*-Experimente sollte dabei die Identifikation potentieller therapeutischer Ziele für eine zielgerichtete biologische Tumorthherapie sein.

---

## 6 Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 6% eine der häufigsten krebserkrankungsbedingten Todesursachen der westlichen Welt. Insbesondere die fehlende Operabilität nach erfolgter Metastasierung schränkt die Prognose der Patienten stark ein. Aus diesem Grunde sollte sich die Grundlagenforschung in diesem Bereich vor allem mit den Mechanismen beschäftigen, die hinter der frühen Metastasierung stehen.

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist bereits als Phänomen beschrieben worden, das es epithelialen Zellen erlaubt ihren Phänotyp hin zu einer mesenchymalen Zelle zu verändern und in der Folge ihren Verband oder ihr Organ zu verlassen und wird daher als wichtiger Mechanismus im Rahmen der Metastasierung diskutiert. Die umfassenden Veränderungen im Zellstoffwechsel, die hierfür nötig sind, werden von bisher unbekanntem Schlüsselproteinen orchestriert. Um die Relevanz der EMT und ihre Regulierung beim Pankreaskarzinom weiter zu erforschen, sind in dieser Arbeit lentivirale Expressionsvektoren kloniert worden, welche eine Gruppe von 17 vorselektionierten Genen in Zelllinien muriner Pankreaskarzinome überexpressieren und in einem zweiten Versuchsansatz eben diese Gene unterdrücken (*knockdown*) sollen.

Ein in der Literatur bei zahlreichen Tumorentitäten bereits beschriebener Induktor der EMT ist der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ . Diese Beobachtung wurde in den hier verwendeten murinen PDAC-Zelllinien bestätigt. Die beobachteten morphologischen Veränderungen der Zellen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp sollen als Referenz für die späteren Expressionsversuche gelten.

Ein permanenter funktioneller *knockdown* derselben Gene mittels Interferenz-RNA vom Typ der *short hairpin*-RNA (sh-RNA) wurde in Zellen des gegenteiligen Phänotyps durchgeführt und führte zu den postulierten Veränderungen in der Zellmorphologie der Tumorzellen.

In anschließenden Studien wird die Behandlung dieser transduzierten Tumorzellen mit TGF- $\beta$  weitere Aufschlüsse darüber geben, welche der untersuchten Gene TGF- $\beta$ -abhängig und welche TGF- $\beta$ -unabhängig EMT induzieren. Auch die Auswertung der durchgeführten Experimente auf Protein- und RNA-Ebene wird Erkenntnisse über das Wechselspiel der Signalwege bei der EMT liefern. Final müssen die Ergebnisse in genetisch modifizierten Mausmodellen *in vivo* verifiziert werden, um auszuloten, ob Schlüsselregulatoren potentielle Ziele einer zielgerichteten Tumorthherapie sein könnten.

---

## 7 Danksagungen

Mein Dank gilt Prof. Dr. R. M. Schmid für die Möglichkeit in seiner Abteilung promoviert haben zu dürfen. Außerdem Prof Dr. D. Saur für die Auswahl des Themas, die Bereitstellung der Mittel und die stete Unterstützung. Prof. Dr. B. Holzmann danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur. Mein besonderer Dank gilt Dr. M. C. Paul ohne deren Rat und Tat diese Arbeit nicht entstanden wäre sowie allen anderen Mitgliedern der AG Saur und der AG Schneider. Zuletzt genannt, aber in jeder anderen Hinsicht an erster Stelle, danke ich meiner Familie und meinen Freunden.



---

## 8 Referenzen

Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Micke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegel W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I (2007): „S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007. *Z Gastroenterol*, 45, S. 487-523.

Aomatsu K, Arao T, Abe K, Kodama A, Sugioka K, Matsumoto K, Kudo K, Kimura H, Fujita Y, Hayashi H, Nagai T, Shimomura Y, Nishio K (2012): „Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53, S. 751-756.

Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL (2011): „TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype." *Cancer Res*, 71, S. 4707-19.

Badiola I, Villacé P, Basaldua I, Olaso E (2011): „Downregulation of discoidin domain receptor 2 in A375 human melanoma cells reduces its experimental liver metastasis ability." *Oncology Reports*, 26, S. 971-978.

Bardeesy N, DePinho R A, (2002): „Pancreatic cancer biology and genetics". *Nature Reviews Cancer*. 2, S. 897-909.

Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, Hanahan D, Redston MS, Chin L, Depinho RA (2006): „Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, S. 5947-52.

Bates C M (2011): „Role of fibroblast growth factor receptor signaling in kidney development." *Am J Physiol Renal Physiol*, 301, S. 245-251.

Beard BC, Dickerson D, Beebe K, Gooch C, Fletcher J, Okbinoglu T, Miller DG, Jacobs MA, Kaul R, Kiem HP, Trobridge GD (2007): „Comparison of HIV-derived lentiviral and MLV-based gammaretroviral vector integration sites in primate repopulating cells." *Mol Ther*, 15, S. 1356-65.

Behlke MA (2008): „Chemical modification of siRNAs for in vivo use." *Oligonucleotides*, 18, S. 305-19.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001): „Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature*, 409, S. 363-366.

Berthier-Vergnes O, Kharbili ME, de la Fouchardière A, Pointecouteau T, Verrando P, Wierinckx A, Lachuer J, Le Naour F, Lamartine J (2011): „Gene expression profiles of human melanoma cells with different invasive potential reveal TSPAN8 as a novel mediator of invasion." *Br J Cancer*, 104, S. 155-165.

Bierie B, Moses HL (2006): „Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer." *Nat Rev Cancer*, 6(7), S. 506-20.

Bhoopathi P, Gondi CS, Gujrati M, Dinh DH, Lakka SS (2011): „SPARC mediates Src-induced disruption of actin cytoskeleton via inactivation of small GTPases Rho-Rac-Cdc42." *Cell Signal*, 23, S. 1978-87.

Biswas S, Emond MR, Jontes JD (2010): „Protocadherin-19 and N-cadherin interact to control cell movements during anterior neurulation." *J Cell Biol*, 191, S. 1029-1041.

