



INAUGURAL - DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur für Biotechnologie/Master of Science

Alexander Michael Migdoll

aus: Kattowitz

Tag der mündlichen Prüfung:

Identifizierung und Charakterisierung von  
prognostischen Biomarkern und  
potentiell tumorrelevanten Proteinen  
im pankreatischen duktalem Adenokarzinom

Gutachter:

Prof. Dr. Frank Lyko

Prof. Dr. Dirk Jäger



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich alljenen danken, die mich mit ihrer sowohl fachlichen als auch persönlichen Unterstützung während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Für die Möglichkeit in der Medizinischen Onkologie am NCT diese Arbeit anfertigen zu können, die freundliche und breite Unterstützung sowie die akademische Betreuung danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Dirk Jäger.

Mein Dank für die akademische Betreuung und wertvolle Hinweise für die Arbeit gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Lyko und Prof. Dr. Magnus von Knebel-Doerberitz.

Bei meiner Betreuerin Dr. Inka Zörnig möchte ich mich in vielerlei Hinsicht für die gegebenen Möglichkeiten und natürlich besonders für die sehr hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung bedanken, die mit vielen lehrreichen Hinweisen und Diskussionen verbunden war.

Für ihre stete Hilfsbereitschaft, die perfekte (Labor-)Organisation, einen Scherz am Rande, die nicht endende Süßkram- und Kuchenversorgung und sehr angenehme Arbeitsstunden im Labor oder drumrum möchte ich mich besonders bei meinen lieben Kolleginnen Julia Bitzer, Rosa Eurich, Jutta Funk, Jenny Gordon Melendez, Isabella Gosch, Iris Kaiser, Zeynep Kosaloglu, Tina Lerchl, Claudia Luckner-Minden, Dr. Svetlana Mastitskaya, Anna Spille, Claudia Ziegelmeier und den Sekretariatsengeln Birgit Eberle und Silke Hirsch bedanken. Und natürlich auch bei Dr. Niels Halama!

Ich danke allen beteiligten Kooperationspartnern in diesem Projekt, besonders

- für die sehr gute Zusammenarbeit im Kooperationsprojekt PD Dr. Martin Zörnig, Dr. Moritz Eißmann und (bald auch Dr.) Julia Moser am Georg-Speyer-Haus
- Dr. Anette Heller und Prof. Dr. Natalia Giese vom Europäischen Pankreaszentrum sowie Dr. Frank Bergmann aus dem Pathologischen Institut für das Bereitstellen der vielen Proben, Hilfestellungen zu den Analysen und wichtigen Diskussionen
- Dr. Natalia Becker und Axel Benner aus der Biostatistik des DKFZ für die statistischen Berechnungen, Erklärungen und Anleitungen.

A big Thank You goes to the „ex“-PhD Student Council members Annie, Aoife, DJ, Nao & Nisit!

Bei Jan Kaufmann bedanke ich mich für das Korrektur lesen dieser umfangreichen Lektüre.

Auch wenn sie meist räumlich ca. 600 km entfernt waren, hatten sie doch immer noch den größten Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet: meine Eltern, Helena und Marian. Vielen lieben Dank für all eure Unterstützung!

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung</b> .....	<b>10</b>
<b>II. Summary</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Krebs - Mechanismen der Karzinogenese</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Zielgerichtete Therapien.....	15
1.2.1.1 Molekulare Antagonisten und Inhibitoren.....	15
1.2.1.2 Immuntherapie.....	16
<b>1.3 Biomarker für die Diagnostik, Prädiktion und Prognostik</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4 Das Pankreas und Typen von Pankreaskarzinomen</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Pankreatisches duktales Adenokarzinom (PDAC)</b> .....	<b>22</b>
1.5.1 Pathogenese.....	23
1.5.2 Ätiologie und Inzidenz.....	25
1.5.3 Diagnose und Therapieoptionen.....	27
1.5.4 Deregulierte Signalwege mit einer potentiellen Relevanz in der Karzinogenese des PDAC.....	29
<b>1.6 Funktionelles Hefe-„Screening“ zur Identifizierung potentieller Biomarker und Therapiezielstrukturen im PDAC</b> .....	<b>30</b>
<b>1.7 Zielsetzung</b> .....	<b>31</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1 Materialien und Proben</b> .....	<b>32</b>
2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	32
2.1.2 Medien.....	32
2.1.3 Vektoren.....	33
2.1.4 Enzyme.....	33
2.1.5 Oligonukleotide.....	34
2.1.6 <i>E. coli</i> -Stämme und Genotypen.....	36
2.1.7 Zelllinien.....	36
2.1.8 Antikörper.....	36
2.1.9 Patientenproben.....	37
2.1.9.1 <i>Seren</i> .....	37
2.1.9.2 <i>Extrahierte Gesamt-RNA aus Gewebeproben</i> .....	38
2.1.9.3 <i>Gewebe</i> .....	39
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>41</b>
2.2.1 RNA-Isolierung.....	41
2.2.2 DNA-Isolierung.....	41
2.2.2.1 <i>Isolierung genomischer DNA</i> .....	42
2.2.2.2 <i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	42
2.2.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	41
2.2.4 Reverse Transkriptase-PCR.....	42
2.2.5 Oligomer-„Annealing“.....	43
2.2.6 Photometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration.....	43
2.2.7 DNA-Restriktionsverdau.....	44
2.2.8 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion.....	44
2.2.9 DNA-Ligation.....	44
2.2.10 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen / Transformation von DNA in <i>E. coli</i> .....	45

2.2.11	DNA-Sequenzierung.....	46
2.2.12	Sequenzspezifische Mutagenese.....	46
2.2.13	Quantitative PCR („real time“ PCR).....	47
2.2.14	Analyse der DNA-Methylierung in CpG-Bereichen.....	49
<b>2.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>50</b>
2.3.1	Prokaryotische Proteinexpression.....	50
2.3.2	Zellaufschluss.....	50
2.3.3	Anreicherung von sekretierten Proteinen aus Zellkulturüberständen.....	51
2.3.4	Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode.....	51
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.3.6	Immunblot („Western Blot“ ).....	52
2.3.7	Titration-ELISA („Enzyme linked immuno-sorbent assay“).....	52
2.3.8	Multiplex-Serologie basierend auf der Luminex xMAP-Technologie.....	53
2.3.8.1	<i>Prinzipieller Ablauf der Multiplex-Serologie.....</i>	<i>54</i>
2.3.8.2	<i>Auswertung der Messdaten.....</i>	<i>55</i>
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>55</b>
2.4.1	Kultivierung.....	55
2.4.2	Transiente Transfektion.....	55
2.4.3	Epigenetische Regulation der Genexpression.....	55
2.4.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	56
2.4.5	Durchflusszytometrische Analysen.....	56
2.4.5.1	<i>Transfektionseffizienz von Plasmiden in humanen Zelllinien.....</i>	<i>56</i>
2.4.5.2	<i>Apoptosebestimmung humaner Zelllinien.....</i>	<i>56</i>
2.4.5.3	<i>Proliferationsmessung humaner Zelllinien.....</i>	<i>57</i>
2.4.6	Histologische Schnittpräparate.....	57
2.4.6.1	<i>Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe („Formalin-fixed Paraffin-embedded tissue“ [FFPE]).....</i>	<i>57</i>
2.4.6.2	<i>Kryogewebe.....</i>	<i>57</i>
2.4.7	Immunhistochemische Gewebeanalyse.....	58
<b>2.5</b>	<b>Bioinformatische Methoden.....</b>	<b>58</b>
2.5.1	Literaturdatenbankrecherche.....	58
2.5.2	Proteindatenbankrecherche in UniProtKB/Swiss-Prot.....	58
2.5.3	Genexpressionsdatenbank (Gene Expression Atlas in der ArrayExpress-Datenbank).....	59
2.5.4	Netzwerkanalyse.....	59
2.5.4.1	<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING).....</i>	<i>59</i>
2.5.4.2	<i>Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....</i>	<i>59</i>
<b>2.6</b>	<b>Statistische Analysen.....</b>	<b>60</b>
2.6.1	Fisher’s exact test.....	60
2.6.2	Partielle Korrelation.....	60
2.6.3	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.....	60
2.6.4	Überlebensanalyse mittels univariater Regression und multivariater proportionaler „Hazard“-Methode nach Cox.....	60
<b>2.7</b>	<b>Identifizierung anti-apoptotischer Proteine im funktionellen Hefe-„Screening“.....</b>	<b>61</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b><i>In silico</i> Analyse der Gene aus dem „Yeast-Survival Screening“ und parameterabhängige Selektion von zu untersuchenden Genen.....</b>	<b>62</b>
3.1.1	Identifizierte Gene aus dem „Yeast-Survival Screening“.....	62
3.1.2	Ablauf der Selektion der Gene für weitere experimentelle Analysen.....	63

3.1.3	Recherche zum Grad der Charakterisierung der Gene und ihrer Produkte in Gen-/Protein- und Literaturdatenbanken .....	64
3.1.4	Recherche zu Funktions- und Lokalisationsdaten der Genprodukte in Gen- und Proteindatenbanken.....	64
3.1.5	Genexpressionsdaten in der ArrayExpress-Datenbank .....	66
3.1.6	Analyse von Protein-, „Array“-Daten zu induzierten Serumantikörperantworten.....	67
3.1.7	Netzwerk- und Interaktionsanalyse mit Ingenuity Pathway Analysis.....	68
3.1.8	Zusammenfassung der Daten und erster Selektionsschritt.....	70
<b>3.2</b>	<b>Semi-quantitative Expressionsanalyse auf Transkriptebene der selektierten Gene .....</b>	<b>71</b>
3.2.1	Finale Genliste und weiterer experimenteller Ablauf .....	73
<b>3.3</b>	<b>Klonierung und prokaryotische Expression der selektierten Gene .....</b>	<b>76</b>
3.3.1	Klonierung in den Expressionsvektor pGEX4T3tag.....	76
3.3.2	Heterologe Expression der Proteine in <i>E. coli</i> Rosetta-Zellen und Gewinnung des Bakterienlysats .....	76
3.3.3	Validierung der exprimierten GST-Fusionsproteine im Titrations-ELISA.....	80
3.3.3.1	<i>Stabilität ausgewählter exprimierter GST-Fusionsproteine.....</i>	<i>82</i>
<b>3.4</b>	<b>Multiplex – Serologie zur Identifizierung immunogener Proteine bei Melanom- und Pankreaskarzinompatienten .....</b>	<b>84</b>
3.4.1	Bestimmung der Schwellenwerte für jedes Protein anhand von Seren einer Kontrollgruppe .....	85
3.4.2	Verteilung der Antikörperantworten im PDAC-, Melanom- und Kontrollkollektiv .....	86
3.4.2.1	<i>Negative, einfach und mehrfach antikörperpositive Seren.....</i>	<i>88</i>
3.4.2.2	<i>Antikörperantworten pro Patient.....</i>	<i>89</i>
3.4.3	Antikörperantworten gegen die selektierten Proteine im Pankreaskarzinom-, Melanom- und Kontrollkollektiv.....	90
3.4.4	Frequenz der Antikörperantworten im Pankreaskarzinom- und Kontroll-Kollektiv.....	92
3.4.5	Analyse der Proteine mit den häufigsten Antikörperantworten im Serenkollektiv von Pankreaskarzinompatienten .....	93
<b>3.5</b>	<b>Genexpressionsanalyse mit RNA-Proben von Pankreaskarzinomgewebe und Normalgewebe zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene .....</b>	<b>97</b>
3.5.1	Validierung der Kontrollbezugsgene .....	97
3.5.2	Analyse der Genexpression in RNA aus Pankreaskarzinom, CP- und Pankreasnormalgewebe mittels quantitativer PCR.....	98
3.5.3	Statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene zwischen Tumor- und Normalgewebe ....	102
<b>3.6</b>	<b>Charakterisierung des Proteins Secreted Frizzled-related Protein 2 (SFRP2) im Kontext des pankreatischen duktales Adenokarzinoms .....</b>	<b>105</b>
3.6.1	Proteinexpression von SFRP2 in Pankreastumor-, Pankreasnormalgewebe und chronischer Pankreatitis .....	107
3.6.1.1	<i>Proteinexpression von SFRP2 in Pankreasnormalgewebe und chronischer Pankreatitis.....</i>	<i>107</i>
3.6.1.2	<i>Proteinexpression von SFRP2 in Pankreastumorgewebe.....</i>	<i>110</i>
3.6.2	Pankreatische Sternzellen ("pancreatic stellate cells") als mögliche Quelle der SFRP2- Expression im Tumorstroma .....	115
3.6.3	Analyse der epigenetischen Regulierung der Expression von SFRP2 .....	116
3.6.3.1	<i>Reaktivierung der SFRP2-Expression in Pankreaskarzinomzellen mittels 5-Azacytidin und Trichostatin A.....</i>	<i>119</i>
3.6.4	Einfluss der Überexpression von SFRP2 auf die Proliferation und das Überleben von etablierten Pankreaskarzinomzellen .....	121
3.6.4.1	<i>Transfektionseffizienzen des SFRP2-GFP-Konstruktes in etablierte Pankreaskarzinomzellen.....</i>	<i>122</i>
3.6.4.2	<i>Proliferations- und Apoptoseverhalten von AsPC-1-Zellen.....</i>	<i>123</i>
3.6.4.3	<i>Proliferations- und Apoptoseverhalten von Panc1-Zellen.....</i>	<i>126</i>
3.6.4.4	<i>Proliferations- und Apoptoseverhalten von MiaPaCa-2-Zellen.....</i>	<i>130</i>



3.6.5	Sekretion des SFRP2-GFP-Fusionsproteins von MiaPaCa-2-Zellen.....	134
3.6.6	Einfluss der Überexpression von SFRP2 auf die Genexpression von intrazellulären Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges etablierten Pankreaskarzinomzellen .....	136
<b>3.7</b>	<b>Prognostische Relevanz spontaner Antikörperantworten und Genexpressionsmuster im PDAC...</b>	<b>138</b>
3.7.1	Multivariate Überlebensanalyse zur Relevanz der induzierten Antikörperantworten im Pankreaskarzinom.....	138
3.7.2	Uni- und multivariate Überlebensanalyse zur Relevanz der Genexpression im Pankreaskarzinom. ....	140
3.7.3	Überlebensanalyse zur Relevanz der Gewebeexpression von SFRP2 im Pankreaskarzinom.....	144
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>146</b>
<b>4.1</b>	<b>Selektion von Genen mittels <i>in silico</i>-Analysen und semiquantitativen PCR .....</b>	<b>146</b>
<b>4.2</b>	<b>Klonierung der selektierten Gene, heterologe Expression in <i>E. coli</i> und Proteinausbeuten .....</b>	<b>147</b>
<b>4.3</b>	<b>Analyse der Patientenkollektive für die Multiplex-Serologie, die Genexpressions- und immunhistologische Analyse .....</b>	<b>150</b>
<b>4.4</b>	<b>Multiplex-Serologie .....</b>	<b>151</b>
4.4.1	Antikörperantworten im PDAC-, Melanom- und Kontrollkollektiv und identifizierte immunogene Proteine.....	152
4.4.2	Bedeutung des Schwellenwertes und dessen Einfluss auf die Anzahl detektierter Antikörperantworten.....	155
<b>4.5</b>	<b>Differentiell exprimierte Gene/Proteine im PDAC und in chronischer Pankreatitis im Vergleich zu Pankreasnormalgewebe .....</b>	<b>157</b>
<b>4.6</b>	<b>Gene/Proteine mit diagnostischer, prognostischer und/oder prädiktiver Relevanz .....</b>	<b>159</b>
4.6.1	Potentielle Biomarker .....	162
<b>4.7</b>	<b>Secreted Frizzled-related Protein 2 im Pankreas.....</b>	<b>164</b>
4.7.1	Epigenetisch regulierte Expression im Tumorgewebe und in Tumorzellen .....	165
4.7.1.1	<i>Reaktivierung der Expression mit 5-Azacytidin und Trichostatin A in Pankreaskarzinomzelllinien.....</i>	<i>167</i>
4.7.2	Funktionelle Charakterisierung der SFRP2-Expression in Tumorzelllinien.....	168
4.7.2.1	<i>Pro-apoptischer Einfluss von SFRP2.....</i>	<i>169</i>
4.7.2.2	<i>Anti-proliferativer Einfluss von SFRP2.....</i>	<i>170</i>
4.7.2.3	<i>Einfluss der SFRP2-Überexpression auf den kanonischen Wnt-Signalweg.....</i>	<i>171</i>
4.7.3	Die potentielle funktionelle Rolle von SFRP2 im Pankreas .....	173
4.7.3.1	<i>SFRP2 im Normalpankreas.....</i>	<i>173</i>
4.7.3.2	<i>SFRP2 in chronischer Pankreatitis.....</i>	<i>174</i>
4.7.3.3	<i>SFRP2 im Tumorgewebe und stromaspezifische Expression.....</i>	<i>175</i>
<b>4.8</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>178</b>
<b>5</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>180</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>183</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>193</b>
	Vektorkarte.....	193
	Semi-quantitative Expressionsanalyse .....	193

## I. Zusammenfassung

Das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC) ist die 4.-6. häufigste krebsbedingte Todesursache in den Industrienationen und hat eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von ca. 5 %. Als einzige kurative Therapie wird die Resektion der Tumoren angewandt, von denen jedoch nur ca. 25 % der Fälle operabel sind. Bei den meisten Patienten liegen auf Grund der späten Diagnose bereits Metastasen vor. Chemotherapieresistente Tumorzellen, fehlende Zielstrukturen auf diesen als auch das tumorunterstützende Stroma, das im PDAC einen Großteil des Tumorgewebes einnehmen kann, werden als Hauptgrund für ungenügende Therapieerfolge angesehen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer diagnostischer und prognostischer Biomarker sowie potentiell tumorrelevanter Zielstrukturen aus einem Datensatz an Proteinen, die in einem tumorspezifischen funktionellen „Yeast Survival-Screening“ erhalten wurden.

Von initial 246 Genen wurden mit Hilfe von *in silico*-Analysen sowie semi-quantitativen Expressionsanalysen mit unterschiedlichen Normalgeweben und Tumorzelllinien 35 Gene selektiert, die hinsichtlich ihrer zellulären Funktion und Lokalisation interessant sowie gewebespezifisch beziehungsweise differentiell exprimiert waren.

Diese Gene wurden a) als rekombinante GST-Fusionsproteine in einer Multiplex Serologie auf Antikörperantworten in 236 Patientenseren und b) in einer quantitativen Expressionsanalyse mit RNA-Proben aus 91 Pankreastumor-, 15 chronischen Pankreatitis- und 15 Normalgeweben untersucht. Etwa ein Viertel der Proteine konnte anhand der Anzahl der Antikörperantworten als immunogen und etwa ein Drittel der Gene als differentiell exprimiert detektiert werden.

Uni- und multivariate Überlebensanalysen identifizierten das Gen *RGS5* als signifikanten prognostischen Marker mit einem negativen Effekt auf das Überleben sowohl für die Existenz von Serumantikörpern als auch für die Expression. Darüber hinaus war die Expression von *ANXA1*, *CALUv1* und *CNIH* mit einem positiven und von *BMI1*, *GPM6A*, *SGK1*, *SNAP25* und *UBQLN1* mit einem negativen Effekt auf das Überleben der Patienten verbunden. Anhand der Ergebnisse mit dem vorliegenden Patientenkollektiv eignete sich jedoch keines der Proteine als diagnostischer Biomarker.

Neben der Identifizierung potentiell prognostisch relevanter Biomarker, die zwar in anderen Tumorentitäten jedoch bisher nicht für das PDAC beschrieben wurden, konnten mit *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM*, *RGS5* und *SFRP2* im Tumor überexprimierte Gene identifiziert werden, deren bisher bekannte Funktion zum Teil auf eine tumorfördernde Wirkung deutet.

Expressionsanalysen mit RNA aus Gesamtgewebe zeigten, dass das Secreted Frizzled-related Protein 2 (*SFRP2*) signifikant in chronischer Pankreatitis und PDAC gegenüber dem Normalgewebe überexprimiert war. Dies konnte immunhistochemisch auf Proteinebene bestätigt werden. Für jeweils ca. 50 % der Normalgewebe konnte keine oder nur eine schwache Proteinexpression in den Azini bestimmt werden, weitere Gewebereiche waren weitestgehend negativ. In chronischer Pankreatitis war eine hohe *SFRP2*-Expression lediglich in den Azini nachweisbar. Tumorzellen exprimierten *SFRP2* nicht oder nur in geringen Konzentrationen. Das Stroma in Tumorgewebe war hingegen in

90 % der Proben positiv für das Protein, das hauptsächlich von (myo-)fibroblasten-ähnlichen Zellen exprimiert wurde. Als Zelltyp kamen u.a. Sternzellen in Frage. Methylierungsanalysen von genomischer DNA aus dem Tumorgesamtgewebe belegten eine Hypomethylierung in der Promotorregion des Gens. Eine transiente Überexpression eines SFRP2-GFP-Fusionsproteins in den etablierten Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, MiaPaCa-2 und Panc1 führte zu einer verringerten Proliferationsrate. MiaPaCa-2-Zellen sekretierten das überexprimierte Protein zudem in das Kulturmedium, was einen parakrinen Effekt auf untransfizierte Zellen erklären würde.

In dieser Arbeit konnten neun prognostische Biomarker für das PDAC identifiziert werden. Gegen einen dieser Marker waren auch Antikörper in Patientenseren nachweisbar. Darüber hinaus waren fünf dieser Gene im Tumorgewebe signifikant überexprimiert. Mit dem Secreted Frizzled-related Protein 2 konnte ein in der Signaltransduktion und am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligtes Protein als überexprimiert identifiziert werden, das proliferationsregulierend wirkt, dessen Funktion im Tumorstroma jedoch noch unklar ist.

## II. Summary

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) ranks 4<sup>th</sup> - 6<sup>th</sup> among cancer related deaths in developed countries with a poor prognosis and a 5-year survival of approx. 5 %. Currently, resection of the tumor is the only means of curative treatment. However, only 25 % of patients are in an operable condition as for most the tumor has already metastasized. Chemotherapy-resistant tumor cells, the lack of appropriate cellular targets as well as the prominent tumor-supporting stroma, sometimes accounting for the gross of the tumor mass, are considered as main reasons for an unsatisfactory treatment outcome.

Thus, the aim of this thesis was the identification of diagnostic and prognostic biomarkers and potentially tumor-relevant structures in an existing protein data set from a functional yeast survival screening.

A strategy consisting of *in silico*- and semi-quantitative expression analyses was applied to select 35 out of the initial 246 genes, which qualified as interesting candidates because of their cellular function and localization and their differential or tissue specific expression pattern, respectively. Those were subsequently measured a) as recombinantly expressed GST-fusion proteins against 236 patient sera for antibody responses in a multiplex serology and b) for their gene expression levels in RNA samples from 91 tumor, 15 chronic pancreatitis and 15 healthy tissues in a quantitative PCR. A quarter of the proteins induced antibody responses in more than 4 % of the patients and could be considered as being immunogenic. A third of the genes showed differential expression patterns.

The only prognostic marker, for which expression levels and antibody responses were significantly associated with survival in uni- and multivariate analyses, was *RGS5* having a negative effect on patient's survival. Furthermore, the expression of *ANXA1*, *CALUv1* and *CNIH* was associated with a

positive effect and that of *BMII*, *GPM6A*, *SGKI*, *SNAP25* and *UBQLN1* with a negative effect on patient's survival. None of the proteins qualified as a diagnostic marker.

Potential prognostic biomarkers, which were described for other tumor entities than PDAC so far, could be successfully identified. Moreover, the genes *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM*, *RGS5* and *SFRP2*, which are partially suggested for having a tumor-relevant function, were significantly overexpressed in tumor tissue.

Quantitative expression analysis of whole tissue RNA showed a significant overexpression for Secreted Frizzled-related protein 2 (SFRP2) in chronic pancreatitis and PDAC compared to normal tissue. Immunohistochemical analysis confirmed the results on protein level. Half of the analyzed normal tissue samples showed either a low or no protein expression in the acinar cells, other parts of the tissues were mostly negative. In chronic pancreatitis, SFRP2 was detected in the acinar cells with an increased expression in virtually all samples. Tumor cells in tissue samples showed either a low or no protein expression. In contrast, the protein was expressed in high amounts in the tumor stroma of more than 90 % of the samples. The expressing cells had a (myo-)fibroblast-like morphology and may include stellate cells. Methylation analysis of the promoter region in genomic DNA of tumor tissues revealed a hypomethylation. Transient overexpression of a SFRP2-GFP-fusion protein in the pancreatic cancer cell lines AsPC-1, MiaPaCa-2 und Panc1 led to a decreased proliferation of the cells. MiaPaCa-2 cells were secreting the overexpressed protein into the culture medium, which may have a paracrine effect in untransfected cells.

Summing up, this work identified nine potential biomarkers suitable for prognosis of PDAC. One of them was detectable by induced antibody responses in patients sera. Furthermore, the tumor tissue contained five of those as significantly overexpressed genes. One was Secreted Frizzled-related protein 2, which is involved in signal transduction with an inhibitory effect on proliferation and the reorganization of the extracellular matrix, but the exact function in the tumor stroma remains unclear.

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebs - Mechanismen der Karzinogenese

Veränderungen im Genom von somatischen Zellen, wie Genmutationen, Insertionen/Deletionen und Chromosomentranslokationen, können zentrale Regulations- und Reparaturmechanismen verändern oder ausschalten (Stratton *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2009). Ursachen hierfür können u.a. kurzweilige oder ionisierende Strahlen, Substanzen mit mutagenem Potential oder onkogene Viren darstellen. Als Folge entsteht eine entartete Zelle, die außerhalb der sonst strikt regulierten Wechselwirkung mit einem Wachstumsvorteil gegenüber benachbarten Zellen existiert, mit dem Potential, im komplexen Prozess der Karzinogenese einen Tumor zu bilden (Futreal *et al.*, 2001). Gene, die essentiell in der Karzinogenese sind, werden je nach ihrem Einfluss als Onkogene, die die Karzinogenese fördern, oder Tumorsuppressorgene, mit einem blockierenden Einfluss auf die Krebsentstehung, bezeichnet. In die zwei genannten Gruppen werden Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Komponenten intrazellulärer Signalkaskaden, Transkriptionsfaktoren und Zelladhäsionsproteine kodieren, gezählt. Eine weitere essentielle Klasse von Genen, die in Krebszellen Mutationen zeigt, kodiert für Proteine der DNA-Reparatur und -Rekombination.

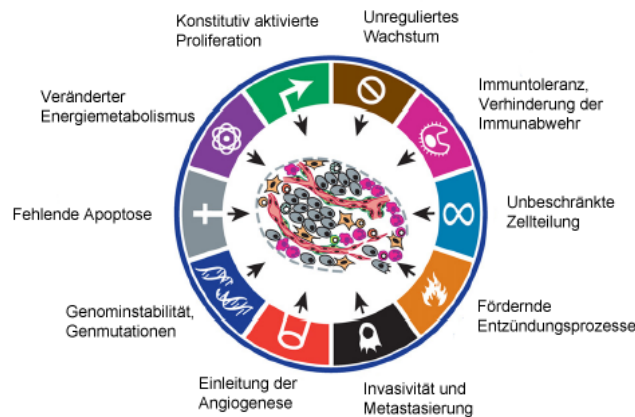
Weiterhin von Bedeutung in der Karzinogenese sind eine veränderte epigenetische Expressionsregulierung, durch die die Expression von Onkogenen aktiviert beziehungsweise von Tumorsuppressorgenen deaktiviert wird, und die microRNA vermittelte Transkriptregulation (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Portela & Esteller, 2010).

Eine erste einzelne Mutation kann bereits eine gesunde in eine maligne Zelle umwandeln (z.B. die *Bcr-Abl*-Translokation in der Chronischen Myeloischen Leukämie). Bei soliden Tumoren ist jedoch für eine Transformation in eine maligne Zelle eine kontinuierliche Akkumulation von Mutationen beziehungsweise Veränderungen im Genom und eine Interaktion der Zelle mit ihrer Mikroumgebung erforderlich (Hanahan & Weinberg, 2011). Aus einer Zelle mit einer selektionsfördernden Mutation entspringt zudem eine Population von Zellen, die nicht nur diese sondern weitere jedoch zum Teil verschiedene Mutationen besitzen, die diesen einen zusätzlichen Selektionsvorteil („driver“) bieten können oder phänotypisch irrelevant („passenger“) erscheinen (Bignell *et al.*, 2010). Somit entsteht eine zunehmend heterogene Zellansammlung mit zellspezifischen und lokal unterschiedlichen Eigenschaften.

Der „evolutionäre Erfolg“ von entarteten Zellen hängt davon ab, durch die Mutationen bestimmte Merkmale zu aquirieren, durch die die Zellen autonom überleben, proliferieren und mit ihrer Mikroumgebung interagieren können (siehe Abb. 1.1.1).

Die von Hanahan und Weinberg (2011) genannten Merkmale stellen eine Erweiterung ihres Modells aus dem Jahr 2000 dar und belegen die Komplexität der Karzinogenese, die zudem durch Interaktionen mit dem umliegenden Stroma moduliert wird. Ein Tumor ist auf das ihn umgebende Gewebe angewiesen, da es diesen durch z.B. ein besonderes Cytokinmilieu und induzierte Angiogenese in

seinem Wachstum, der Invasion und der Metastasierung unterstützt (Nelson & Bissell, 2006; Lorusso & Rüegg, 2008; Eng *et al.*, 2009). Die Identifizierung der engen Verknüpfung zwischen Tumorzellen und Stroma, das Zellen wie z.B. Endothel- und Muskelzellen, (Myo-)Fibroblasten sowie Mono- und Lymphozyten und Blutgefäße enthält, zeigt deutlich auf, dass ein Tumor ein hochkomplexes und zwischen den Individuen molekular und biochemisch variierendes Gewebe darstellt.



**Abb. 1.1.1: Zentrale Charakteristika einer Tumorzelle beziehungsweise eines Tumors, die für die Entstehung, das Wachstum und Überleben notwendig sind (nach Hanahan & Weinberg, 2011).**

Diese individuelle Variabilität mit einer dennoch vergleichbaren histopathologischen Morphologie einer Tumorentität verhindert oft, allgemein anwendbare Wirkmechanismen und Zielstrukturen für die Diagnostik, Prognostik und Therapie zu nutzen. Jedoch bieten diese Unterschiede die Möglichkeit, spezifische Veränderungen für eine Vorhersage des Überlebens und eines Therapieansprechens zu identifizieren und gezielte Wirkstoffe, die in Kombination eingesetzt werden können, zu entwickeln.

## 1.2 Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen

Die schrittweise Transformation zu einer malignen Zelle, die Jahre bis Jahrzehnte umfasst sowie über Stadien dysplastischer Progression und prämaligener Neoplasien abläuft, erlaubt ein Zeitfenster für die Diagnose und Therapie von behandelbaren Krebserkrankungen (Bhatt *et al.*, 2010). Daher existieren für die häufigsten Tumorentitäten wie z.B. das Mamma- und Prostatakarzinom, gastrointestinale Karzinome (ohne assoziierte Drüsen) und das Melanom spezielle Vorsorgeuntersuchungen ab einem bestimmten Alter für den Fall, dass keine hereditäre Prädisposition besteht (Bretthauer & Kalager, 2012). Hierzu zählen u.a. die Mammographie, die Endoskopie/Koloskopie und die Dermatoskopie. Eine prophylaktische Impfung wird für das Zervixkarzinom, das durch Humane Papillomviren (HPV) hervorgerufen wird, für Mädchen seit dem Jahr 2006 angeboten (Shi *et al.*, 2007).

Die genannten Maßnahmen sollen helfen, die auf Grund der demografischen Entwicklung kalkulierten Anstiege der Inzidenzen von Krebserkrankungen beherrschen und möglichst viele Menschen frühzeitig kurativ behandeln zu können (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage, 2012; Ferlay *et al.*, 2010). So liegt die jährliche Zahl der Inzidenzen bei über 450 000 Personen in Deutschland und über

12,5 Mio. weltweit mit steigender Tendenz, die Zahl der jährlichen krebsbedingten Sterbefälle bei über 200 000 in Deutschland und über 7,5 Mio. weltweit.

Die gängigen Diagnoseverfahren schließen ähnlich der Vorsorgeuntersuchung eine Anamnese, optische Begutachtung und Tastuntersuchungen ein, werden jedoch durch bildgebende Verfahren wie Röntgen, Computer- beziehungsweise Magnetresonanztomographie sowie histologische Befunde anhand von Biopsien ergänzt (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013). Bei bestimmten Tumorentitäten bieten Laboruntersuchungen wie z.B. der Pap-Test bei Verdacht auf ein Zervixkarzinom oder der Calcitoninnachweis beim medullären Schilddrüsenkrebs die Möglichkeit einer spezifischeren Diagnose.

Die chirurgische Resektion eines Tumors sowie die Radio- und die Chemotherapie sind als klassische Behandlungsmethoden weiterhin der Standard in der Krebstherapie. Diese Methoden sind etabliert und ermöglichen in Kombinationsansätzen gute Therapieerfolge. Radio- und/oder Chemotherapien werden häufig neoadjuvant zur Verringerung des Tumolvolumens vor einer Resektion oder adjuvant nach der Resektion eingesetzt. Neue Technologien wie z.B. die Partikeltherapie mit Schwerionen lassen schonendere und gezieltere Behandlungen in der Radiotherapie zu (Castro, 1995). Für die Chemotherapie existieren Schemata mit Kombinationen aus mehreren Zytotoxinen wie z.B. 5-Fluoruracil, Oxaliplatin, Cisplatin oder Mitomycin.

### ***1.2.1 Zielgerichtete Therapien***

Chemotherapeutika nutzen die hohe Proliferationsrate von Tumorzellen, um ihre Zytotoxizität primär durch Inhibierung der DNA-Transkription und -Replikation zu erzielen (Hoekman *et al.*, 1999). Jedoch ist der Wirkmechanismus unspezifisch und es werden auch gesunde, ebenfalls stark proliferierende Zellen im Körper wie z.B. Knochenmarkszellen und Epithelzellen des Verdauungstraktes beeinträchtigt. Außer den zum Teil starken Nebenwirkungen bestehen Resistenzmechanismen gegen die Chemotherapeutika im Tumor, die durch intrinsische Faktoren in der heterogenen Tumorzellpopulation und extrinsische des Tumorstromas gebildet werden (Gatenby *et al.*, 2009). Eine Therapie selektiert daher auf die resistenten Zellpopulationen, sodass ein mögliches Rezidiv mit den vorherigen Wirkstoffen nicht mehr behandelbar wäre.