- 
- Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA (2002): „Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas.“ *Oncogene*, 21, S. 3241-46.
- Bochkov YA, Palmenberg AC (2006): „Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location.“ *Biotechniques*, 41, S. 283-4.
- Bonzo J A, Ferry C H, Matsubara T, Kim J, Gonzalez F J (2012): „Suppression of Hepatocyte Proliferation by Hepatocyte Nuclear Factor 4 in Adult Mice.“ *The Journal for Biological Chemistry*, 287, S. 7345-56.
- Boudreau RL, Davidson BL (2012): „Generation of hairpin-based RNAi vectors for biological and therapeutic application.“ *Methods Enzymol*, 507, S. 275-96.
- Brandan E, Cabello-Verrugio C, Vial C (2008): „Novel regulatory mechanisms for the proteoglycans decorin and biglycan during muscle formation and muscular dystrophy.“ *Matrix Biology*, 27, S. 700-708.
- Brembeck FH, Schreiber FS, Deramandt TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, Grippo P, Stoffers DA, Silberg DG, Rustgi AK (2003): „The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice.“ *Cancer Res*, 63, S. 2005-09.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002): „Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference.“ *Cancer Cell*, 2, S. 243-47.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): „Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, S. 8033-37.
- Cattin AL, Le Beyec J, Barreau F, Saint-Just S, Houllier A, Gonzales FJ, Robine S, Pincon-Raymond M, Cardot P, Lacasa M, Ribeiro A (2009): „Hepatocyte Nuclear Factor 4, a Key Factor for Homeostasis, Cell Architecture, and Barrier Function of the Adult Intestinal Epithelium.“ *Molecular and Cellular Biology*, 29, S. 6294-6308.
- Chen CH, Hsieh TJ, Lin KD, Lin HY, Lee MY, Hung WW, Hsiao PJ, Shin SJ (2012): „Increased unbound retinol-binding protein 4 concentration induces apoptosis through receptor-mediated signaling.“ *J Biol Chem*, 287, S. 9694-9701.
- Chetty C, Dontula R, Ganji PN, Gujrati M, Lakka SS (2012): „ISPARC expression induces cell cycle arrest via STAT3 signaling pathway in medulloblastoma cells.“ *Biochem Biophys Res Commun*, 417, S. 874-879.
- Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH (2005): „Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells.“ *Mol Cell Biol*, 25, S. 6031-46.
- Chlenski A, Guerrero LJ, Salwen HR, Yang Q, Tian Y, Morales La Madrid A, Mirzoeva S, Bouyer PG, Xu D, Walker M, Cohn SL (2011): „Secreted protein acidic and rich in cysteine is a matrix scavenger chaperone.“ *PLoS*, 6, Epub 2011 Sep 16.
- Christou GA, Tselepis AD, Kiortsis DN (2012): „The metabolic role of retinol binding protein 4: an update.“ *Horm Metab Res*, 44, S. 6-14.
- Chu W, Li X, Li C, Wan L, Shi H, Song X, Liu X, Chen X, Zhang C, Shan H, Lu Y, Yang B (2011): „TGFB3, a potential negative regulator of TGF- $\beta$  signaling, protects cardiac

---

fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis." *J Cell Physiol*, 226, S. 2586-94.

Cicchini C1, Amicone L, Alonzi T, Marchetti A, Mancone C, Tripodi M (2015): „Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte.“ *Liver Int*, 35(2), S. 302-10.

Cicchini C, de Nonno V, Battistelli C, Cozzolino AM, De Santis Puzzonina M, Ciafrè SA, Brocker C, Gonzalez FJ, Amicone L, Tripodi M (2015): „Epigenetic control of EMT/MET dynamics: HNF4 $\alpha$  impacts DNMT3s through miRs-29.“ *Biochim Biophys Acta*, 1849(8), S. 919-29.

Claas C, Wahl J, Orlicky DJ, Karaduman H, Schnölzer M, Kempf T, Zöller M (2005): „The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells.“ *Biochem J*, 389, S.99-110.

Clevers H, Nusse R (2012): „Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease.“ *Cell*, 149, S. 1192-1205.

Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Krtolica A, Beausejour CM, Parrinello S, Hodgson JG, Chin K, Desprez PY, Campisi J (2010): „A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen.“ *PloS one*. 5, S. 9188.

Criswell TL, Arteaga CL (2007): „Modulation of NFkappaB activity and E-cadherin by the type III transforming growth factor beta receptor regulates cell growth and motility.“ *J Biol Chem*, 282, S. 32491-500.

Davis FM, Kenny PA, Soo ET, van Denderen BJ, Thompson EW, Cabot PJ, Parat MO, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2011): „Remodeling of purinergic receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling as a consequence of EGF-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells.“ *PloS One*, 6, Epub 2011 Aug 5

Day JD, DiGiuseppe JA, Yeo C, Lai-Goldman M, Anderson SM, Goodman SN, Kern SE, Hruban RH (1996): „Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms“ *Hum Pathol*, 27, S.119-24.

DeLa Forest A, Nagaoka M, Si-Tayeb K, Noto F K, Konopka G, Battle M A, Duncan S A (2011): „HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells.“ *Development and Stem Cells*, 138, S. 4143-53.

Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA (2011): „The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer.“ *PloS One*, 6, Epub 20.10.2011

DiGiuseppe JA, Hruban RH, Goodman SN, Polak M, van den Berg FM, Allison DC, Cameron JL, Offerhaus GJ (1994): „Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas.“ *Am J Clin Pathol*, 101, S. 684-88.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998): „A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.“ *J Virol*, 72, S. 8463-71.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): „Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.“ *Nature*, 411, S. 494-8.

Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G, Gress TM (2001): „Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation.“ *Cancer Res*, 15; 61(10), S. 4222-8.

---

Emond MR, Biswas S, Blevins CJ, Jontes JD (2011): „A complex of Protocadherin-19 and N-cadherin mediates a novel mechanism of cell adhesion.“ *J Cell Biol*, 195, S. 1115-21.

Escalona RM, Stenvers KL, Farnworth PG, Findlay JK, Ooi GT (2009): „Reducing betaglycan expression by RNA interference (RNAi) attenuates inhibin bioactivity in Lbeta2 gonadotropes.“ *Mol Cell Endocrinol*, 307, S. 149-156.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.“ *Nature*, 391, S. 806-11.

Fong H, Wong RC, Donovan PJ (2012): „Transcriptional regulation of TRKC by SOX2 in human embryonic stem cells.“ *Stem Cell Res*, 8, S. 206-214.

Gatza CE, Holtzhausen A, Kirkbride KC, Morton A, Gatza ML, Datto MB, Blobe GC (2011): „Type III TGF- $\beta$  receptor enhances colon cancer cell migration and anchorage-independent growth.“ *Neoplasia*, 13, S. 758-770.

Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA (1987): „Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.“ *Virology*, 156, S. 171-76.

Gelderblom HR, Gentile M, Scheidler A, Özel M, Pauli G (1993): „Zur Struktur und Funktion bei HIV.“ *Aidsforschung*, 5, S. 231.

Gerson KD, Shearstone JR, Maddula VS, Seligmann BE, Mercurio AM (2012): „Integrin  $\beta 4$  regulates SPARC protein to promote invasion.“ *J Biol Chem*, 287, S. 9835-44.

Gheldof A, Hulpiau P, van Roy F, De Craene B, Berx G (2012): „Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors.“ *Cell Mol Life Sci*, 69, S. 2527-41.

Gesierich S, Paret C, Hildebrand D, Weitz J, Zraggen K, Schmitz-Winnenthal FH, Horejsi V, Yoshie O, Herlyn D, Ashman LK, Zöller M (2005): „Colocalization of the tetraspanins, CO-029 and CD151, with integrins in human pancreatic adenocarcinoma: impact on cell motility.“ *Clin Cancer Research*, 11(8), S. 2840-52.

Goggins M, Hruban RH, Kern SE (2000): „BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications.“ *Am J Pathol*, 156, S. 1767-71.

Gordon KJ, Dong M, Chislock EM, Fields TA, Blobe GC (2008): „Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression.“ *Carcinogenesis*, 29, S 252-262.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004): „The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs.“ *Nature*, 432, S. 235-40.

Grippo PJ, Nowlin PS, Demeure MJ, Longnecker DS, Sandgren EP (2003): „Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice.“ *Cancer Res*, 63, S.2016-19.

Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ (2005): „Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis.“ *J Clin Invest*, 115, S. 1714-23.

- 
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): „The hallmarks of Cancer.“ *Cell*, 100, S. 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2010): „Hallmarks of cancer: the next generation.“ *Cell*, 144, S. 646-74.
- Hay E D (1990): „Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation.“ *Cell Differentiation and Development*, 32, S. 367-375.
- Hay E D (1995): „An overview of epithelio-mesenchymal transformation.“ *Acta Anat*, 154, S. 8-20.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997): „TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.“ *Nature*, 390, S. 465-71.
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA (2006): „Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma.“ *Genes Dev*, 20, S. 1218-49.
- Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry SI, Williamson P, Harrington K, Leitinger B, Sahai E (2011): „Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6.“ *Nat Cell Biol*, 13, S. 49-58.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA (2003): „Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.“ *Cancer cell*, 4, S. 437-50.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramautd TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA (2005): „Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice.“ *Cancer Cell*, 7(5), S. 469-83.
- Tuveson DA, Hingorani SR (2005): „Ductal pancreatic cancer in humans and mice.“ *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 70, S. 65-72.
- Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE (2000): „Progression model for pancreatic cancer.“ *Clin Cancer Res.*, 6, S. 2969-72.
- Iglesias J M, Morgan R O, Jenkins N A, Copeland N G, Gilbert D J, Fernandez M P (2002): „Comparative genetics and evolution of annexin A13 as the founder gene of vertebrate annexins.“ *Mol Biol Evol*, 15, S. 608-618.
- Hoffmann C, Rockstroh JK (2011): „HIV 2011“, Medizin Fokus Verlag, Hamburg.
- Hudder A, Werner R (2009): „Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene.“ *J Biol Chem*, 3, S. 34586-91.
- Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW (2007): „Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression.“ *J Cell Physiol*, 213, S. 374-83.
- Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grünert S (2002): „Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways.“ *J Cell Biol*, 156, S. 299-313.
- Javelaud D, Mauviel A (2005): „Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for

---

carcinogenesis.“ *Oncogene*, 24(37), S. 5742-50.

Jayachandran B, Hussain M, Asgari S (2012): „RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus, baculovirus.“ *J Virol*, 86, S. 13729-34.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010): „Cancer Statistics, 2010.“ *CA Cancer J Clin*, 60, S. 277-300.

Jenkins G (2008): „The role of proteases in transforming growth factor- activation.“ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, S.1068-78.

Kalluri R, Neilson E G (2003): „Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.“ *The Journal of clinical Investigation*, 112, S. 1776-1784.

Kalluri R, Weinberg, R A (2009): „The basics of epithelial-mesenchymal transition“ *The Journal of clinical Investigation*, 119, S. 1420-1428.

Karsdal MA, Larsen L, Engsig MT, Lou H, Ferreras M, Lochter A, Delaissé JM, Foged NT (2002): „Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis.“ *J Biol Chem*, 277(46), S. 44061-7.

Kawai T, Akira S (2006): „TLR signalling.“ *Cell Death Differ*, 13, S. 816-25.

Kim J, Kim M A, Jee C D, Jung E J, Kim W H (2009): „Reduced expression and homozygous deletion of annexin A10 in gastric carcinoma.“ *Int. J. Cancer*, 125, S. 1842-50.

Kim JH, Rhee YY, Kim KJ, Cho NY, Lee HS, Kang GH (2014): „Annexin A10 expression correlates with serrated pathway features in colorectal carcinoma with microsatellite instability.“ *APMIS*, 122(12), S. 1187-95.

Kim JK, Kim PJ, Jung KH, Noh JH, Eun JW, Bae HJ, Xie HJ, Shan JM, Ping WY, Park WS, Lee JY Nam SW (2010): „Decreased expression of Annexin A10 in gastric cancer and its overexpression in tumor cell growth suppression.“ *Oncology Reports*, 24, S. 607-612.

Kim T, Veronese A, Pichiorri F, Lee TJ, Jeon YJ, Volinia S, Pineau P, Marchio A, Palatini J, Suh SS, Alder H, Liu CG, Dejean A, Croce CM (2011): „p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2.“ *J Exp Med*, 208, S. 875-883.

Klatt AR, Zech D, Kühn G, Paul-Klausch B, Klinger G, Renno JH, Schmidt J, Malchau G, Wielckens K (2009): „Discoidin domain receptor 2 mediates the collagen II-dependent release of interleukin-6 in primary human chondrocytes.“ *J Pathol*, 218, S. 241-247.

Kumar P, Woon-Khiong C (2011): „Optimization of lentiviral vectors generation for biomedical and clinical research purposes: contemporary trends in technology development and applications.“ *Curr Gene Ther*, 11, S. 144-53.

Kutner R H, Zhang X, Reiser J (2009): „Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors.“ *Nature Protocols* 4, S. 495-505.

Laklai H, Miroshnikova YA, Pickup MW, Collisson EA, Kim GE, Barrett AS, Hill RC, Lakins JN, Schlaepfer DD, Mouw JK, LeBleu VS, Roy N, Novitskiy SV, Johansen JS, Poli V, Kalluri R, Iacobuzio-Donahue CA, Wood LD, Hebrok M, Hansen K, Moses HL, Weaver VM (2016): „Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression.“ *Nat Med*, 22(5), 497-505

Lambert KE, Huang H, Myhre K, Blobe GC (2011): „The type III transforming growth

---

factor- $\beta$  receptor inhibits proliferation, migration, and adhesion in human myeloma cells." *Mol Biol Cell*, 22, S. 1463-72.

Le Grand F, Jones AE, Seale V, Scimè A, Rudnicki MA (2009): „Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells." *Cell Stem Cell*, 4, S. 535-547.

Bailey JM, Hendley AM, Lafaro KJ, Pruski MA, Jones NC, Alsina J, Younes M, Maitra A, McAllister F, Iacobuzio-Donahue CA, Leach SD (2016): „p53 mutations cooperate with oncogenic Kras to promote adenocarcinoma from pancreatic ductal cells." *Oncogene*, 35(32), S. 4282-8.

Leaman DW, Salvekar A, Patel R, Sen GC, Stark GR (1998): „A mutant cell line defective in response to double-stranded RNA and in regulating basal expression of interferon-stimulated genes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, S. 9442-7.

Lee HS (2012): „Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease." *Cell Tissue Res*, 347, S. 129-140.

Lee YH, Albig AR, Regner M, Schiemann BJ, Schiemann WP (2008): „Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF-beta in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism." *Carcinogenesis*, 29, S. 2243-51.

Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytömaa M, Schulze A, McMahon M, Hill CS, Beug H, Downward J (2000): „Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells." *Genes Dev*, 14(20), S. 2610-22.

Levantini E, Lee S, Radomska HS, Hetherington CJ, Alberich-Jorda M, Amabile G, Zhang P, Gonzalez DA, Zhang J, Basseres DS, Wilson NK, Koschmieder S, Huang G, Zhang DE, Ebralidze AK, Bonifer C, Okuno Y, Gettgens B, Tenen DG (2011): „RUNX1 regulates the CD34 gene in haematopoietic stem cells by mediating interactions with a distal regulatory element." *The EMBO Journal*, 30, S. 4059-70.

Lever AM, Strappe PM, Zhao J (2004): „Lentiviral vectors." *J Biomed Sci*, 11, S. 439-49.

Lim J, Thiery JP (2012): „Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development." *Development*, 139, S. 3471-86.

Lin YP, Ouchi Y, Satoh S, Watanabe S (2009): „Sox2 plays a role in the induction of amacrine and Müller glial cells in mouse retinal progenitor cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, S. 68-74.

Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A (1990): „Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation." *Nat. Genet.* 22, S.361-365.

Liu Y, Li YQ, Wang HY, Li YJ, Liu GY, Xu X, Wu XB, Jing YG, Yao Y, Wu CT, Jin JD (2015): „Effect of serum choice on replicative senescence in mesenchymal stromal cells." *Cytotherapy*, 17(7), S. 874-84.

Lu SH, Chen YL, Shun CT, Lai JN, Peng SY, Lai PL, Hsu HC (2011): „Expression and prognostic significance of gastric-specific annexin A10 in diffuse- and intestinal-type gastric carcinoma." *Journal of Gastroenterology an Hepatology*, 26, S. 90-97.

Lüttges J, Schlehe B, Menke MA, Vogel I, Henne-Bruns D, Klöppel G (1999): „The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in

---

associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium.“ *Cancer*, 85, S. 1703-10.

Ma Y L, Peng J Y, Zhang P, Liu W J, Huang L, Qin H L (2010): „Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer.“ *Med. Oncol.*, 27, S. 304-309.

Mannello F, Tonti GA (2007): „Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!“ *Stem Cells*, 25(7), S. 1603-9.

Matsuzaki S, Darcha C (2012): „Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis.“ *Hum. Reprod.* 27, S. 712-721.

Maupin KA, Sinha A, Eugster E, Miller J, Ross J, Paulino V, Keshamouni VG, Tran N, Berens M, Webb C, Haab BB (2010): „Glycogene expression alterations associated with pancreatic cancer epithelial-mesenchymal transition in complementary model systems.“ *PloS One*, 5, ePub 2010 Sep 27

McCarthy DM, Brat DJ, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH (2001): „Pancreatic intraepithelial neoplasia and infiltrating adenocarcinoma: analysis of progression and recurrence by DPC4 immunohistochemical labeling.“ *Hum Pathol.* 32(6), S. 638-42.

Miraoui H, Dwyer A, Pitteloud N (2011): „Role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in the neuroendocrine control of human reproduction.“ *Molecular and Cellular Endocrinology*, 346, S. 37-43.

Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T (2000): „IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.“ *Mol Ther*, 1, S. 376-82.

Montiel-Equihua CA, Zhang L, Knight S, Saadeh H, Scholz S, Carmo M, Alonso-Ferrero ME, Blundell MP, Monkeviciute A, Schulz R, Collins M, Takeuchi Y, Schmidt M, Fairbanks L, Antoniou M, Thrasher AJ, Gaspar HB (2012): „The  $\beta$ -globin locus control region in combination with the EF1 $\alpha$  short Promotor allows enhanced lentiviral vector-mediated erythroid gene expression with conserved multilineage activity.“ *Mol Ther*, 20, S. 1400-9.

Moon H, Ju HL, Chung SI, Cho KJ, Eun JW, Nam SW, Han KH, Calvisi DF, Ro SW (2017): „Transforming Growth Factor Beta Promotes Liver Tumorigenesis in Mice via Upregulation of Snail.“ *Gastroenterology*, 2017, July 17, epub ahead of print

Moreno M, Muñoz R, Aroca F, Labarca M, Brandan E, Larraín J (2005): „Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway.“ *EMBO J*, 24, S. 1397-1405.

Mosig RA, Dowling O, DiFeo A, Ramirez MC, Parker IC, Abe E, Diouri J, Aqeel AA, Wylie JD, Oblander SA, Madri J, Bianco P, Apte SS, Zaidi M, Doty SB, Majeska RJ, Schaffler MB, Martignetti JA (2007): „Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth.“ *Hum Mol Genet*, 16, S. 1113-23.