Diese Nachteile erfordern, neue Zielstrukturen auf beziehungsweise in Tumorzellen zu identifizieren und neue zielgerichtete Therapeutika („targeted therapy“) zu entwickeln (Segota & Bukowski, 2004).

#### ***1.2.1.1 Molekulare Antagonisten und Inhibitoren***

Molekulare Wirkstoffe zur Inhibierung enzymatischer Reaktionen sowie von Rezeptoren, die jeweils eine wachstumsfördernde Wirkung für Tumorzellen besitzen, sind als Therapieoption seit mehr als zehn Jahren zugelassen.

Endokrine Therapien werden häufig bei Mammakarzinompatientinnen angewandt, deren Tumor östrogenrezeptorpositiv ist. Dabei werden jedoch keine Hormone im eigentlichen Sinne verabreicht, sondern Antagonisten, auch selektive Östrogenrezeptormodulatoren („Selective estrogen receptor

modulators“ SERM's) genannt, wie Tamoxifen oder die Hormonsynthese-blockierende Aromataseinhibitoren wie Letrozol (Tagnon, 1977; Brodie, 1994).

Die Grundlage zur Entwicklung von molekularen Kinaseinhibitoren war die Identifizierung des Fusionsgens *Bcr-Abl* in der chronischen myeloischen Leukämie (CML), das durch eine Chromosomentranslokation gebildet wird (Rowley, 1973). Das tumorspezifisch exprimierte Protein besitzt weiterhin seine Kinaseaktivität, jedoch mit konstitutiver Aktivität und zytoplasmatischer Lokalisation. Auf Grund der Einzigartigkeit des Proteins als auch der pharmakologisch besseren Erreichbarkeit der malignen Lymphozyten, konnte mit dem ersten zugelassenen Wirkstoff Imatinib eine deutliche Verbesserung des Überlebens von CML-Patienten erreicht werden (Druker & Lydon, 2000).

Trotz der guten Resultate in behandelten Patienten mit einer Verbesserung der Überlebensraten wurden bereits früh Resistenzen in Tumorzellen identifiziert, die zur Entwicklung verbesserter Inhibitoren wie Nilotinib geführt haben (Bradeen *et al.*, 2006). Inzwischen wurden weitere Inhibitoren zugelassen, die auch Rezeptortyrosinkinasen als Ziel haben, gegen die ebenfalls monoklonale Antikörper entwickelt wurden. Der Wirkmechanismus der Inhibitoren baut auf der kompetitiven Bindung an die ATP-Bindungsstelle der Kinase oder dem Verhindern der Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen auf, wodurch in beiden Fällen keine Phosphorylierung der Tyrosinseitenketten und somit keine Aktivierung der Signaltransduktion stattfinden kann (Noble *et al.*, 2004).

### 1.2.1.2 Immuntherapie

Die Rolle des Immunsystems in der Karzinogenese ist vor allem in der latenten Phase einer Neoplasie nicht eindeutig geklärt. Der Nachweis einer induzierten Immunantwort in klinisch manifestierten Krebserkrankungen zeigt jedoch eine direkte Reaktion auf die Existenz des Tumors. Die „Immunoediting“-Theorie versucht, den Einfluss des Immunsystems auf die Karzinogenese anhand von drei Phasen, der Eliminierungs- („elimination“), der Gleichgewichts- („equilibrium“) und der Manifestationsphase („escape“), zu erklären (Dunn *et al.*, 2002; Schreiber *et al.*, 2011). Entartete Zellen sollen dabei im Regelfall durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden, wodurch eine lebenslange Tumorfreiheit gewährleistet sein sollte. Das Immunsystem selektiert jedoch auch auf Zellen, die durch Mutationen oder endogene Prozesse eine verringerte Immunogenität besitzen, wodurch sie einen Selektionsvorteil erhalten. Die reduzierte Immunantwort kann noch ausreichend sein, um eine unkontrollierte Zellproliferation und damit eine Manifestation einer Neoplasie zu verhindern (Gleichgewicht). Durch Akkumulation weiterer Mutationen der entarteten Zellen als auch der weiteren Selektion durch die verbleibende Immunantwort ist die Möglichkeit gegeben, dass das Gleichgewicht kippt und somit die klinische Manifestation eines Tumors erfolgt.

Die Immuntherapie verfolgt daher das Ziel, das Immunsystem eines Patienten wieder zu aktivieren, gezielt aktive Immunzellen in den Tumor infiltrieren zu lassen beziehungsweise mit Hilfe von immunologischen Wirkstoffen Tumoren direkt und gezielt anzugreifen und eine langanhaltende Tumorimmunität zu induzieren (Fridman *et al.*, 2011). Krebspatienten, deren Tumoren beziehungsweise Metastasen bei der Diagnose bereits eine hohe Zahl an T-Zell-Infiltraten besaßen,



hatten eine deutlich bessere Überlebensprognose und ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie (Galon *et al.*, 2006; Halama *et al.*, 2009; Pages *et al.*, 2009).

Geeignete Zielstrukturen für die Immuntherapie kennzeichnen sich durch eine exklusive oder deutlich erhöhte Expression in oder auf Tumor- gegenüber Normalzellen aus. Eine funktionelle Rolle in der Karzinogenese kann für die Entwicklung und zur Bestimmung der pharmakologischen Effekte hilfreich sein. Zielstrukturen, die die genannten Kriterien erfüllen, sind neben überexprimierten Oberflächenproteinen auch tumorassoziierte Antigene (TAA), die je nach ihrem Expressionsmuster, Mutationen beziehungsweise Modifizierungen wie veränderter Glykosylierung und ihrer Herkunft z.B. durch virale Integration im Tumor eingeteilt werden (Srinivasan & Wolchok, 2004; van den Broek *et al.*, 2010). Diese von den Tumorzellen exprimierte Proteine induzieren in einigen Patienten eine zelluläre oder humorale Immunantwort (Knuth *et al.*, 1984, Sahin *et al.*, 1995).

Die Identifizierung von TAAs und deren induzierter Immunantwort verdeutlichte, dass im Körper von Krebspatienten spezifische Tumorproteine generiert werden konnten, die nicht der Regulierung durch Toleranzmechanismen unterlagen. Vakzinierungen bauen auf der Injizierung von Tumorzellen beziehungsweise deren Lysaten, tumorassoziierten Antigenen oder Nukleinsäuren auf, um solch eine Immunantwort falls nicht vorhanden zu induzieren oder zu verstärken (Berzofsky *et al.*, 2004). Besonders attraktive Optionen für klinische Anwendungen sind Peptide, deren Aminosäuresequenz MHC I- oder MHC II-Epitope von tumorassoziierten Antigenen wie NY-ESO-1, Survivin oder Tyrosinase darstellt, sowie Plasmide, die für TAAs oder Fragmente von diesen kodieren. Sie sind leicht herzustellen, gut mit anderen Therapien kombinierbar und zeigen geringe Nebenwirkungen (Jäger *et al.*, 2000; Palena & Schlom, 2010). Mittels Adjuvantien wie Chemo- und Cytokinen soll eine Stimulation von Immuneffektorzellen verstärkt werden und durch gezielten Austausch von Aminosäuren in den Peptiden die Immunogenität erhöht werden. Therapieansätze wurden bisher nur in der ersten klinischen Phase untersucht und konnten trotz nachweisbarer Immunantworten keine deutlichen Verbesserungen der klinischen Resultate zeigen, weswegen an Optimierungen wie einer rekombinanten Expression in viralen Partikeln gearbeitet wird (Odunsi *et al.*, 2012).

Die adoptive Immuntherapie, die ebenfalls eine Form der Vakzinierung ist, basiert auf der Infusion von dendritischen Zellen oder T-Zellen, die autolog (patienteneigene Zellen) oder allogene (Zellen eines anderen Spenders) isoliert wurden (Restifo *et al.*, 2012; Palucka & Banchereau, 2012).

Dendritische Zellen interagieren sowohl mit den Zellen der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. Ihre zentrale Rolle ist die Antigenpräsentation für und Immunregulation primär von T-Zellen und in geringerem Maße von B-Zellen. Zur Erhöhung der Effizienz besitzen sie auf ihrer Zelloberfläche eine deutlich erhöhte Anzahl an MHC-Molekülen, zusätzliche T-Zell-kostimulierende Moleküle und schütten nach Bindung einer T-Zelle aktivierende Cytokine wie Interleukin-12 aus. Auf Grund des Potentials, eine tumorspezifische zelluläre und humorale Immunantwort zu induzieren und eine Tumormunität auszubilden, wurden und werden klinische Studien mit hauptsächlich *ex vivo* antigenbeladenen dendritischen Zellen durchgeführt. Diese Antigene müssen im Tumor exprimiert sein, damit die aktivierten T-Zellen die Tumorzellen gezielt angreifen können. Das Therapeutikum

Sipuleucel-T ist ein seit 2010 zugelassener Wirkstoff, der auf einem Fusionsprotein, das ein prostataspezifisches Tumorantigen enthält, aufbaut, mit dem autologe dendritische Zellen inkubiert und anschließend dem Patienten infundiert werden (Kantoff *et al.*, 2010).

Die adoptive T-Zelltherapie verwendet zytotoxische T-Zellen, die unmodifiziert selektiert oder genetisch verändert wurden, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Die Isolierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten aus entnommenem Tumorgewebe ermöglicht die Selektion, Aktivierung und Anreicherung von spezifischen T-Zellen, die anschließend dem Patienten infundiert werden können. Der Grad an tumorinfiltrierenden Lymphozyten hat einen prognostischen Einfluss und variiert zwischen Patienten demnach sehr stark, wodurch bei der Isolierung und einer Selektion potentiell auch keine geeigneten T-Zellklone identifiziert werden können. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden und viralen Vektoren lassen sich zytotoxische T-Zellen gezielt in ihrer Spezifität zu vom Tumor exprimierten Proteinen anpassen. Als Information können Gene von aviditätsgeprüften humanen T-Zellrezeptoren, murinen T-Zellrezeptoren aus MHC-transgenen Mäusen, die mit Tumormaterial immunisiert wurden, sowie chimären Antigenrezeptoren (CAR), die aus einer antigenbindenden variablen Antikörperdomäne und den aktivierenden T-Zellrezeptordomänen bestehen, über ein virales System transferiert werden (Ramos & Dotti, 2011).

Monoklonale konjugierte und nicht konjugierte Antikörper können als Wirkstoffvehikel, zur Blockierung eines Zelloberflächenrezeptors oder zur Auslösung einer komplementabhängigen beziehungsweise antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität („complement-dependent cytotoxicity“, CDC beziehungsweise „antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“, ADCC) fungieren (Scott *et al.*, 2012). Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden können die Antikörper in ihrer Spezifität (Anpassung der „complementary determining region“, CDR), ihrer pharmakokinetischen Parameter (humanisierte Antikörper) und ihrer Funktionsbandbreite (bispezifische Antikörper) verbessert werden (Kashmiri *et al.*, 2005; Chames & Baty, 2009). Monoklonale Antikörper können nur an Zelloberflächenproteine binden, was ihre Einsatzmöglichkeiten einschränkt, da potentielle Therapieziele auch intrazellulär vorliegen. Zu den monoklonalen Antikörpern, die seit mindestens fünf Jahren für die Therapie bestimmter Tumorentitäten zugelassen sind, zählen z.B. Trastuzumab, dessen Zielstruktur der HER2/neu (ErbB2)-Rezeptor ist, und Rituximab, das an das CD20-Molekül von malignen Lymphozyten bindet (siehe auch Tab. 1.2.1).

Die enge Interaktion von Tumorzellen mit dem Tumorstroma erweitert den Fokus möglicher neuer Zielstrukturen auf das gesamte Tumorgewebe und die dort lokalisierten Zelltypen (Hanahan & Weinberg, 2011). Insbesondere Reaktionen und Mechanismen, die die Angiogenese, Entzündungsprozesse, den Umbau der extrazellulären Matrix für die Invasion und Metastasierung sowie die Immunregulierung im Tumormikromilieu umfassen, betreffen das Stroma (Gross & Walden, 2008).

**Tab. 1.2.1: Auswahl einiger derzeit für Therapien genutzter Zielmoleküle zur Behandlung von Krebserkrankungen**

Zielstruktur	Therapeutische Substanz(en)	Wirkmechanismus/ -mechanismen	Angewendet bei (u.a.)	Zulassung	Referenz
HER2/neu	Monoklonaler Antikörper	Blockierung der Signalkaskade	Mammakarzinom, Magenkarzinom	2006 und später	Pegram <i>et al.</i> , 1998
EGF-Rezeptor	Monoklonaler Antikörper/Thyrosinkinaseinhibitor	Blockierung der Signalkaskade	Kolorektales Karzinom, Nicht-Kleinzell Lungenkarzinom	2004 und später	Ferry <i>et al.</i> , 2000; Baselga <i>et al.</i> , 2000
BCR-Abl	Thyrosinkinaseinhibitor	Blockierung der Signalkaskade	Chronische myeloische Leukämie	2001 und später	Druker <i>et al.</i> , 1996
KIT (CD117)	Thyrosinkinaseinhibitor	Blockierung der Signalkaskade	Gastrointestinale Stromatumore	2002	Heinrich <i>et al.</i> , 2000
VEGF und -Rezeptoren	Monoklonaler Antikörper/Thyrosinkinaseinhibitor	Blockierung der Signalkaskade	Kolorektales Karzinom, Nierenzellkarzinom	2004 und später	Margolin <i>et al.</i> , 2001; Strumberg <i>et al.</i> , 2002
CD20	Monoklonaler Antikörper	Apoptoseinduzierung, Komplement/Zell vermittelte Zytotoxizität	Chronische lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphome	1997 und später	Reff <i>et al.</i> , 1994

Als geeignete Zielstrukturen werden die koinhibierenden T-Zellrezeptoren „Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4“ (CTLA-4) und „Programmed death 1“ (PD-1) angesehen, über die in CD8<sup>+</sup>-Effektorzellen Anergie induziert wird (Korman *et al.*, 2006). Durch Bindung der jeweiligen Liganden B7-1/B7-2 beziehungsweise PD-L1, die auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, wird eine kontakt-induzierte Inhibierung der T-Zellen erzeugt. Eine effektive Immunantwort gegen die Tumorzellen wird somit verhindert. Mittels eines anti-CTLA-4-Antikörpers (Ipilimumab) lässt sich die Inhibierung der T-Zellen unterbinden und eine gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort wieder aktivieren.

Im Gegensatz zu den unspezifischen Chemotherapeutika liegt das Potential der zielgerichteten Wirkstoffe darin, eines der Merkmale der Karzinogenese genau angreifen zu können. Inzwischen ist es ein vorrangiges Ziel, mit Hilfe von Kombinationen der zielgerichteten Therapieansätze und weiterer Therapieoptionen das Tumorwachstum zu stoppen und im besten Fall den Patienten zu kurieren. So können z.B. im Kolorektalen Karzinom die Tumor induzierte Angiogenese als auch die durch die Rezeptorüberexpression induzierte Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs mittels monoklonaler Antikörper blockiert werden (siehe Tab. 1.2.1). Die Kombinationstherapie wird jedoch auch als Notwendigkeit angesehen, da trotz zielgerichteter Wirkstoffe Resistenzen gegen diese in Tumorzellen existieren (Nahta & Esteva, 2006).

### 1.3 Biomarker für die Diagnostik, Prädiktion und Prognostik

Die klassischen Diagnose- und Therapieverfahren, ausgenommen der Chemotherapie, erfordern einen makroskopisch nachweisbaren Tumor, sodass Vorläuferläsionen, die Populationen von Zellen mit bereits selektionsfördernden Mutationen im Genom enthalten, keine geeigneten Ziele darstellen (Winter *et al.*, 2013). Für viele Tumorentitäten existieren zudem keine geeigneten

Vorsorgeuntersuchungen, weswegen meist eine späte Diagnose, wenn der Tumor die Malignität erreicht hat, im Rahmen einer allgemeinen Untersuchung bestimmter Symptome erfolgt.

Um eine frühere, auch genauere Diagnose zu ermöglichen, wird der Einsatz von Biomarkern seit den letzten 40-50 Jahren untersucht (Berlin, 1981). Ein biologischer Marker, kurz Biomarker, ist ein Molekül, eine Struktur oder ein Prozess, der/die akkurat im Körper oder einem seiner Produkt gemessen werden kann und eine Aussage über oder Vorhersage zu einer mit ihm verbundenen relevanten Fragestellung ermöglicht (Strimbu & Tavel, 2010). Eine Grundvoraussetzung eines geeigneten Markers ist eine hohe Sensitivität, die Wahrscheinlichkeit eine erkrankte Person korrekt zu identifizieren, und eine hohe Spezifität, gesunde Personen als negativ auszuschließen.