Moskaluk CA, Hruban RH, Kern SE (1997): „p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma.“ *Cancer Res*, 57, S. 2140-43.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986): „Specific enzymatic



---

amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.“ *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 , S. 63-73.

Nakajima A, Tanaka E, Ito Y, Maeno M, Iwata K, Shimizu N, Shuler CF (2010): „The expression of TGF- $\beta$ 3 for epithelial-mesenchyme transdifferentiated MEE in palatogenesis.“ *J Mol Histol*, 41, S. 343-355.

Naldini L (1998): „Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells.“ *Curr Opin Biotechnol*, 9, S. 457-63.

Nam EH, Lee Y, Park YK, Lee JW, Kim S (2012): „ZEB2 upregulates integrin  $\alpha$ 5 expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells.“ *Carcinogenesis*, 33, S. 563-571.

Nawshad A, Hay E D (2003): „TGF $\beta$ 3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development“ *The Journal of Cell Biology*, 163, S. 1291-1301

Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zöller M (2010): „Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation.“ *Cancer Res*, 70, S. 1668-78.

Oft M, Heider KH, Beug H (1998): „TGF $\beta$  signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis.“ *Curr Biol*, 19, S. 1243-52.

Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E (1996): „TGF- $\beta$ 1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells.“ *Genes Dev*, 10, S. 2462-77.

Okada H, Strutz F, Danoff T M, Kalluri R, Neilson EG (1996): „Possible mechanisms of renal fibrosis.“ *Contrib. Nephrol.* 188, S. 147-154.

Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T (2004): „Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome.“ *Cell*, 119, S. 847-60.

Olmeda D, Montes A, Moreno-Bueno G, Flores JM, Portillo F, Cano A (2008): „Snai1 and Snai2 collaborate on tumor growth and metastasis properties of mouse skin carcinoma cell lines.“ *Oncogene*, 27, S. 4690-4701.

Palen KA, Jing W, Weber JJ, Tilkens SB, Chan AM, Johnson BD, Gershan JA (2012): „Separation and Characterization of Epithelial and Mesenchymal-like Murine Mammary Tumor Cells Reveals Epithelial Cell Differentiation Plasticity and Enhanced Tumorigenicity of Epithelial-enriched Tumor Cells.“ *Cancer Microenviron*, 6, S. 79-89.

Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007): „Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype“, *Nature Reviews Cancer*, 7, S. 415-428

Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P (1999): „TGF-( $\beta$ ) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells.“ *J Cell Sci*, 112, S. 4557-68.

Qin JY, Zhang L, Clift KL, Hular I, Xiang AP, Ren BZ, Lahn BT (2010): „Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter.“ *PLoS One*, 5(5), e10611

Rana S, Claas C, Kretz CC, Nazarenko I, Zoeller M (2011): „Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility.“ *Int*

---

*J Biochem Cell Biol*, 43, S. 106-119.

Rein A (1994): „Retroviral RNA packaging: a review.“ *Arch Virol Suppl*, 9, S. 513-22.

Reynolds A, Anderson EM, Vermeulen A, Fedorov Y, Robinson K, Leake D, Karpilow J, Marshall WS, Khvorova A. (2006): „Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent.“ *RNA*, 12, S. 988-93.

Rivera LB, Brekken RA (2011): „SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF- $\beta$ 1 activity.“ *J Cell Biol*, 193, S. 1305-19.

Rizzino A (2009): „Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells.“ *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1, S.228-236.

Rooman I, Real FX. (2012): „Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development?“ *Gut*, 61, S. 449-58.

Santangelo L, Marchetti A, Cicchini C, Conigliaro A, Conti B, Mancone C, Bonzo JA, Gonzalez FJ, Alonzi T, Amicone L, Tripodi M (2011): „The stable repression of mesenchymal program is required for hepatocyte identity: a novel role for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ .“ *Hepatology*, 53(6), S. 2063-74.

Scherr M, Steinmann D, Eder M (2004): „RNA interference (RNAi) in hematology.“ *Ann Hematol*, 83, S. 1-8.

Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005): „Pancreatic cancer: basic and clinical aspects.“ *Gastroenterology*, 128, S. 1606-25.

Schneider G, Reichert M, Saur D, Hamacher R, Fritsch R, Schmid RM (2007): „HDAC3 is linked to cell cycle machinery in MiaPaCa2 cells by regulating transcription of *skp2*.“ *Cell Prolif*, 40, S. 522-31.

Schneider G, Krämer OH, Saur D (2012): „A ZEB1-HDAC pathway enters the epithelial to mesenchymal transition world in pancreatic cancer.“ *Gut*, 61, S. 329-30.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003): „Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.“ *Cell*, 115, S. 199-208.

Seidler B, Schmidt A, Mayr U, Nakhai H, Schmid RM, Schneider G, Saur D (2008): „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, S. 10137-42.

Shi GM, Ke AW, Zhou J, Wang XY, Xu Y, Ding ZB, Devbhandari RP, Huang XY, Qiu SJ, Shi YH, Dai Z, Yang XR, Yang GH, Fan J (2010): „CD151 modulates expression of matrix metalloproteinase 9 and promotes neoangiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma.“ *Hepatology*, 52(1), S. 183-96.

Shi J, Severson C, Yang J, Wedlich D, Klymkowsky MW (2011): „Snail2 controls mesodermal BMP/Wnt induction of neural crest.“ *Development*, 138, S. 3135-45.

Shi Y, Massagué J (2003): „Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.“ *Cell*, 113, S. 685-700.

Shields MA, Krantz SB, Bentrem DJ, Dangi-Garimella S, Munshi HG (2012): „Interplay between  $\beta$ 1-integrin and Rho signaling regulates differential scattering and motility of pancreatic cancer cells by snail and Slug proteins.“ *J Biol Chem*, 287, S. 6218-29.