Diagnostische Biomarker können wie folgt gruppiert werden (Fiegl *et al.*, 2005; Bhatt *et al.*, 2010; Madhavan *et al.*, 2012):

- Mutationen in z.B. Tumorsuppressor-/Protoonkogenen, primär bei hereditärer Prädisposition
- spezifische Moleküle wie Nukleinsäuren und Proteine
- zirkulierende Tumorzellen

Zu den spezifischen Molekülen zählen auf Nukleinsäurebasis z.B. DNA und miRNAs und bei den Proteinen z.B. Antikörper und zirkulierende Proteine. Tumorzellen im Blut können auf eine Metastasierung eines soliden Tumors hindeuten.

Ein Ziel bei der Gewinnung von Nachweismaterial für die Biomarker ist ein einfacher und nicht-invasiver Zugang. Als geeignete Quellen werden daher Blut, Urin/Stuhl, Speichel und Sputum angesehen (Berlin, 1981). Eine Biopsie im Rahmen einer endoskopischen beziehungsweise endosonografischen Untersuchung stellt einen direkten, wenn auch kleinen Eingriff dar, mit dem sich spezifisches Gewebematerial gewinnen lässt, setzt jedoch eine makroskopische Größe des Tumors voraus.

Forschung und klinische Studien konnten einige im Blut oder Gewebe nachweisbare Biomarker identifizieren, die sich in der Diagnostik, Prädiktion und Prognostik von verschiedenen Krebserkrankungen eignen (siehe Tab. 1.3.1). Allerdings erfüllte bisher kein Biomarker die oben genannten Spezifitäts- und Selektivitätskriterien, um als alleiniges Diagnoseverfahren eingesetzt zu werden. Insbesondere die Aussagekraft und der Nutzen des Nachweises des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) ist umstritten (Andriole *et al.*, 2012; Schröder *et al.*, 2012). Entsprechend werden Biomarker als unterstützendes diagnostisches Hilfsmittel angesehen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2013) und finden daher primär Anwendung als prognostische beziehungsweise prädiktive Merkmale.

Weitere Anwendungsbereiche der Marker stellen zum einen die Überprüfung des Therapieverlaufs und zum anderen die regelmäßige Kontrolle eines kurierten Krebspatienten auf ein mögliches Rezidiv dar (Eisenhauer, 2011; Sharma *et al.*, 2012). In diesen Fällen erlaubt die Veränderung des Biomarkermesswerts aufwändigere Diagnoseverfahren bei Bedarf nachzuschalten.

**Tab. 1.3.1: Auswahl einiger derzeit eingesetzter Biomarker für die Diagnose und Prognose von Krebserkrankungen**

Marker	Nachweisquelle	Nachweis für	Prognostische/prädiktive Relevanz in	Beschrieben in
PSA	Serumprotein	Prostatakarzinom		Williams <i>et al.</i> , 1979; Catalona <i>et al.</i> , 1991
CEA	Serumprotein		Mammakarzinom, Kolorektales Karzinom	Mansour <i>et al.</i> , 1983
AFP	Serumprotein	Hepatozelluläres Karzinom	Keimzelltumoren	Adinolfi <i>et al.</i> , 1975; Williams <i>et al.</i> , 1980
uPA/PAI1	Serumprotein		Mammakarzinom	Markus <i>et al.</i> , 1980; de Vries <i>et al.</i> , 1994
ER/PR	Histologisches Schnittpräparat		Mammakarzinom	Engelsman <i>et al.</i> , 1973; Garola <i>et al.</i> , 1977
CA 15-3 (MUC1)	Serumprotein		Mammakarzinom	Colomer <i>et al.</i> , 1986; Buamah <i>et al.</i> , 1993
HER2/neu	Histologisches Schnittpräparat		Mammakarzinom, Magenkarzinom	King <i>et al.</i> , 1985; Wright <i>et al.</i> , 1989
Kras	Genomische DNA aus Gewebe		Kolorektales Karzinom, Nicht-Kleinzell Lungenkarzinom	Bos <i>et al.</i> , 1987; Rodenhuis <i>et al.</i> , 1987

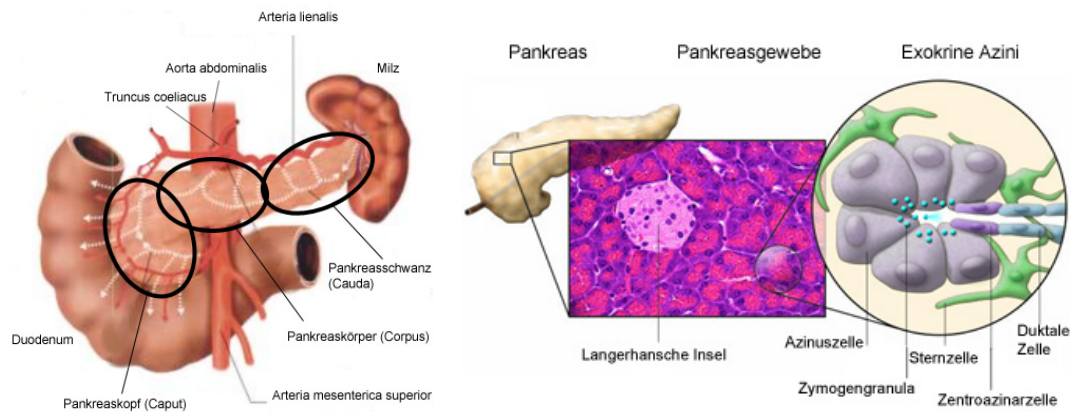
Die Verfügbarkeit spezifischer Wirkstoffe als neue Therapieansätze führt zum Einsatz dieser Marker für Therapieentscheidungen, um damit die Patientengruppen für einen größtmöglichen Therapieerfolg gezielt zu stratifizieren (Kaufmann *et al.*, 2011).

#### 1.4 Das Pankreas und Typen von Pankreaskarzinomen

Das Pankreas (beziehungsweise die Bauchspeicheldrüse) ist ein für den enzymatischen Nährstoffverdau und den Hormonhaushalt wichtiges Drüsenorgan, das retroperitoneal (hinter dem Bauchfell) quer im Oberbauch liegt (Siewert, 2001). Das Organ wird in drei anatomische Bereiche eingeteilt: Kopf (*Caput*), Körper (*Corpus*) und Schwanz (*Cauda*) (siehe Abb. 1.4.1). Der Kopf liegt dabei in der Schleife des Duodenums (Zwölffingerdarm), der Körper über der *Aorta abdominalis* (Bauchschlagader) und der Schwanz nahe der Milz. Es besteht eine direkte Verbindung des Hauptausführungsgangs (*Ductus pankreaticus*) zum Duodenum über die Duodenalpapille, über die sekretierte Verdauungsenzyme eingeleitet werden.

Das Pankreas besitzt einen exokrinen und endokrinen Drüsenanteil, die sich histologisch deutlich voneinander unterscheiden, jedoch gemischt in charakteristischen Läppchen vorliegen (siehe Abb. 1.4.1).

Den endokrinen Anteil bilden die Langerhansschen Inseln, die aus spezialisierten Zelltypen bestehen. Hierzu gehören mit dem jeweiligen sekretierten Produkt  $\alpha$ -Zellen (Glukagon),  $\beta$ -Zellen (Insulin),  $\delta$ -Zellen (Somatostatin),  $\epsilon$ -Zellen (Ghrelin) und PP-Zellen (pankreatisches Polypeptid). Die primären Aufgaben umfassen die hormonelle Regulation des Blutzuckerspiegels und die sekretorische Regulation des Pankreas.



**Abb. 1.4.1: Lage und anatomische Einteilung des Pankreas (links), Aufbau des Pankreasgewebes und der exokrinen Drüsen (rechts).** Erläuterungen im Text (modifiziert aus Siewert, 2001 und Omary *et al.*, 2007).

Der größere Teil der Zellen ist in exokrinen Drüsen zusammengefasst, die Vorstufen von Verdauungsenzymen wie Trypsin, Peptidasen, Ribonukleasen, Lipasen und Amylase produzieren. Diese werden in Azinuszellen synthetisiert und in Form eines serösen Sekrets abgegeben. Einige der Zellen sind jeweils zu Azini zusammengefasst, die sich einen Dukt (ausführenden Gang), der durch duktale Zellen gebildet wird, teilen (siehe Abb. 1.4.1). Die Verbindung zwischen den Azini und den Dukten wird durch Zentroazinarzellen hergestellt. Außerhalb dieses Systems, jedoch zum exokrinen Teil zugehörig, sind myofibroblastenähnliche pankreatische Sternzellen („pancreatic stellate cells“, PSC) als das Bindegewebe modulierende Zellen angesiedelt, die meist inaktiv sind und unter diesen Bedingungen in Lipidkörpern Retinol speichern (Omary *et al.*, 2007).

Tumore des Pankreas können in allen funktionellen Bereiche des Organs entstehen (Siewert *et al.*, 2010). Entsprechend ihres (vermuteten) Ursprungs werden sie in Tumore exokrinen und Tumore neuroendokrinen Ursprungs eingeteilt.

Neuroendokrine Tumore sind selten und betreffen weniger als 5 % aller Diagnosen eines Pankreaskarzinoms (Chen *et al.*, 2012). Jede der spezifischen Zellen des endokrinen Anteils kann entarten und einen nach dem jeweiligen synthetisierten Hormon benannten Tumor bilden. Ein Großteil dieser Tumoren ist weiterhin funktionell aktiv. Die Überlebensraten von Patienten mit diesen Tumortypen sind besser als bei Patienten mit Tumoren exokrinen Ursprungs.

Über 95 % der Pankreaskarzinome nehmen ihren Ursprung in entarteten Zellen des exokrinen Anteils. Es existiert eine Vielzahl von histologischen Klassifikationen für benigne und maligne Tumortypen, wobei diejenigen, die in die Gruppe der Zystadenokarzinome oder Azinuszellkarzinome fallen, prozentual einen sehr kleinen Teil der Diagnosen umfassen (Siewert *et al.*, 2010). Die am häufigsten gestellte Diagnose lautet auf ein pankreatisches duktales Adenokarzinom.

## 1.5 Pankreatisches duktales Adenokarzinom (PDAC)

Das pankreatische duktales Adenokarzinom („pancreatic ductal adenocarcinoma“, PDAC) ist mit über 80 % der Fälle der am häufigsten diagnostizierte Tumortyp des Pankreas mit einer hohen Letalität auf

Grund der späten Diagnose (siehe Kap 1.5.3) (Siewert *et al.*, 2010). Erschwerend für eine kurative Behandlung wirken die hohe Malignität und Invasivität dieses Tumortyps. Mit etwa 80 % ist der Großteil der Tumore im Pankreaskopf lokalisiert.

### **1.5.1 Pathogenese**

Der chronologische Ablauf der Tumorprogression für das pankreatische duktales Adenokarzinom ist noch nicht vollständig aufgeklärt, da vor allem in der Initiationsphase die Mechanismen nicht ausreichend erforscht sind. Auf Grund der duktales Strukturen, die die Tumorzellen formen, nahm man zuerst an, dass duktales Zellen deren Vorläuferzellen entsprechen (Brembeck *et al.*, 2003). Anhand von Mausmodellen, in denen Vorläuferläsionen induziert wurden, werden nunmehr Azinuszellen beziehungsweise Zentroazinarzellen als metaplastische Initiatoren der Karzinogenese angesehen (De la O *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012).

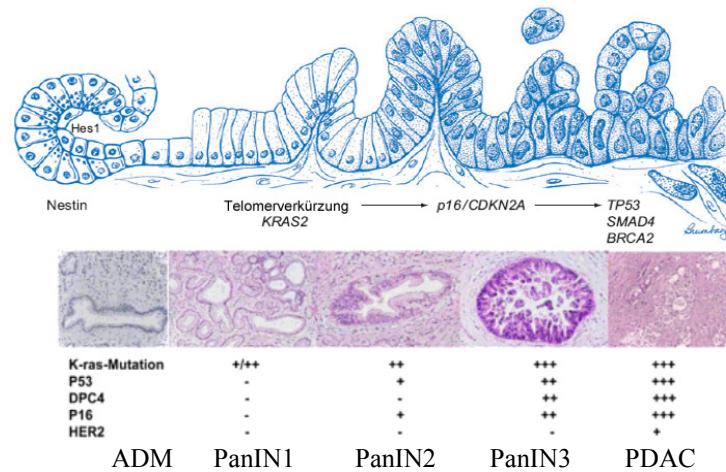
Als Vorläuferläsionen eines Adenokarzinoms im Pankreas sind primär drei Typen einer Dysplasie/Neoplasie bekannt (Maitra *et al.*, 2005):

- Intraduktal papillär muzinöse Neoplasie (IPMN)
- Muzinös zystische Neoplasie (MCN)
- Pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN)

Die Tumorprogression ist für die PanIN im Mausmodell am besten untersucht (siehe Abb. 1.5.1). Ausgehend von Azinuszellen kann eine azinär-duktales Metaplasie (ADM) eintreten. Hierbei wandeln sich Azinuszellen morphologisch und von ihrem Genexpressionsmuster in duktales Zellen um und verlieren somit ihre sekretorische Funktion (De la O *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2012). Die initiierten molekularen Ursachen für diesen Dedifferenzierungsprozess sind jedoch unklar und der temporale Zusammenhang zwischen einer Kras-Mutation und der Aktivierung verschiedener Signalwege wie dem Hedgehog-, dem Notch- und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg nicht eindeutig geklärt (Morris *et al.*, 2010). Die Existenz einer langjährigen chronischen Pankreatitis (CP) kann auf Grund des dauerhaften Entzündungszustandes ein auslösender Faktor der ADM sein, jedoch ist dies nicht eindeutig belegt.

Ausgehend von der ADM können die redifferenzierten duktales Zellen bei Vorliegen der entsprechenden Signale in den Prozess der dreistufigen intraepithelialen Neoplasie (PanIN1A/B-3) eintreten, in dem die Zellpolarität verloren geht und es zu einer Akkumulierung weiterer Genveränderungen kommt.

Die häufigsten Veränderungen sind in Tabelle 1.5.1 zusammengefasst. Sowohl in der IPMN als auch der PanIN treten Mutationen in den gleichen Genen mit ähnlicher Häufigkeit auf (Yonezawa *et al.*, 2008). Die MCN wird primär bei Frauen, insgesamt jedoch seltener diagnostiziert. Hier sind die molekularen Faktoren noch nicht hinreichend bekannt.



**Abb. 1.5.1: Tumorprogressionsmodell für die Entstehung eines PDAC aus Azinuszellen.** Dieses Modell betrachtet den Übergang von epithelialen Azinuszellen über eine azinär-duktales Metaplasie (ADM), die Stufen der pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) zum Adenokarzinom. Typische mutierte beziehungsweise überexprimierte Gene der einzelnen Phasen sind gekennzeichnet (modifiziert aus Maitra & Hruban, 2008 und Siewert *et al.*, 2010).

Ein weiteres Charakteristikum ist die veränderte Expression verschiedener Mucin-Gene (*MUC1-6*), die sich zwischen den Typen der Neoplasien unterscheidet und somit eine Differenzierung ermöglichen würde (Yonezawa *et al.*, 2008). Mucine stellen eine Klasse von Membran assoziierten oder sekretierten Glykoproteinen dar, die als tumorassoziierte Antigene ein hohes wissenschaftliches und klinisches Interesse für immuntherapeutische Ansätze erfahren haben (Davidson *et al.*, 1988; Wittel *et al.*, 2001). In PanIN wird häufig *MUC3* überexprimiert, dagegen ist *MUC2* besonders in IPMN überexprimiert. Die Expression von *MUC1* und *MUC4* steigt über die Stufen der PanIN bis hin zum Pankreaskarzinom stetig an (Singh *et al.*, 2007, Yonezawa *et al.*, 2008). *MUC5* ist in allen Neoplasien und im PDAC häufig überexprimiert.

**Tab. 1.5.1: Im Zusammenhang mit der Tumorgenese eines Pankreasadenokarzinoms beschriebene Genveränderungen** (nach Maitra & Hruban, 2008 und Yonezawa *et al.*, 2008)

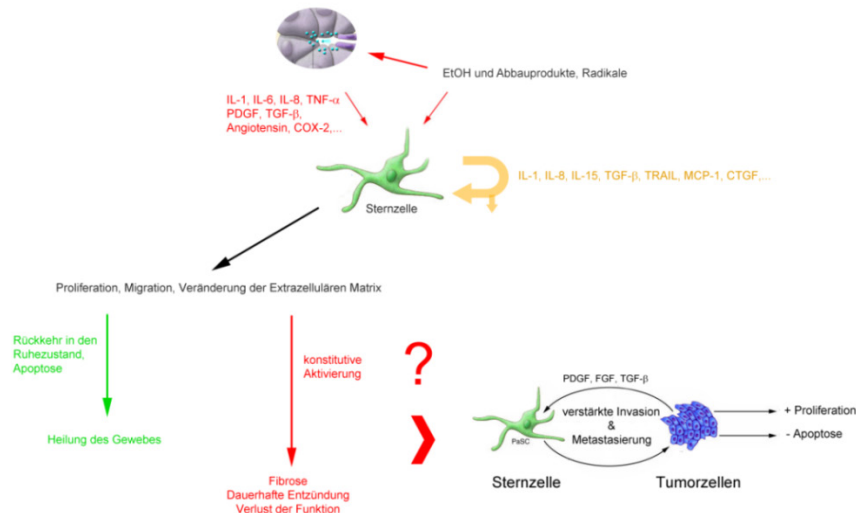
Gen	Mutationsart	Mutationshäufigkeit	Beschrieben in
<i>Kras2</i>	Konstitutiv aktiviert	über 90 % im PDAC	Caldas & Kern, 1995
<i>EGFR</i>	Überexprimiert	mind. 50 % im PDAC	Tobita <i>et al.</i> , 2003
<i>HER2/neu</i>	Überexprimiert	ca. 60 % im PDAC	Yamanaka <i>et al.</i> , 1993
<i>TP53</i>	Inaktivierung	50-75 % im PDAC	Redston <i>et al.</i> , 1994
<i>CDKN2A</i>	Deletierung/Inaktivierung	80-90 % im PDAC	Schutte <i>et al.</i> , 1997
<i>SMAD4</i>	Deletierung/Inaktivierung	ca. 55 % im PDAC	Hahn <i>et al.</i> , 1996
<i>BRCA2</i>	Deletierung/Inaktivierung	ca. 10 % im PDAC	Goggins <i>et al.</i> , 1996

Der Übergang von den genannten Neoplasien, insbesondere der PanIN, zu einem PDAC ist ein zeitlich und räumlich nicht abgegrenzter Prozess, bei dem das Adenokarzinom nach unterschiedlich langer Zeit und benachbart zu der Neoplasie auftreten kann (Brat *et al.*, 1998, Maitra & Hruban, 2008). Ebenso variiert der Grad der Invasivität.

Verbunden mit dem Auftreten einer Neoplasie und insbesondere im Stadium des PDAC ist eine ausgeprägte Desmoplasie des umgebenden Gewebes (Maitra & Hruban, 2008). Dieses Tumorstroma



trägt mit zur Tumorentstehung bei, indem entzündliche und angiogenetische Prozesse ein für die Tumorzellen vorteilhaftes Milieu schaffen (Chu *et al.*, 2007). Verantwortlich hierfür sind mesenchymale Zellen, aus denen u.a. krebsassoziierte Fibroblasten und Perizyten differenzieren, sowie Makrophagen und Neutrophile. Eine besondere Rolle hinsichtlich des radikalen Umbaus der extrazellulären Matrix wird den pankreatischen Sternzellen zugesprochen, die bei Entzündungsprozessen des Pankreas aktiviert werden (siehe Abb. 1.5.2) (Apte *et al.*, 2012; Erkan *et al.*, 2012).



**Abb. 1.5.2: Aktivierung und Rolle der pankreatischen Sternzellen bei fibrotischen Prozessen und Interaktionen mit Tumorzellen (modifiziert nach Omary *et al.*, 2007).** Die Verbindung zwischen einer CP und einem daraus resultierenden Tumor konnte bisher nicht gezeigt werden. Weitere Erklärungen im Text.

Als Signalmoleküle für die Zellen dienen u.a. Ethanol und seine Abbauprodukte, Radikale und ausgeschüttete Cytokine der umliegenden Zellen. Die PSC initiieren fibrotische Prozesse der Pankreatitis, die im Allgemeinen bei Verlust des aktivierenden Signals repariert werden. Bei länger vorliegender Signalexposition kann es jedoch zu einer konstitutiven Aktivierung der Zellen und einer unumkehrbaren Fibrose kommen, die sich in einer chronischen Pankreatitis manifestiert. Inwieweit diese Aktivierung, die Sekretion von Chemo- und Cytokinen und der zelluläre Stress der fibrotischen Prozesse eine Tumorentstehung fördern können, ist bisher unklar. Jedoch interagieren Tumorzellen und PSC durch gegenseitige Aktivierung, die mit einer höheren Invasivität und Metastasierung des Tumors verbunden ist (Xu *et al.*, 2010; Apte *et al.*, 2012).

### 1.5.2 Ätiologie und Inzidenz

Das PDAC ist eine primär altersabhängige Krebserkrankung, deren Risiko durch bestimmte Lebens- und Konsumweisen moduliert werden kann und die nur zu einem geringen Teil von hereditären Faktoren abhängt (Siewert *et al.*, 2010).

Der Hauptteil der mit PDAC diagnostizierten Patienten ist den Statistiken einiger Industrieländer zufolge über 50 Jahre alt (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage, 2012; Ferlay *et al.*, 2010). Der Altersmedian der PDAC-Patienten beträgt ca. 70 Jahre bei Männern und 76 Jahre bei Frauen in

Deutschland mit nahezu identischen Daten in den USA und Großbritannien. Das Lebenszeitrisko für PDAC liegt bei ca. 1,5 - 2 %.

Als statistisch gesichert gilt, dass Tabakkonsum das Risiko, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, verdoppelt (Maitra & Hruban, 2008; Klein, 2013). Weitere negativ beeinflussende Faktoren sind Adipositas, Diabetes mellitus Typ2 und eine chronische Pankreatitis. Letztere tritt häufig bei Menschen mit übermäßigem Alkoholkonsum auf. Jedoch konnte bisher, auch auf Grund des unklaren initiiierenden Mechanismus eines Pankreaskarzinoms, kein Zusammenhang zu diesem Faktor hergestellt werden (siehe Kapitel 1.5.1).

Eine hereditäre Prädisposition, die ausschließlich das PDAC-Risiko erhöht, existiert nicht, allerdings führen Mutationen in Genen, die auch für andere Erkrankungen beschrieben sind, zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung (siehe Tab. 1.5.2) (Maitra & Hruban, 2008; Klein, 2013).

**Tab. 1.5.2 : Gene, die in mutierten Varianten mit einer familiären Prädisposition für PDAC und andere Erkrankungen in Zusammenhang stehen**

Gen(e)	Funktion	Erhöhung des relativen PDAC-Risikos	Relevant bei anderen Erkrankungen	Beschrieben in
<i>BRCA1/2</i>	DNA-Reparatur und -Rekombination	> 2x	u.a. Mammakarzinom, Ovarialkarzinom	Duncan <i>et al.</i> , 1998; Goggins <i>et al.</i> , 1996; Lynch <i>et al.</i> , 2005
<i>CDKN2A</i>	Zellzyklusregulation	> 20x	Melanom, Leukämie	Nobori <i>et al.</i> , 1994; Caldas <i>et al.</i> , 1994
<i>PRSS1</i>	Proteinverdau	> 50x	Pankreatitis	Creighton <i>et al.</i> , 2000; Lowenfels <i>et al.</i> , 1997
<i>STK11</i>	Zellpolarität, Homöostase	~ 130x	u.a. Peutz-Jeghers Syndrom, Gastrointestinal- und Kolorektalkarzinom	Hemminki <i>et al.</i> , 1998; Lim <i>et al.</i> , 2004
<i>ATM</i>	Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur	mind. 2x	Mammakarzinom, Leukämien	Li <i>et al.</i> , 2000; Roberts <i>et al.</i> , 2012
<i>PALB2</i>	DNA-Reparatur und -Rekombination	mind. 2x	Mammakarzinom	Xia <i>et al.</i> , 2006; Jones <i>et al.</i> , 2009
<i>hMLH1-3, hMSH2</i>	DNA-Reparatur	2 - 6x	Hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom	Guerrette <i>et al.</i> , 1999

Einige der identifizierten Gene sind als Risikofaktoren anderer Krebserkrankungen beschrieben und stehen zum Teil funktionell im Zusammenhang. So interagieren breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1) und type 2 susceptibility protein (BRCA2) und Partner and localizer of BRCA2 (PALB2) als ein DNA-Reparatur- und Rekombinationskomplex (Xia *et al.*, 2006). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ist ebenso an der DNA-Reparatur beteiligt, indem es als Serin-Threonin-Kinase die Aktivität von Zielmolekülen wie z.B. BRCA1 reguliert (Li *et al.*, 2000).

Einige der Gene wie z.B. *BRCA1 & 2* oder *CDKN2A*, die das Erkrankungsrisiko für ein Pankreaskarzinom erhöhen, sind im Verlauf der Tumorprogression der neoplastischen Stadien ebenso von Veränderungen betroffen (siehe Tab. 1.5.1).

Weltweit steht das Pankreaskarzinom mit ca. 280 000 diagnostizierten Patienten pro Jahr an 12. Stelle aller Krebserkrankungen (Ferlay *et al.*, 2010) und scheint im Vergleich zu den häufigsten Tumorentitäten des Lungen-, Mamma- und Kolorektalkarzinoms mit über einer Million an Diagnosen pro Jahr eine untergeordnete Rolle zu spielen. Hinsichtlich der krebisbedingten Sterbefälle werden für

das Pankreaskarzinom jedoch jährlich über 265 000 Fälle erfasst, wodurch dieses die acht häufigste Ursache ist und somit die Letalitätsrate nahe der Inzidenz liegt. Die standardisierte Erkrankungsrate liegt für Männer etwa 25-30 % höher als für Frauen.

In Deutschland wurde im Jahr 2008 bei etwa 15 000 Menschen ein Pankreaskarzinom diagnostiziert mit einem identischen Verhältnis zwischen Männern und Frauen. Das Pankreaskarzinom lag damit an 10. Stelle aller Krebserkrankungen. Im gleichen Beobachtungszeitraum verstarben jedoch auch knapp 15 000 PDAC-Patienten, was der viert häufigsten Todesursache aller Krebserkrankungen entsprach und die Fatalität dieser Tumorerkrankung unterstreicht (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage, 2012). Eine vergleichbare Verteilung von Inzidenz und Letalität ist z.B. auch in Großbritannien und den USA zu beobachten (Ferlay *et al.*, 2010).

Der Hauptgrund für diese international identischen Statistiken liegt in der späten Diagnose und unzureichender Therapie des Tumors, die im folgenden Kapitel erläutert werden.

### ***1.5.3 Diagnose und Therapieoptionen***

Eine Vorsorgeuntersuchung oder frühe Diagnosemöglichkeit für PDAC besteht nicht. Bei einer familiären Prädisposition lassen sich mit heutigen Methoden leicht Sequenzierungen der betreffenden Gene (siehe Tab. 1.5.2) durchführen. Auf Grund des erhöhten Risikos auch für andere Tumorerkrankungen lassen sich bei positiven Ergebnissen entsprechende Untersuchungspläne ausarbeiten (Siewert *et al.*, 2010). In klinischen Studien hat sich zudem in dieser Gruppe der Einsatz der Endosonographie für eine präventive Diagnostik als vielversprechend dargestellt (Klein, 2013).

Im Regelfall wird ein sporadisch auftretendes Pankreaskarzinom zufällig im Zusammenhang mit diagnostischen Maßnahmen zur Überprüfung eines Ikterus (Gelbsucht), der durch den Verschluss des Gallenganges durch einen Tumor im Pankreaskopf verursacht werden kann, einer unbegründbaren Gewichtsabnahme mit Übelkeit und Erbrechen, von unspezifischen Schmerzen im Bauchraum und Rücken durch Befall neuraler Strukturen sowie einer neu aufgetretenen Diabetes mellitus Typ 2 erkannt (Siewert *et al.*, 2010; Deutsche Krebsgesellschaft, 2013). Verfahren zur gezielten Diagnose eines Pankreaskarzinoms sind nach Anamnese und körperlicher Untersuchung eine Sonographie und die Bestimmung der Werte für Lipase, Amylase, alkalische Phosphatase, Bilirubin und Transaminasen und der Tumormarker CEA und CA 19-9. Röntgen, Computer- und Magnetresonanztomographie sowie Endosonographie können Daten zur Größe und Metastasierung des Tumors liefern.

Die Stadieneinteilung („Staging“) eines Pankreaskarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation durch das American Joint Committee on Cancer (AJCC) (siehe Tab. 1.5.3 und 1.5.4).

**Tab. 1.5.3: Stadieneinteilung für Pankreaskarzinome**

Stadium	Substadium	T	N	M
0		Tis	N0	M0
I	Ia	T1	N0	M0
	Ib	T2	N0	M0
II	IIa	T3	N0	M0
	IIb	T1/T2/T3	N1	M0
III		T4	alle N	M0
IV		alle T	alle N	M1

Dabei entsprechen die einzelnen Klassifikationen folgender Definition:

**Tab. 1.5.4: TNM-Klassifikation**

Klassifikator	Grad	Beschreibung
T (Tumorgroße)	Tx	Primärtumor nicht zugänglich/unbekannt
	T0	Kein Primärtumor
	Tis	Karzinom <i>in situ</i> (auch PanINIII)
	T1	Primärtumor auf Pankreas begrenzt und maximal 2 cm Durchmesser
	T2	Primärtumor auf Pankreas begrenzt und über 2 cm Durchmesser
	T3	Invasiver Primärtumor ohne Beeinflussung des Bauchhöhlenstammes
	T4	Invasiver Primärtumor mit Beeinträchtigung des Bauchhöhlenstammes
N (Lymphknotenmetastasen)	Nx	Lokale Lymphknoten nicht zugänglich
	N0	Lokale Lymphknoten ohne Metastasen
	N1	Lokale Lymphknoten mit Metastasen
M (Fernmetastasen)	M0	Fernmetastasen nicht vorhanden
	M1	Fernmetastasen vorhanden

Die Therapie der Wahl bei einem Pankreaskarzinom ist die kurative Resektion des Tumor- und zum Teil angrenzenden Gewebes und umfasst meist den Pankreaskopf und das Duodenum. Jedoch kommen hierfür nur ca. 20 - 25 % der Patienten anhand der Tumorgroße und -metastasierung in Frage, für die gute Prognosen bestehen (Siewert *et al.*, 2010; Rau *et al.*, 2012). Je früher daher ein Pankreaskarzinom beziehungsweise eine nicht invasive Neoplasie erkannt wird, desto höher stehen die Heilungschancen.

Eine neoadjuvante Chemo- oder Radiochemotherapie erfolgt nur bei einem kleinen Teil der Patienten, für die durch ein therapievermitteltes Schrumpfen des Tumors eine Resektion in Frage käme. Hingegen wird eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabin und/oder 5-Fluoruracil-Folinsäure nach einer Resektion empfohlen.

Für die palliative Erstlinientherapie des fortgeschrittenen pankreatischen duktales Adenokarzinoms, bei dem eine Operation auf Grund des Invasivitäts- und Metastasierungsgrades keine Option darstellt, werden als Wirkstoffe derzeit primär das Chemotherapeutikum Gemcitabin (Storniolo *et al.*, 1999), seit 2005 auch in Kombination mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib (Moore, 2005) mit einer leichten Verbesserung der medianen Gesamtüberlebenszeit, eingesetzt. Trotzdem liegt diese bei unter sieben Monaten und die 1-Jahresüberlebensrate bei 25 %. Klinische Studien mit Kombinationen von Gemcitabin und anderen Chemotherapeutika wie 5-Fluoruracil oder Cisplatin erbrachten nur minimale oder keine positiven Effekte auf das Überleben oder den Krankheitsverlauf (Moore, 2005; Heinemann *et al.*, 2006). Gemcitabinfreie Kombinationen können das Überleben von Patienten mit guter körperlicher Verfassung jedoch verlängern (Lowery & O'Reilly, 2012)

Erlotinib inhibiert den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor („epidermal growth factor receptor“, EGFR) durch die reversible Blockierung von dessen ATP-Bindungsstelle. Die weitere Signaltransduktion des EGFR-MAP-Kinase-Signalwegs wird dadurch verhindert, da die Autophosphorylierung nicht mehr stattfinden kann, für die ATP notwendig ist (Wakeling *et al.*, 1996). Inwieweit der von Erlotinib inhibierte Signalweg im PDAC auf Grund der häufig detektierten mutierten Kras-Kinase, die in diesem Signalweg beteiligt ist, eine gutes Therapieziel mit entsprechendem Ergebnis in den Überlebenszeiten darstellt, kann bisher nicht eindeutig beantwortet werden (Boeck *et al.*, 2013).

### 1.5.4 Deregulierte Signalwege mit einer potentiellen Relevanz in der Karzinogenese des PDAC

In der Embryo- und Fetogenese des Pankreas spielen die Notch-, Hedgehog und Wnt-Signalwege eine zentrale Rolle bei der Differenzierung sowohl der endo- als auch exokrinen Zellpopulationen (Apelqvist *et al.*, 1999; Hebrok *et al.*, 2000; Murtaugh *et al.*, 2005). Mausmodelle, in denen zentrale Gene der Signalwege ausgeschaltet waren, entwickelten kein funktionales Gewebe.

Die embryonalen Signalwege, die im adulten Organismus herunterreguliert sind, liegen in Tumoren häufig dereguliert vor und werden daher als ein Merkmal der Karzinogenese angesehen. Für das Pankreaskarzinom konnten verschiedene Studien einen Einfluss hinsichtlich des Tumorwachstums im Mausmodell belegen (Pasca di Magliano *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2010). Für die Entstehung von Vorläuferläsionen beziehungsweise dem PDAC sind die Signalwege allein nicht als ursächlich beschrieben, scheinen diese jedoch in Kombination mit Mutationen z.B. im *Kras*-Gen positiv zu beeinflussen (siehe Abb. 1.5.3).