- 
- Shiomi T, Inoki I, Kataoka F, Ohtsuka T, Hashimoto G, Nemori R, Okada Y (2005): „Pericellular activation of proMMP-7 (promatrilysin-1) through interaction with CD151.“ *Lab Invest.* 85(12), S. 1489-506.
- Shyu KG, Wang BW, Kuan P, Chang H (2008): „RNA interference for discoidin domain receptor 2 attenuates neointimal formation in balloon injured rat carotid artery.“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, S. 1447-53.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013): „Cancer statistics 2013.“ *CA Cancer J Clin.*, S. 11-30.
- Skromne I, Stern C D (2001): „Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo.“ *Development*, 128, S. 2915-2927.
- Soltermann A, Pache J C, Vogt P (2011): „Metastasis of a pleural mesothelioma to a hyperplastic stomach polyp: an increase of vimentin expression is seen during a gain in deciduoid morphology.“ *Rare Tumors*, 3, S. 52.
- Song H, Guan Y, Zhang L, Li K, Dong C (2010): „SPARC interacts with AMPK and regulates GLUT4 expression.“ *Biochem Biophys Res Commun*, 396, S. 961-966.
- Song J (2007): „EMT or apoptosis: a decision for TGF-beta.“ *Cell Res*, 17, S. 280-90.
- Spinsanti P, De Vita T, Caruso A, Melchiorri D, Misasi R, Caricasole A, Nicoletti F (2008): „Differential activation of the calcium/protein kinase C and the canonical beta-catenin pathway by Wnt1 and Wnt7a produces opposite effects on cell proliferation in PC12 cells.“ *J Neurochem*, 104, S. 1588-98.
- Sylvie J, Ellen C, Kris V (2011): „The role of Wnt in cell signaling and cell adhesion during early vertebrate development.“ *Front Biosci.* 17, S. 2352-2366.
- Tascilar M, Offerhaus GJ, Altink R, Argani P, Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Goggins M, Hruban RH, Wilentz RE (2001): „Immunohistochemical labeling for the Dpc4 gene product is a specific marker for adenocarcinoma in biopsy specimens of the pancreas and bile duct.“ *Am J Clin Pathol.* 116(6), S. 831-7.
- Tenhagen M, van Diest P J, Ivanova I A, van der Wall E, van der Groep P (2012): „Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects and possible drug targets.“ *Endocr Relat Cancer*, 19, S. 115-29.
- Thiery J P (2003): „Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies.“ *Curr Opin Cell Biol.*, 15, S. 740-46.
- Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, Nieto M A (2009): „Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease“ *Cell* 139, S. 871-890.
- Thiery JP, Sleeman JP (2006): „Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.“ *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, S. 131-42.
- Tiscornia G, Singer O, Verma I M (2006): „Production and purification of lentiviral vectors.“ *Nature Protocols* 1, S. 241-245.
- Townsend TA, Robinson JY, How T, DeLaughter DM, Blobel GC, Barnett JV (2012): „Endocardial cell epithelial-mesenchymal transformation requires Type III TGFβ receptor interaction with GIPC.“ *Cell Signal*, 24, S. 247-256.
- Trono D (2000): „Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent.“ *Gene Ther*, 7, S. 20-23.

---

Turner C, Kohandel M (2010): „Investigating the link between epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: A mathematical approach.” *J Theor Biol*, 265, S. 329-335.

Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, Weiler M, Ma JY, Almirez R, Mangadu R, Liu YW, Platten M, Herrlinger U, Murphy A, Wong DH, Wick W, Higgins LS, Weller M (2004): „SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo.” *Cancer Res*, 64, S. 7954-61.

van Duin M *et al.* (2007): „High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome 8q: evaluation of putative progression markers for gastroesophageal junction adenocarcinomas.” *Cytogenet. Genome Res.*, 118, S. 130-137.

Veenbergen S, van Spriel AB (2011): „Tetraspanins in the immune response against cancer.” *Immunol Lett*, 138, S. 129-136.

Velpula KK, Dasari VR, Tsung AJ, Dinh DH, Rao JS (2011): „Cord blood stem cells revert glioma stem cell EMT by down regulating transcriptional activation of Sox2 and Twist1.” *Oncotarget*, 2, S. 1028-42.

Vicovac L, Aplin J D (1996): „Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation.” *Acta Anat.* 156, S. 202-216.

von Maltzahn J, Bentzinger CF, Rudnicki MA (2011): „Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle.” *Nat Cell Biol*, 14, S. 186-191.

Wadowska-Jaszczyńska K, Jach R, Stangel-Wóciakiewicz K, Kabzińska-Turek M, Przybylska P, Basta A, Huras H, Dyduch G, Radoń-Pokracka M, Dziadek O. (2011): „Results in treatment of early breast cancers and the level of selected metalloproteinases.” *Neuro Endocrinol Lett*, 32, S. 821-830.

Walsh L A, Nawshad A, Medici D (2011): „Discoidin domain receptor 2 is a critical regulator of epithelialmesenchymal transition.” *Matrix Biology*, 30, S. 243-247.

Weber C K, *et al.* (2001): „Biglycan Is Overexpressed in Pancreatic Cancer and Induces G1-Arrest in Pancreatic Cancer Cell Lines.” *Gastroenterology*, 121, S. 657-667.

Wilentz RE, Geradts J, Maynard R, Offerhaus GJ, Kang M, Goggins M, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH (1998): „Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression.” *Cancer Res*, 58, S. 4740-44.

Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH (2000): „Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression.” *Cancer Res*, 60, S. 2002-06.

Wirth M, Fritsche P, Stojanovic N, Brandl M, Jaeckel S, Schmid RM, Saur D, Schneider G (2011): „A Simple and Cost-Effective Method to Transfect Small Interfering RNAs Into Pancreatic Cancer Cell Lines Using Polyethylenimine.” *Pancreas*, 40, S. 144-150.

Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL (2004): „Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro.” *Neoplasia*, 6(5), S. 603-10.

Xiong M, Jiang L, Zhou Y, Qiu W, Fang L, Tan R, Wen P, Yang J (2012): „The miR-200 family regulates TGF-β1-induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression.” *Am J Physiol Renal Physiol*, 302, S. 369-

---

379.

Xu X, Yoo M, Carlson B A, Gladyshev V N, Hatfield D L (2009): „Simultaneous knockdown of the expression of two genes using multiple shRNAs and subsequent knock-in of their expression.“ *Nature Protocols* 9, S. 1338-49.

Yamano M, Fujii H, Takagaki T, Kadowaki N, Watanabe H, Shirai T (2000): „Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma.“ *Am J Pathol*, 156, S.2123-33.

Yáñez-Mó M, Sánchez-Madrid F, Cabañas C (2011): „Membrane proteases and tetraspanins.“ *Biochem Soc Trans*, 39, S. 541-546.

Yang H, Xia Y, Lu SQ, Soong TW, Feng ZW (2008): „Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/ERK, and transcription factor AP-1.“ *J Biol Chem*, 283, S. 5287-95.

Yang J, Liu Y (2002): „Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis.“ *J Am Soc Nephrol*, 13, S. 96.107.