Eine Aktivierung der Signalwege in den PanIN-Stadien kann die Progression zum PDAC verstärken. Der Effekt der Deregulation ist jedoch nicht nur auf die neoplastischen Zellen beschränkt, sondern involviert ebenfalls das Stroma. So besitzt der Wnt-Signalweg ebenfalls einen Einfluss auf die desmoplastische Reaktion, die von den pankreatischen Sternzellen ausgeht (Froeling *et al.*, 2011).

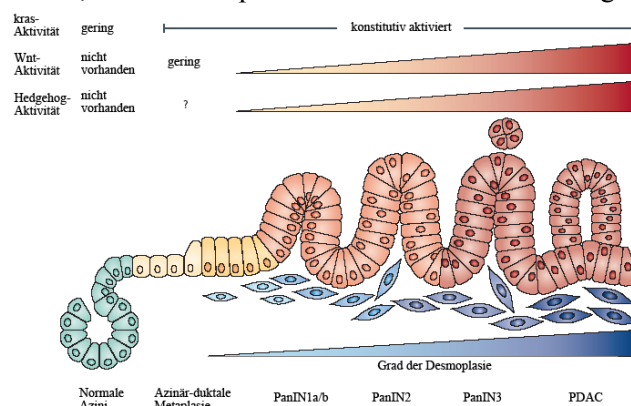


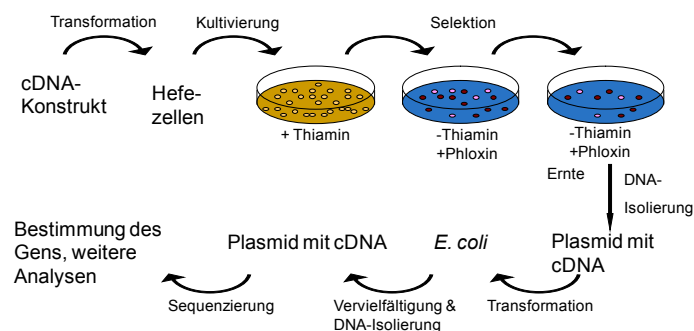
Abb. 1.5.3: Signalwege mit einer Relevanz in der Karzinogenese des PDAC und ihrer temporalen Aktivierung in prä-malignen Stadien (modifiziert nach Morris *et al.*, 2010). Weitere Erläuterungen im Text.

## 1.6 Funktionelles Hefe-„Screening“ zur Identifizierung potentieller Biomarker und Therapiezielstrukturen im PDAC

Experimentelle Studien mit humanem Tumorgewebe ermöglichten die Identifizierung von relevanten Biomarkern und Therapiezielstrukturen wie z.B. den tumorassoziierten Antigenen. Diese immunogenen Proteine wurden anhand autologer Methoden wie SEREX („serological identification of antigens by recombinant expression cloning“) beschrieben (Sahin *et al.*, 1995). Das SEREX-„Screening“ kann jedoch auch mit allogenen Proben durchgeführt werden, um ein größeres Patientenkollektiv zu untersuchen. Durch Verbesserungen in proteinbiochemischen Methoden wie 2D-Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie wurde das SEREX-Prinzip abgewandelt (Rauch & Gires, 2008)

Das „Yeast Survival Screening“ der AG Zörnig (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) erlaubt die Identifizierung von potentiell anti-apoptotischen Proteinen, die in humanen Tumoren exprimiert werden. Dieses etablierte System nutzt zwei Hefestämme, in denen sich die apoptotische Kaskade durch Medienwechsel induzieren lässt (siehe Abb. 1.6.1) (Brezniceanu *et al.*, 2003).

Aus resezierten Tumoren erfolgt die Isolierung der mRNA, um cDNA-Banken des Gewebes herzustellen. Somit werden alle tumorspezifisch exprimierten Genprodukte abgebildet. Der verwendete Vektor enthält einen thiaminregulierten Promotor, der die Expression der codierenden Sequenz bei Vorliegen von Thiamin unterdrückt. Durch Entfernung des Thiamins aus dem Kulturmedium wird die Apoptose sowie die Expression des cDNA-codierten Gens induziert. Die in die Zellen transformierten cDNA-Konstrukte, die die induzierte Apoptose blockieren, führen somit zum Überleben der Zellen („yeast survival“), und die cDNA-Konstrukte können anschließend sequenziert werden.



**Abb. 1.6.1: Prinzip des funktionellen Hefe-„Screenings“**

Das „Screening“ ist eine geeignete Methode zur Identifizierung potentiell anti-apoptotischer Proteine, von denen z.B. die Proteine HMGB1, Aven als auch die nicht kodierende RNA *Malat-1* hinsichtlich dieser Funktion evaluiert wurden (Brezniceanu *et al.*, 2003; Rabenhorst *et al.*, 2009; Eißmann *et al.*, 2012). Das Screening kann möglicherweise auch dazu dienen, potentiell als Biomarker und Therapieansatzpunkte geeignete Gene zu identifizieren. Die „Screening“-Daten von cDNA-Banken von Melanom- und Pankreaskarzinomgewebe wurden hierfür als Grundlage verwendet.

## 1.7 Zielsetzung

Das pankreatische duktale Adenokarzinom (PDAC) wird auf Grund seiner unspezifischen Symptomatik häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem der Tumor oft metastasiert und nicht operabel ist. Daher hat das PDAC eine ungünstige Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate in den Industrienationen von ca. 5 %. Damit ist das PDAC die 9.-10. häufigste Krebserkrankung und die 4.-6. häufigste krebisbedingte Todesursache in den Industrienationen. Das PDAC zeichnet sich durch eine hohe Invasivität in angrenzende Gewebe und eine starke desmoplastische Reaktion aus. Derzeit existieren nur unzureichende Therapiemöglichkeiten, besonders bei inoperablen Tumoren. Neue diagnostische und prognostische Biomarker sowie die Entwicklung innovativer Therapiestrategien werden daher dringend benötigt.

Als Biomarker und Zielstrukturen für innovative therapeutische Ansätze gegen Krebserkrankungen sind vor allem gewebespezifisch und differentiell im Tumor exprimierte, immunogene Proteine und/oder extrazellulär lokalisierte Proteine geeignet. Therapiestrategien, die gezielt überexprimierte Strukturen nutzen, die immunmodulatorisch auf das Tumormikromilieu wirken, die Interaktion von Tumor- und Wirtszellen beeinflussen oder eine Stimulierung des körpereigenen Immunsystems gegen Tumorzellen bewirken, zeigen ein großes Potential in der Behandlung von verschiedenen Tumorentitäten. Kombiniert mit gängigen Verfahren wie Chemo- oder Radiotherapie können höhere Überlebensraten erreicht werden.

Die vorliegende Arbeit hatte als Ziel, Proteine, die in tumorspezifischen funktionellen Hefe-„Survival Screenings“ identifiziert wurden, auf ihr Potential zu untersuchen, im PDAC als diagnostische und/oder prognostische Biomarker gemäß den oben genannten Kriterien zu dienen beziehungsweise eine biologische Relevanz zu besitzen.

Um für experimentelle Analysen eine auf die oben genannten Kriterien fokussierte Auswahl an Genen zu treffen, sollten zunächst mittels *in silico*-Analysen die Funktion und Lokalisation sowie bekannte Expressionsmuster der Gene eruiert werden. Durch eine Expressionsanalyse in verschiedenen Normalgeweben und etablierten Tumorzelllinien sollte im nächsten Schritt die gewebespezifische Expression der Gene bestimmt werden. Die selektierten Proteine sollten hinsichtlich ihrer Immunogenität in einer Multiplex-Serologie in einem Serumkollektiv von PDAC-Patienten auf Autoantikörperantworten untersucht werden. Darüber hinaus sollte eine quantitative Genexpressionsanalyse mit RNA-Proben aus Pankreastumorgewebe auf zu Normalproben differentiell exprimierten Gene stattfinden.

Um diagnostisch oder prognostisch relevante Proteine im PDAC zu bestimmen, sollten die Resultate mit Patientendaten korreliert werden. Von ihrer differentiellen Expression her interessante und potentiell im PDAC relevante Proteine sollten biologisch und funktionell charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

Protokolle zu Standardmethoden und Lösungen wurden im Allgemeinen dem Methodenbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook & Russell, 3. Aufl., 2000) entnommen.

### 2.1 Materialien und Proben

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht separat im entsprechenden Kapitel angegeben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), BD Difco (Heidelberg), Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PeqLab (Erlangen), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Thermo Fisher Scientific (Dreieich) bezogen.

Verbrauchsmaterial und Plastikwaren stammten von Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Middleton, USA), Greiner Bio One (Frickenhäuser) und StarLab (Hamburg).

#### 2.1.2 Medien

Tab. 2.1.1: Medien für die Kultivierung von *E. coli*

flüssige Medien für die <i>E. coli</i> -Kultivierung	
Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysogene Broth-Medium (LB-Medium), pH 7,5	Pepton 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 10 g/L
feste Medien für die <i>E. coli</i> -Kultivierung	
LB-Agar	wie LB-Medium jedoch mit 15 g/L Agar

Alle Komponenten wurden in bidest. Wasser gelöst und im Autoklaven bei Standardbedingungen sterilisiert.

Tab. 2.1.2: Medienzusätze

Antibiotika		
Bezeichnung	Konzentration der Stammlösung in mg/mL	Konzentration im Medium in µg/mL
Carbenicillin	100	100
Chloramphenicol	40	40
Blau-Weiß-Screening		
Bezeichnung	Konzentration der Stammlösung in mg/mL	Konzentration im Medium in µg/mL
X-Gal	80	80
IPTG	238,3 (1 M)	238,3

Alle Zusätze durften wegen möglicher Hitzeempfindlichkeit erst nach ausreichender Abkühlung (ca. 45 °C) des autoklavierten Mediums zugegeben werden.



Tab. 2.1.3: Medien für die Zellkultur

Medien für die Zellkultur		
Bezeichnung	Name (Quelle)	Enthaltene Zusätze
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies, Karlsruhe)	GlutaMAX (862 mg/L), Glucose (4,5 g/L), Phenolrot
OptiMEM	Modifiziertes minimales essentielles Kulturmedium (Life Technologies, Karlsruhe)	L-Glutamin, Phenolrot

Tab. 2.1.4: Medienzusätze für DMEM

Allgemeine Zusätze		
Bezeichnung	Ausgangs-/Zielkonzentration	Bemerkungen
Fötales Kälberserum (FCS)	100 % / 10 %	hitzeinaktiviert bei 56 °C / 30 min
Penicillin/Streptomycin	100x / 1x	
HEPES	1 M / 10 mM	
Nicht essentielle Aminosäuren	100x / 1x	
Natriumpyruvat (PAA, Cölbe)	100 mM / 1 mM	

### 2.1.3 Vektoren

Die Vektorkarte für pGEX4T3tag befindet sich im Anhang.

- pGEX4T3: prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase-Sequenz (GE Healthcare, Frankfurt/Main)
- pGEX4T3tag: pGEX4T3-Derivat mit erweitertem Klonierungsbereich und C-terminaler „Host recognition sequence“ des SV40 Large-T-Antigens („tag“)(Sehr et al., 2001)
- pCDNA3.1(+): eukaryotischer Expressionsvektor (Life Technologies, Karlsruhe)
- pCDNA3.1(+):tag: pCDNA3.1(+)-Derivat mit erweitertem Klonierungsbereich und C-terminaler „Host recognition sequence“ des SV40 Large-T-Antigens („tag“)(diese Arbeit)
- pCDNA3.1(+):GFP: pCDNA3.1(-)-Derivat mit erweitertem Klonierungsbereich und C-terminaler „Green Fluorescent Protein“- (GFP)-Sequenz (Rosorius et al., 1999)
- pGEMT-Easy: TA-Klonierungsvektor (Promega, Mannheim)

### 2.1.4 Enzyme

- OptiTaq-Polymerase, 5 U/μL (inkl. Puffersystemen & dNTPs) (Roboklon, Berlin)
- Platinum-Taq-Polymerase, 5 U/μL (inkl. Puffersystem) (Life Technologies, Karlsruhe)
- Superscript III-Reverse Transkriptase, 200 U/μL (inkl. Puffersystem) (Life Technologies, Karlsruhe)
- Restriktionsendonukleasen (inkl. Puffersystemen) (New England Biolabs, Frankfurt/Main): *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *SalI*, *XbaI*, *XhoI*, *NcoI*
- T4-DNA-Ligase, 3 U/μL (inkl. 10x Ligase-Puffer) (Promega, Mannheim)
- PfuPlus!-DNA-Polymerase, 5 U/μL (inkl. Puffersystem) (Roboklon, Berlin)
- *DpnI*-Restriktionsenzym, 1 U/μL (inkl. Puffersystem) (Roboklon, Berlin)
- DNase I, 1 U/μL (inkl. Puffersystem) (Life Technologies, Karlsruhe)

### 2.1.5 Oligonukleotide

Das Zusammenstellen der Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des Programms SeqBuilder (LaserGene Suite, Version 10.1, DNASTar, USA). Die Parameter der Oligonukleotide wurden mittels OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) berechnet und die Spezifität mittels Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) überprüft.

Alle Oligonukleotide wurden von Biospring AG (Frankfurt) bezogen.

**Tab. 2.1.5: Bezeichnungen, Sequenzen, Basenpaarangaben und Schmelztemperaturen der für die Expressionsanalysen verwendeten Oligonukleotide**

Gen	Oligonukleotide (Sequenzen)	Länge [bp]	T <sub>m</sub> [°C]	Produktgröße [bp]
<i>ACSL4</i>	FW: 5'-GGG CAT TCC TCC AAG TAG ACC AAC -3'	24	58,8	350
	RV: 5'-TTT CCG GAA CAG CAG CCA TAA G -3'	22	58,3	
<i>ANXA1</i>	FW: 5'-AGG AAA GCC CCT GGA TGA AAC AC -3'	23	58,8	358
	RV: 5'-ATA CAA GGC CCT GGC ATC TGA ATC -3'	24	59,3	
<i>BMI1</i>	FW: 5'-TGG ATC GGA AAG TAA ACA AAG ACA AAG -3'	27	59,0	400
	RV: 5'-CTG GGG CTA GGC AAA CAA GAA GAG -3'	24	59,4	
<i>C8orf4</i>	FW: 5'-AAG CAA AGC GAA GCC ACC AAG -3'	21	56,3	234
	RV: 5'-CAC GCG TTT TCT CCT CCA CAT C -3'	22	58,2	
<i>CALU</i>	FW: 5'-GTT TCT TAT GTG CCT GTC CCT GTG -3'	24	56,5	465
	RV: 5'-AAC CTC CGC TCA TCT CTA ACC ATC -3'	24	59,5	
<i>CNIH</i>	FW: 5'-ACT GCC GCG CTC ATC TTC TTC -3'	21	58,2	323
	RV: 5'-GCT AAT TTG CAC CAT CCT TTC TTC -3'	24	57,1	
<i>CYR61</i>	FW: 5'-CAG CCC TGC GAC CAC ACC -3'	18	57,0	454
	RV: 5'-TGC GAG GCT CCA TTC CAA AAA C -3'	22	59,9	
<i>GADD45a</i>	FW: 5'-GCG GAC GAG GAC GAC GAC -3'	18	56,2	286
	RV: 5'-ATT GAT CCA TGT AGC GAC TTT C -3'	22	50,3	
<i>GPM6A</i>	FW: 5'-GTT GGC CTG GCT GGG AGT C -3'	19	59,0	327
	RV: 5'-CGG CAG GCG TCT TTC ACA TAG -3'	21	57,1	
<i>HIGD1A</i>	FW: 5'-GGT GTT TCC CTT CCT TCA TAT G -3'	22	54,2	228
	RV: 5'-ATA GCC CAT ACC AAC AGT CAT TG -3'	23	54,7	
<i>HMGN3</i>	FW: 5'-AGC GAA ACC TGC TCC ACC -3'	18	53,1	208
	RV: 5'-TCA TTC TCC CTC GTT ATC TAC AG -3'	23	49,8	
<i>LUM</i>	FW: 5'-GCT TCA ATC AGA TAG CCA GAC TG -3'	23	53,4	426
	RV: 5'-CGT TAG CAA CAC GTA GAC ATT C -3'	22	52,2	
<i>MPHOSPH6</i>	FW: 5'-TTA TGC AAA GGG GAC TGG AC -3'	20	51,5	259
	RV: 5'-GTT TCA TCT TCA ACT TCT TCT GC -3'	23	51,8	
<i>NAP1L1</i>	FW: 5'-GTG GCC AGC CTA TGA GTT TTG TC -3'	23	56,7	469
	RV: 5'-TCC GCT TCT TCA CCT TCT TCA TC -3'	23	58,1	
<i>NDUFB5</i>	FW: 5'-CGG CGG GTT TCG GTT ACT G -3'	19	57,6	400
	RV: 5'-GAA GGA CGG CCA TTG TTC TTT C -3'	22	56,8	
<i>PAICS</i>	FW: 5'-ATC GAA GCC AAC AGA AAG ACA AAC -3'	24	55,6	331
	RV: 5'-CTG CCT GCC ACT GCC ACA AAT AC -3'	23	60,4	
<i>PMS1</i>	FW: 5'-GTT TCC GCA GCT GAC ATC GTT C -3'	22	58,7	393
	RV: 5'-TTC CTC ATT TTC CCC ACT CTC ATC -3'	24	57,3	
<i>PPAP2B</i>	FW: 5'-CTC ATC TGC CTC GAC CTC TTC TGC -3'	24	60,3	355
	RV: 5'-GGC GCC CTA TGG ACA CTT TG -3'	20	56,8	
<i>PSAT1</i>	FW: 5'-GTG CTG TCC CCT TAA ACC TCA TTG -3'	24	57,8	456
	RV: 5'-TTC CAG CCT GCA CCT TGT ATT CC -3'	23	59,0	
<i>RGS5</i>	FW: 5'-GAA ACC AGC CAA GAC CCA GAA AAC -3'	24	59,0	380
	RV: 5'-GCA CAA AGC GAG GCA GAG AAT C -3'	22	57,8	
<i>RPL23a</i>	FW: 5'-GCC GAA AGC GAA GAA GGA AGC -3'	21	59,1	388
	RV: 5'-ATC AGG CCG AAT CAG GGT GTT G -3'	22	59,7	
<i>SCYE1</i>	FW: 5'-TGC ACG CTA ATT CTA TGG TTT CTG -3'	24	55,3	302
	RV: 5'-TGG GGC TAT TTC TCC GAC ATC TAC -3'	24	57,4	
<i>SFRP2</i>	FW: 5'-CTG GCC CGA CAT GAT TGA GTG -3'	21	60,1	367
	RV: 5'-ATA GGG CGC GTT GAT GTC GTT C -3'	22	59,8	
<i>SGK1</i>	FW: 5'-CCT TGG GCT ACC TGC ATT CAC TG -3'	23	59,5	398
	RV: 5'-CCC GAG CCG CTT TGT CCT G -3'	19	60,1	

<i>SNAP25</i>	FW: 5'-CGC AAT GAG CTG GAG GAG ATG-3' RV: 5'-AGG GCC ATG TGA CGG AGG TTC-3'	21 21	57,5 59,6	473
<i>SPP1</i>	FW: 5'-GAC AGC CAG GAC TCC ATT GAC TC-3' RV: 5'-GAC TGC TTG TGG CTG TGG GTT TC-3'	23 23	56,5 59,5	437
<i>SPRED2</i>	FW: 5'-GTC GCG TCG GGG TCT GTA AGG-3' RV: 5'-GTG GTC TGT GGG GTA TGA GTC GTG-3'	21 24	60,3 59,2	458
<i>STEAP1</i>	FW: 5'-TTC ACC CTT TAG CAA CTT CCC ATC-3' RV: 5'-TCA CAG CCA ACA GAG CCA GTA TTG-3'	24 24	58,6 56,3	423
<i>TGFBR2</i>	FW: 5'-GCG TTA ACC GGC AGC AGA AG-3' RV: 5'-CGG TGA TCA GCC AGT ATT GTT TC-3'	20 23	57,3 57,0	408
<i>UBE2B</i>	FW: 5'-GCG GGA TTT CAA GCG GTT ACA AG-3' RV: 5'-TCG GTT CAT CCA GCA GAG ACT G-3'	23 22	57,1 56,7	320
<i>UBE2D1</i>	FW: 5'-GAA GAG GAT TCA GAA AGA ATT GAG TG-3' RV: 5'-GGA TCA CAA AGT AGA GAA CAT ATG G-3'	26 25	54,8 54,4	298
<i>UBE2V1</i>	FW: 5'-CAC GGG CTC GGG AGT AAA AGT C-3' RV: 5'-TTC GGG CCG CTG AGG GAG-3'	22 18	58,7 59,0	412
<i>UBQLN1</i>	FW: 5'-AGT GCT GCA CAA GAG CAG TTT GG-3' RV: 5'-CTG AGG ATT TCC AGC AAA TAG GGG-3'	23 24	57,1 57,4	435
<i>β-Aktin</i>	FW: 5'-GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT T-3' RV: 5'-GAT GGA GTT GAA GGT AGT TTC GTG-3'	22 24	56,7 55,7	220
<i>HPRT</i>	FW: 5'-GCA GCC CTG GCG TCG TGA TTA G-3' RV: 5'-CCC CCT TGA GCA CAC AGA GGG C-3'	22 22	60,4 62,3	200
<i>CypB</i>	FW: 5'-TTG GAG ATG AAG ATG TAG GCC GGG-3' RV: 5'-GGT GTC TTT GCC TGC GTT GGC C-3'	24 22	59,1 60,4	287

Für die Vollängenklonierungen wurden die hinterlegten Sequenzen der offenen Leseraster der Gene aus der NCBI Gene-Datebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) verwendet und anhand der 5'- und 3'-Enden Oligonukleotide mit 15-20 komplementären Basen hierzu zusammengestellt. Die Oligomere enthielten zudem jeweils am 5'-Ende Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in den Zielvektor. Die Kombinationen der Schnittstellen sind in Tabelle 2.1.6 aufgeführt.

**Tab. 2.1.6: Kombinationen von Restriktionsschnittstellen in Oligonukleotiden für die Vollängenklonierung**

Restriktionsenzyme	Schnittstellensequenz im 5'-Oligonukleotid	Schnittstellensequenz im 3'-Oligonukleotid	Klonierung in Vektor
<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	G <sup>+</sup> GATCC	G <sup>+</sup> TCGAC	pGEX4T3tag
<i>Eco</i> RI/ <i>Sal</i> I	G <sup>+</sup> AATCC	G <sup>+</sup> TCGAC	pGEX4T3tag
<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I	G <sup>+</sup> GATCC	T <sup>+</sup> CTAGA	pGEX4T3tag
<i>Nhe</i> I/ <i>Kpn</i> I	G <sup>+</sup> CTAGC	GGTAC <sup>+</sup> C	pGEX4T3tag
<i>Nhe</i> I/ <i>Sal</i> I	G <sup>+</sup> CTAGC	G <sup>+</sup> TCGAC	pGEX4T3tag

Für die DNA-Methylierungsanalysen wurden die bereits veröffentlichten Oligonukleotidsequenzen BSP-1 und BSP-2 verwendet (Kawamoto *et al.*, 2008).

**Tab. 2.1.7: Bezeichnungen, Sequenzen, Basenpaarangaben, Schmelztemperaturen und GC-Gehalt der für die Mutagenesen verwendeten Oligonukleotide**

Gen	Oligonukleotide (Sequenzen)	Länge [bp]	Tm [°C]	GC-Gehalt [%]
<i>ACSL4v2</i>	FW: 5'- CAG AAA ACT CTG TTC AAG ATA GGG TAT GAT TAC AAA TTG G -3' RV: 5'- CCA ATT TGT AAT CAT ACC CTA TCT TGA ACA GAG TTT TCT G -3'	40	62	35
<i>HMG3</i>	FW: 5'- CGG TCT GCC AGA TTG TCA GCG AAA CCT GC -3' RV: 5'- GCA GGT TTC GCT GAC AAT CTG GCA GAC CG -3'	29	66	59
<i>MPHOSPH6</i>	FW: 5'- GCC GAG CGA AAG ACA AGG TTG TCC AAG AAT CTG C -3' RV: 5'- GCA GAT TCT TGG ACA ACC TTG TCT TTC GCT CGG C -3'	34	67	53
<i>PAICSv1</i>	FW: 5'- CAG TTA TTA CAG GAA GCA GGT ATT AAA ACT GCC TTC AC -3' RV: 5'- GTG AAG GCA GTT TTA ATA CCT GCT TCC TGT AAT AAC TG -3'	38	63	39
<i>SCYE1v3</i>	FW: 5'- GGA GTG AAG CAA ATA CCA TTT CCA TCT GGT ACT CC -3' RV: 5'- GGA GTA CCA GAT GGA AAT GGT ATT TGC TTC ACT CC -3'	35	64	46
<i>SPP1v2</i>	FW: 5'- CTC CTA GCC CCA CAG ACC CTT CCA AGT AAG TCC -3' RV: 5'- GGA CTT ACT TGG AAG GGT CTG TGG GGC TAG GAG -3'	33	68	58
<i>TGFBR2</i>	FW: 5'- GAA GGA AAA AAA AAA GCC TGG TGA GAC TTT CTT C -3' RV: 5'- GAA GAA AGT CTC ACC AGG CTT TTT TTT TTC CTT C -3'	34	61	38

### 2.1.6 *E. coli*-Stämme und Genotypen

Die verwendeten Bakterienstämme stammten von StrataGene (Heidelberg).

- **XL1 blue:** endA1 *gyrA*96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)
- **Rosetta(DE3)pLysS:** F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)

### 2.1.7 Zelllinien

- HEK293: Humane embryonale Nierenzelllinie, immortalisiert (ATCC-Referenz: CRL-1573)
- HEK293T: wie HEK293, zusätzlich SV40-Genom integriert (ATCC-Referenz: CRL-11268)
- AsPC-1: pankreatische Adenokarzinomzelllinie, aus Aszites isoliert (ATCC-Referenz: CRL-1682)
- BxPC-3: pankreatische Adenokarzinomzelllinie (ATCC-Referenz: CRL-1687)
- MiaPaCa-2: pankreatische Adenokarzinomzelllinie (ATCC-Referenz: CRL-1420)
- Panc1: duktales Epitheloidkarzinomzelllinie (ATCC-Referenz: CRL-1469)

### 2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper:

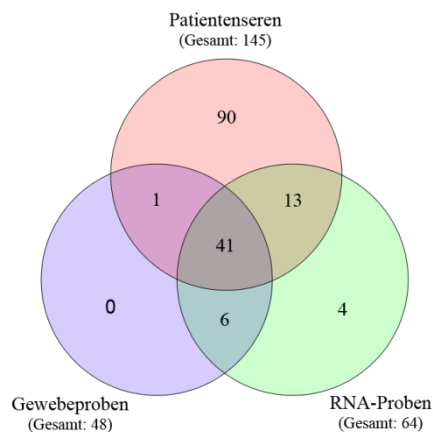
- Anti-GST IgG aus Ziege, polyklonal (GE Healthcare, Frankfurt/Main)
- Anti-tag IgG aus Maus, monoklonal, hergestellt von muriner Hybridomzelllinie (AG Pawlita, DKFZ)
- Anti-SFRP2 IgG aus Maus, monoklonal (SantaCruz Biotech, Heidelberg)
- Anti-SFRP2 IgG aus Kaninchen, polyklonal (Abcam, Cambridge, Großbritannien)
- Anti-Tubulin-Gamma IgG aus Maus, monoklonal (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

Sekundäre Antikörper:

- Anti-Human IgG aus Ziege, polyklonal, Biotin-Konjugat (Dianova, Hamburg)
- Anti-Kaninchen IgG aus Ziege, polyklonal, HRP-Konjugat (Dianova, Hamburg)
- Anti-Maus IgG aus Ziege, polyklonal, HRP-Konjugat (Dianova, Hamburg)
- Anti-Maus IgG aus Ziege, polyklonal, Biotin-Konjugat (Dianova, Hamburg)
- Anti-Ziege IgG aus Esel; HRP-Konjugat, prä-adsorbiert (SantaCruz Biotech, Heidelberg)

### 2.1.9 Patientenproben

Der Großteil der verwendeten Seren, RNA- und Gewebeproben von PDAC-Patienten inklusive der klinischen Daten wurde von Prof. Dr. Nathalia Giese, Europäisches Pankreaszentrum (EPZ) der Universitätsklinik Heidelberg, bereitgestellt. Auf Grund der guten Dokumentation mit Patientendaten wurden soweit möglich korrespondierende Seren, RNA- und Gewebeproben gewählt, die mit weiteren Proben ergänzt wurden, um eine statistisch auswertbare Population zu erhalten (siehe Abb. 2.1.1).



**Abb. 2.1.1: Probenkollektive der PDAC-Patienten des Europäischen Pankreaszentrums**

#### 2.1.9.1 Seren

Eine Auflistung zur Herkunft und zu den klinischen Daten der Melanomseren und Daten zu den Seren der Kontrollgruppe sind in der Publikation von Zörnig *et al.* (Manuskript eingereicht) aufgeführt.

Klinische Daten der CapRI-Studie sind ebenso veröffentlicht (Schmidt *et al.*, 2007), wurden jedoch auf Grund eines erweiterten Patientenkollektivs aktualisiert.

Für die Einteilung der Seren des Pankreaskarzinomkollektivs wurde der Metastasierungsgrad des Primärtumors als Kriterium verwendet, der N0M0 (nicht metastasiert), N1M0 (in regionale Lymphknoten metastasiert) oder M1 (fernmestasiert) annehmen konnte. Eine Zusammenfassung der klinischen Daten und die Verteilung der Proben auf die Grade ist in Tabelle 2.1.8 dargestellt.

**Tab. 2.1.8: Klinische Daten der für die Serologie eingesetzten Pankreaserenkollektive**

Kollektiv	Klinische Variable	Wert/Anzahl
Pankreaskarzinom	Gesamtzahl der Patientenproben	145
	Altersverteilung	31,8-84,3 Jahre (Median: 64,7)
	Geschlecht (männlich/weiblich)	85 (58,6 %) / 60 (41,4 %)
	Primärtumorgröße T	
	T1 / T2 / T3 / T4 / Tx	2 (1,4 %), 2 (1,4 %), 115 (79,3 %), 1 (0,7 %), 25 (17,2 %)
	Lymphknotenmetastasen N	
	N0 / N1	35 (24,1 %) / 110 (75,9 %)
	Fernmetastasen M	
	M0 / M1	99 (68,3 %) / 46 (31,7 %)
	UICC-Stadium	
	I / II / III / IV / unbekannt	3 (2,1 %) / 87 (60 %) / 2 (1,4 %) / 34 (23,4 %) / 19 (13,1 %)
	Resektionsrand R	
	0 / 1 / 2 / unbekannt	70 (48,3 %) / 33 (22,8 %) / 33 (22,8 %) / 9 (6,2 %)
Neoadjuvante Therapie (ja/nein)	20 (13,8 %) / 125 (86,2 %)	
CapRI	Gesamtzahl der Patientenproben	91
	Altersverteilung	33,4-77,0 Jahre (Median: 63,8)
	Geschlecht (männlich/weiblich)	51 (56,0 %) / 40 (44,0 %)
	Primärtumorgröße T	
	T1 / T2 / T3 / T4 / Tx	1 (1,1 %), 2 (2,2 %), 87 (95,6 %), 1 (1,1 %), 0 (0 %)
	Lymphknotenmetastasen N	
	N0 / N1	18 (19,8 %) / 73 (80,2 %)
	Fernmetastasen M	
	M0 / M1	91 (100 %) / 0 (0 %)
	Resektionsrand R	
	0 / 1 / 2 / unbekannt	52 (57,1 %) / 39 (42,9 %) / 0 (0 %) / 0 (0 %)
	Neoadjuvante Therapie (ja/nein)	0 (0 %) / 91 (100 %)

**Tab. 2.1.9: Für die Serologie eingesetzte Patienten- und Kontrollseren mit Auflistung der Stadien/Klassifikationen im jeweiligen Kollektiv**

Kollektiv	Klassifikation/Stadium	Anzahl
Melanom	Stadium I	99
	Stadium II	86
	Stadium III	92
	Stadium IV	91
	Gesamt	368
Pankreaskarzinom	N0M0	35
	N1M0	64
	N1M1	46
	CapRI-Kollektiv	91 (N0M0:18;N1M0:73)
	Gesamt	236
Kontrollen	Gesamt	50
Bestimmung des Schwellenwertes	Gesamt	40

### 2.1.9.2 Extrahierte Gesamt-RNA aus Gewebeproben

Die Einteilung der RNA-Proben von PDAC-Patienten wurde analog der Seren anhand der Metastasierungsklassifikation durchgeführt. Für 27 RNA-Proben eines weiteren Kollektivs lagen jedoch keine Daten vor.

**Tab. 2.1.10: Klinische Daten der für die Genexpressionsanalyse eingesetzten RNA-Proben**

Kollektiv	Klinische Variable	Wert/Anzahl
Pankreaskarzinom	Gesamtzahl der Patientenproben	64
	Altersverteilung	31,8-81,3 Jahre (Median: 65,3)
	Geschlecht (männlich/weiblich)	34 (53,1 %) / 30 (46,9 %)
	Primärtumorgröße T	
	T1 / T2 / T3 / T4 / Tx	1 (1,6 %), 0 (0 %), 61 (95,3 %), 1 (1,6 %), 1 (1,6 %)
	Lymphknotenmetastasen N	
	N0 / N1	15 (23,4 %) / 49 (76,6 %)
	Fernmetastasen M	
	M0 / M1	55 (85,9 %) / 9 (14,1 %)
	UICC-Stadium	
	I / II / III / IV / unbekannt	2 (3,1 %) / 49 (76,6 %) / 2 (3,1 %) / 7 (10,9 %) / 1 (1,6 %)
	Resektionsrand R	
	0 / 1 / 2 / unbekannt	45 (70,3 %) / 10 (15,6 %) / 7 (10,9 %) / 2 (3,1 %)
Neoadjuvante Therapie (ja/nein)	12 (18,8 %) / 52 (81,2 %)	

**Tab. 2.1.11: Für die Expressionsanalyse eingesetzte Patienten- und Kontroll-RNA-Proben mit Auflistung der Stadien/Klassifikationen im jeweiligen Kollektiv**

Kollektiv	Klassifikation/Stadium	Anzahl
Pankreaskarzinom	N0M0	15
	N1M0	40
	N1M1	9
	unbekannt	27
	Gesamt	91
Kontrollen	Gesamt	14
Normalgewebeskollektiv	Gesamt	22
Chronische Pankreatitis	Patienten	15

Sowohl bei den RNA-Proben der Kontrollen als auch den CP-Patienten waren keine weiteren klinischen Daten vorhanden. Das Normalgewebeskollektiv umfasste 22 verschiedene Gewebetypen, deren RNA kommerziell vertrieben wird und aus mehreren Spendergeweben zusammengefasst ist (AMSBIO, Abingdon, Großbritannien; Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich).