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

Yang WH, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Tzeng CH, Kao SY, Wu KJ, Hung MC, Yang MH (2012): „RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration.“ *Nat Cell Biol*, 14, S. 366-374.

Yee JK, Miyanochara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T (1994): „A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, S. 9564-68.

Yu SF, von Rüden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Rütger U, Anderson WF, Wagner EF, Gilboa E (1986): „Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, S. 3194-98.

Yue S, Mu W, Erb U, Zöller M (2015): „The tetraspanins CD151 and Tspan8 are essential exosome components for the crosstalk between cancer initiating cells and their surrounding.“ *Oncotarget*, 6(4), S. 2366-84.

Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS (1990): „HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure.“ *Cell*, 61, S. 213-22.

Zhang X, Godbey WT (2006): „Viral vectors for gene delivery in tissue engineering.“ *Adv Drug Deliv Rev*, 58, S. 515-534.

Zhou L, Nguyen AN, Sohal D, Ying Ma J, Pahanish P, Gundabolu K, Hayman J, Chubak A, Mo Y, Bhagat TD, Das B, Kapoun AM, Navas TA, Parmar S, Kambhampati S, Pellagatti A, Braunchweig I, Zhang Y, Wickrema A, Medicherla S, Boulwood J, Plataniias LC, Higgins LS, List AF, Bitzer M, Verma A (2008): „Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS.“ *Blood*, 112, S. 3434-43.

Zhou XD, Xiong MM, Tan FK, Guo XJ, Arnett FC (2006): „SPARC, an upstream regulator of connective tissue growth factor in response to transforming growth factor beta stimulation.“ *Arthritis Rheum*, 54, S. 3885-9.

Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998): „Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.“ *J Virol*, 72, S. 9873-80.

---

## 9 Erklärungen

Hiermit erkläre ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt zu haben. Es wurden nur die in dieser Arbeit ausdrücklich genannten Quellen und Hilfsmittel genutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Bilder aus fremden Arbeiten sind mit ausdrücklicher Genehmigung des Autors übernommen worden und als solche gekennzeichnet.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

# 10 Anhang

## 10.1 Plasmidkarten

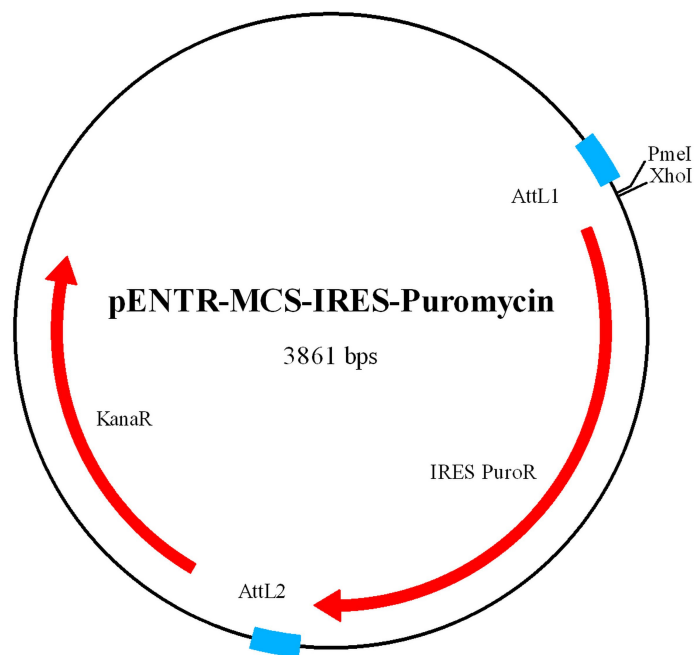
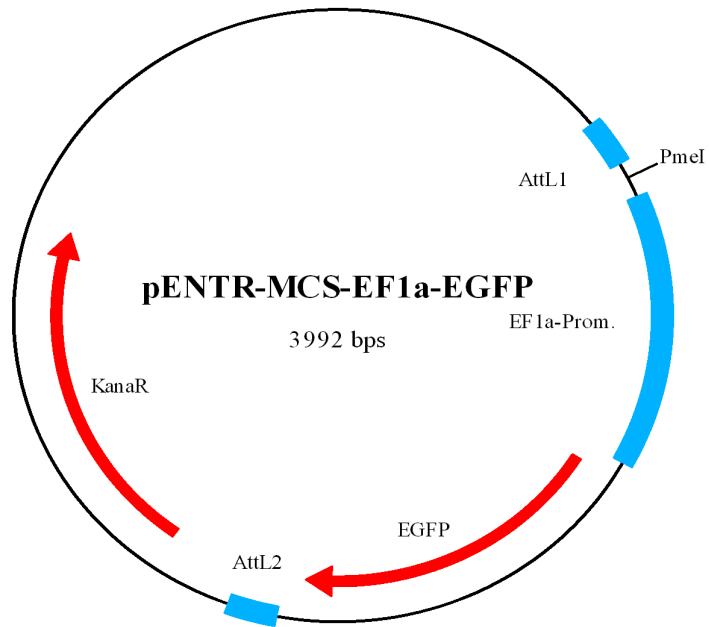
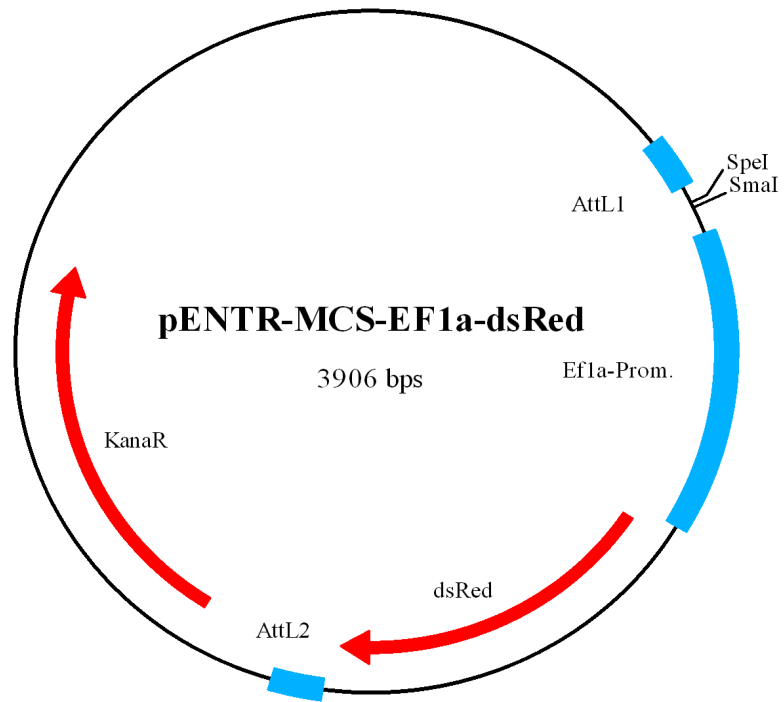


Abb. 10.1: Plasmidkarte von pENTR-MCS-IRES-Puromycin



**Abb. 10.2: Plasmidkarte von pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -EGFP**





**Abb. 10.3: Plasmidkarte von pENTR-MCS-EF1 $\alpha$ -dsRed**

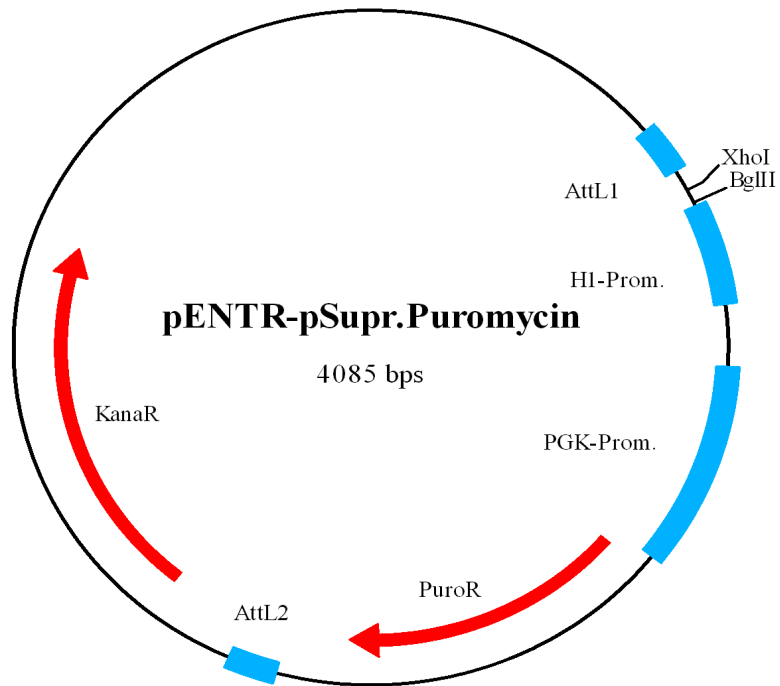
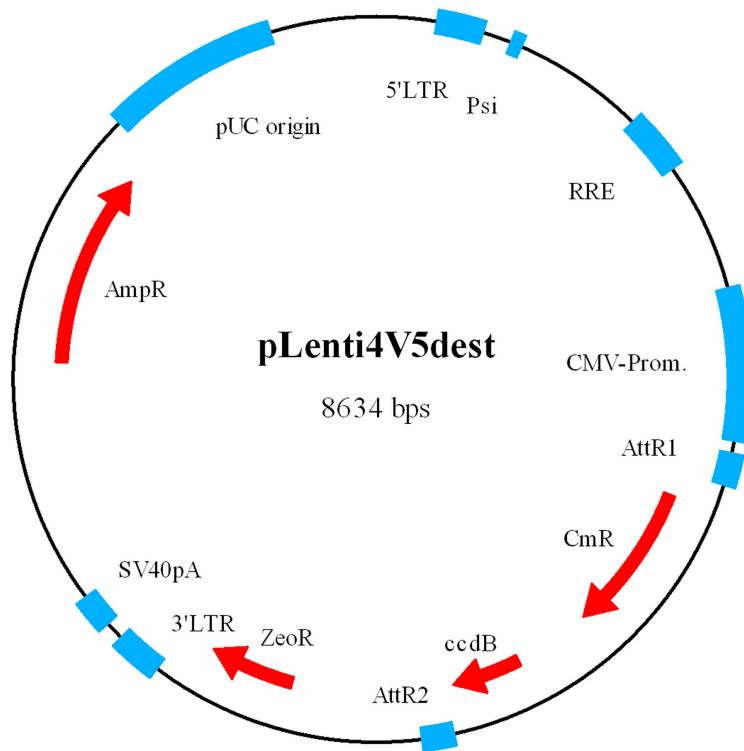
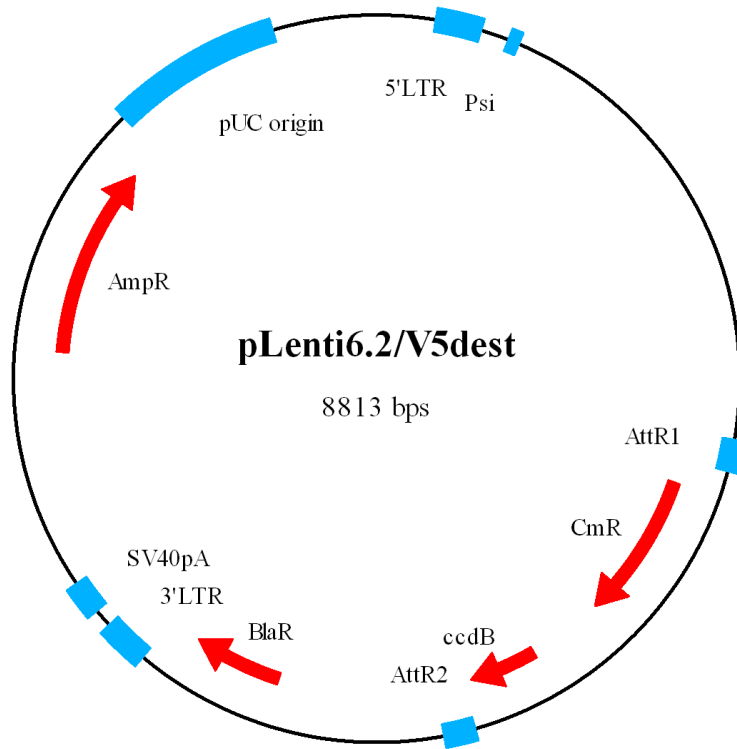


Abb. 10.4: Plasmidkarte von pENTR-pSupr.Puromycin



**Abb. 10.5: Plasmidkarte von pLenti4V5dest**



**Abb. 10.6: Plasmidkarte von pLenti6.2V5dest**