### 2.1.9.3 Gewebe

Gewebe wurden zum einen als resezierte kryokonservierte sowie als Formalin fixierte in Paraffin eingebettete Proben aus dem EPZ erhalten (siehe Kapitel 2.4.6).

Weiterhin wurden Gewebe-„Arrays“, die ca. 90 jeweils ca. 1,5 mm im Durchmesser große Stanzenpräparate von Formalin fixiertem in Paraffin eingebettetem Gewebe auf Objektträgern enthielten, von der NCT-Gewebebank am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg zur Verfügung gestellt. Je Patient war ein Stanzenpräparat aus zentralem und aus peripherem Tumorgewebe aufgetragen. Insgesamt konnten vier „Arrays“ mit Tumorproben, einer mit chronischer Pankreatitis-Proben sowie weitere vier mit verschiedenen organspezifischen Normalgewebe-„Arrays“, von denen vorerst nur die Pankreasgewebeproben ausgewertet wurden, aus der NCT-Gewebebank bezogen werden. Die Einteilung der Gewebeproben von PDAC-Patienten wurde auch hier anhand der Metastasierungsklassifikation durchgeführt.

Sowohl bei den Gewebeproben von gesunden Spendern als auch den CP-Patienten konnten keine weiteren klinischen Daten erhalten werden.

**Tab. 2.1.12: Klinische Daten der für die Analyse der Proteinexpression eingesetzten Gewebeproben**

Kollektiv	Klinische Variable	Wert/Anzahl
Pankreaskarzinom-Arrays	Gesamtzahl der Patientenproben	199
	Altersverteilung	37,3-84,6 Jahre (Median: 65,3)
	Geschlecht (männlich/weiblich)	103 (51,8 %) / 96 (48,2 %)
	Primärtumorgröße T	
	T1 / T2 / T3 / T4 / Tx	1 (0,5 %), 0 (0 %), 198 (99,5 %), 0 (0 %), 0 (0 %)
	Lymphknotenmetastasen N	
	N0 / N1	28 (14,1 %) / 171 (85,9 %)
	Fernmetastasen M	
M0 / M1	189 (95,0 %) / 10 (5,0 %)	
Pankreaskarzinom-Gewebeschnitte	Gesamtzahl der Patientenproben	48
	Altersverteilung	33,4-81,3 Jahre (Median: 66,0)
	Geschlecht (männlich/weiblich)	26 (54,2 %) / 22 (45,8 %)
	Primärtumorgröße T	
	T1 / T2 / T3 / T4 / Tx	1 (2,1 %), 0 (0 %), 45 (93,8 %), 1 (2,1 %), 1 (2,1 %)
	Lymphknotenmetastasen N	
	N0 / N1	12 (26,7 %) / 36 (73,3 %)
	Fernmetastasen M	
	M0 / M1	39 (68,3 %) / 9 (31,7 %)
	UICC-Stadium	
	I / II / III / IV / unbekannt	1 (2,1 %) / 36 (75,0 %) / 1 (2,1 %) / 7 (14,6 %) / 1 (2,1 %)
	Resektionsrand R	
0 / 1 / 2 / unbekannt	34 (70,8 %) / 7 (14,6 %) / 6 (12,5 %) / 1 (2,1 %)	
Neoadjuvante Therapie (ja/nein)	7 (14,6 %) / 41 (85,4 %)	

**Tab. 2.1.13: Für die gewebespezifische Proteinexpressionsanalyse eingesetzte Patienten- und Kontrollgewebe mit Auflistung der Stadien/Klassifikationen im jeweiligen Kollektiv**

	Klassifikation/Stadium	Anzahl
Pankreaskarzinom-Arrays	N0M0	28
	N1M0	161
	N1M1	10
	Gesamt	199
Pankreaskarzinom-Gewebeschnitte	N0M0	12
	N1M0	27
	N1M1	9
	Gesamt	48
Pankreaskarzinomproben	Gesamt	247
Chronische Pankreatitis	Array	47
	Gewebeschnitte	23
	Gesamt	70
Pankreasnormalgewebe	Array	17



## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Zellen und Gewebe erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Zellen bis zu einer Menge von  $2 \times 10^5$  wurden mittels Vortexen und Auf-/Abpipettieren im Puffer RLT lysiert. Höhere Zellzahlen und Gewebe, im Normalfall stand Cryogewebe zur Verfügung, wurden in einem Precellys Homogenisator (PeqLab, Erlangen) basierend auf dem Prinzip einer Kugelschwingmühle aufgeschlossen. Das Ausgangsmaterial wurde in ein Aufschlussgefäß mit Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von 1,4 mm (PeqLab, Erlangen) und 700  $\mu$ L RLT-Puffer gefüllt überführt. Der Aufschluss erfolgte mit einer Wiederholung bei 6000 rpm für 20 s. Danach wurden die Gefäße sofort auf Eis gelagert und das Homogenisat weiter nach Protokoll verarbeitet.

### 2.2.2 DNA-Isolierung

#### 2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde das Blood & Tissue-DNA-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

#### 2.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Kulturen wurde mittels des Plasmid Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) für kleinere DNA-Mengen (z.B. Sequenzierungen, Klonierungen) beziehungsweise mittels des Plasmid Midiprep Kits für größere DNA-Mengen (z.B. Transfektionen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 2.2.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) dient der Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte. Über die Oligomere kann zudem eine Modifikation wie z.B. eine Restriktionsschnittstelle oder ein Stop-Codon in das Amplifikat eingebaut werden. Die PCR eignet sich zudem zur Kontrolle einer erfolgreichen Ligation/Transformation von Bakterienkolonien (Kolonie-PCR). Hierzu wurden Zellen einer betreffenden Kolonie in Wasser gelöst und mittels Hitze bei 96 °C aufgeschlossen.

Einfache Ansätze für Standard- als auch Kolonie-PCR sind in Tabelle 2.2.1 aufgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden im T3000-„Cycler“ (Biometra, Jena) nach dem in Tab. 2.2.2 gezeigten Protokoll durchgeführt.

**Tab. 2.2.1: Einfache PCR-Ansätze für Standard- und Kolonie-PCR**

Komponente	PCR	Kolonie-PCR
10x PCR-Puffer	2 µL	2 µL
dNTPs, je 10 mM (Life Technologies, Karlsruhe)	1 µL	1 µL
Korrespondierendes Paar an Oligomeren, 10 µM	je 1 µL	je 1 µL
cDNA/DNA-Vorlage (10-50 ng/µL)	1 µL	33,8 µL
Wasser, RNase-/DNase-frei (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	13,8 µL	---
Taq-Polymerase	0,2 µL (=1 U)	0,2 µL (=1 U)
Gesamt	20 µL	40 µL

**Tab. 2.2.2: PCR-Protokoll zur Amplifizierung**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Linearisierung/Denaturierung des Ausgangs-DNA	94-96 °C	60-120 s	25-40 x
Denaturierung der doppelsträngigen DNA	94-96 °C	30-60 s	
Primeranlagerung („Annealing“) *	T <sub>M</sub> -5 °C	20-60 s	
Elongation *	70-72 °C	20-300 s	
finale Elongation	72 °C	60-180 s	
Kühlung/Schutz der Probe	16 °C	Bis Entnahme	

\* die Zeit des „Annealings“ wurde je nach Primerlänge und GC-Gehalt, die Zeit der Elongation nach Länge des betreffenden Genabschnitts gewählt

Für die weitere Verwendung z. B. eine Sequenzierung oder einen Restriktionsverdau wurden PCR-Produkte mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### 2.2.4 Reverse Transkriptase-PCR

Isolierte mRNA wurde mittels SuperScript III Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um eine stabile Lagerung und eine Amplifizierung durch DNA-Polymerasen zu ermöglichen. Ein entsprechender Ansatz ist in Tabelle 2.2.3 und das Protokoll in Tabelle 2.2.4 aufgeführt.

**Tab. 2.2.3: Einfacher Ansatz für Reverse Transkription**

Komponente (Quelle)	Volumen	Bezeichnung
Unspezifische Hexamere, 50 µM (Roche, Mannheim)	2 µL	„Priming“-Mix
dNTPs, je 10 mM (Life Technologies, Karlsruhe)	1,5 µL	
RNase Inhibitor (NEB, Frankfurt/Main)	1 µL	
RNA (0,5-1 µg)	x µL	
Wasser, RNase-/DNase-frei (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	ad 21 µL	
5x Reaktionspuffer	6 µL	RT-Mix
0,1 M DTT	1,5 µL	
SuperScript III	1,5 µL (=300 U)	

**Tab. 2.2.4: Protokoll zur Reversen Transkription**

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
„Priming“	65 °C	5 min	Anlagerung von Hexameren an mRNA, langsame Abkühlsschritte
	45 °C	1 min	
	16 °C	Entnahme	
	Entnahme, Lagerung auf Eis für 2 min		
	Zugabe des RT-Mix		
Reverse Transkription	25 °C	5 min	Umschreibung
	50 °C	60 min	
	70 °C	15 min	

Die Ansätze wurden je nach notwendiger Konzentration 1:2 bis 1:10 mit Wasser, RNase-/DNase-frei, verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.5 Oligomer-„Annealing“

**Tab. 2.2.5: Oligomer-„Annealing“-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
Oligomer-„Annealing“-Puffer	10 mM TrisHCl, pH 7,8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

Kurze synthetisierte einzelsträngige DNA-Fragmente (ssDNA) mit bekannter Sequenz lassen sich zu doppelsträngiger DNA (dsDNA) hybridisieren, wenn ihre Basen zu einem Großteil komplementär sind. Eine Phosphorylierung ist nicht notwendig, wenn das Zielkonstrukt bereits phosphorylierte Enden besitzt z.B. durch Restriktionsverdau.

Die korrespondierenden Oligomere wurden in RNase-/DNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) auf eine Konzentration von 1000 µM gelöst.

#### Protokoll:

1. Je 10 µL der Oligomerlösung des korrespondierenden Paares wurden in einem 0,2 mL PCR-Gefäß gemischt und mit 80 µL „Annealing“-Puffer verdünnt.
2. Die Lösung wurde im T3000-„Cycler“ (Biometra, Jena) bei 95 °C für 4 min inkubiert und mittels eines Gradienten von 0,02 °C/s auf RT abgekühlt.
3. Die hybridisierten Oligos wurden weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.
4. 2-4 Verdünnungen im Bereich von 1:10 – 1:100 wurden hergestellt und in der Ligation eingesetzt.

### 2.2.6 Photometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration

Die photometrische Messung von RNA- und DNA-Proben wurde mit dem NanoDrop (PeqLab, Erlangen) durchgeführt. Die korrespondierende Nukleinsäurekonzentration wurde direkt ausgegeben. Der Quotient der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm/280 nm zeigte die Reinheit der Probe an, wobei ein Wert von ca. 1,8 eine hohe Reinheit für DNA-Proben und ein Wert von ca. 2,0 eine hohe Reinheit für RNA-Proben darstellte.

### 2.2.7 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von isolierter Plasmid-DNA und extrahierten PCR-Produkten (Kapitel 2.2.2.2 & 2.2.3) wurde genutzt, um diese für eine Ligation mit kompatiblen Enden vorzubereiten. Weiterhin erlaubte der Verdau, die erfolgreiche Ligation anhand der Größe der Restriktionsfragmente zu überprüfen. Ein einfacher Ansatz ist in Tabelle 2.2.6 gezeigt. Für einen Doppelverdau wurde das bestgeeignete Puffersystem gewählt und die Aktivitäten beider Enzyme auf einen gleichen Wert eingestellt. Die Restriktion fand bei der vom Hersteller angegebenen Inkubationstemperatur für das Enzym/die Enzyme für 75 min statt.

**Tab. 2.2.6: Ansatz für einen einfachen Restriktionsverdau**

Komponente	Menge
DNA	100 ng – 3,0 µg
10x Puffer für verwendete Restriktionsendonuklease	1,0-4,0 µL
10x BSA	1,0-4,0 µL
Restriktionsendonuklease	2-5 U
Wasser, RNase-/DNase-frei (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	auf 10-40 µL Gesamtansatz

### 2.2.8 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

**Tab. 2.2.7: TAE-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
1x TAE-Puffer	40 mM TrisHCl, pH 8,0, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Elektrophorese in 0,8-2 %-igen (w/v) Agarosegelen bei 4-6 V/cm in einem Sub-Cell-System (BioRad-München). Die Trennzeit orientierte sich an der Lauffront des OrangeG, das etwa einem 50 bp-Fragment entspricht. Die pH-Stabilität wurde durch 1x TAE-Puffer gewährleistet. Jedes Gel enthielt Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,2 µg/mL, sodass DNA-Banden im UV-Licht des Transilluminators bei 312 nm sichtbar gemacht und das Gel im Quantum-System (PeqLab, Erlangen) digital dokumentiert werden konnte. Als DNA-Marker wurde je nach erwarteter Bandengröße eine 100 bp- oder 1 kb-Leiter (New England Biolabs, Frankfurt/Main) eingesetzt.

Entsprechende DNA-Banden wurden unter kürzest möglicher UV-Exposition aus dem Agarosegel geschnitten und mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

### 2.2.9 DNA-Ligation

Der Ligationsansatz wurde entsprechend der DNA-Konzentration der Fragmente, wie in Tabelle 2.2.8 aufgeführt, angesetzt.

**Tab. 2.2.8: Einfacher Ligationsansatz**

Komponente	Menge
10x Ligationspuffer	1,0 µL
Aufgereinigte kompatible Fragment-DNA	1,0-4,0 µL
Aufgereinigte kompatible Vektor-DNA	0,8-1,0 µL
T4 Ligase	0,4 µL
Wasser, RNase-/DNase-frei (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	auf 8 µL Gesamtansatz

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte nach folgendem Programm:

**Tab. 2.2.9: "Cycler"-Ligationsprogramm**

Schritt	1	2	3	4	5	6	7
Temperatur	14 °C	16 °C	18 °C	22 °C	25 °C	65 °C	16 °C
Zeit	20 min	40 min	60 min	90 min	20 min	1 min	Ende

PCR-Amplifikate können mittels TA-Klonierung in entsprechend modifizierte Vektoren ligiert werden, um eine leichte Sequenzierung oder Weiterklonierung zu ermöglichen. Hierzu wurde das pGEM-T Easy Cloning Kit (Promega, Mannheim) mit einem modifizierten Ansatz verwendet (siehe Tab. 2.2.10). Die Inkubation erfolgte für 75 min bei 22 °C.

**Tab. 2.2.10: TA-Klonierungsansatz**

Komponente	Menge
2x Rapid Ligationspuffer	5,0 µL
Aufgereinigtes PCR-Amplifikat	3,2 µL
pGEM-T Easy Vektor, 25 ng/µL	1,0 µL
T4 Ligase	0,8 µL

### 2.2.10 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen / Transformation von DNA in *E. coli*

**Tab. 2.2.11: TFB-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
TFB1-Puffer	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % Glycerin, pH 5.8; steril-filtriert
TFB2-Puffer	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % Glycerin, pH 6.8; steril-filtriert

Zur Transformation der Plasmid-DNA wurden chemokompetente *E. coli*-Zellen verwendet, die nach einer modifizierten CaCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt wurden (Hanahan, 1983). Eine über Nacht auf LB-Agar gewachsene Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes wurde als Übernachtflüssigkultur in 10 mL LB-Medium bei 37 °C und 150 rpm angesetzt. 1 mL dieser Kultur dienten als Inokulum für 100 mL Hauptkultur, die bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert wurden. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g und 4 °C in einer J2-MC-Zentrifuge mit JA-14-Rotor (Beckman, Krefeld) pelletiert und anschließend in 30 mL TFB1-Puffer resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen. Das nun erhaltene Bakterienpellet wurde in 4 mL TFB2-Puffer resuspendiert, in 100 beziehungsweise 200 µL Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schnellgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zu 40 µL chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 1 – 5 µL DNA (entsprechend 50 - 500 ng) unter leichtem Mischen hinzupipettiert und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Danach schloss sich sofort eine einminütige Inkubation auf Eis und nach Zugabe von 650 µL LB-Medium eine Regeneration bei 37 °C und 170 rpm für 60 min im Schüttelinkubator (Innova 44, New Brunswick, Hamburg) an. Die Ausplattierung von 50 – 500 µL der Bakteriensuspension erfolgte unter aseptischen Bedingungen auf Selektivagar sowie eine Inkubation bei 37 °C für 16 Stunden (Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Dreieich).

### 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Amplifikaten und Plasmiden erfolgte bei GATC Biotech (Konstanz) mittels der Sanger-Didesoxy-Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) über Kapillarsequencer (ABI 3730xL). Die Sequenzen wurden den Elektropherogrammen entnommen (BioEdit Version 7.053, Tom Hall) und im Programm MegAlign (LaserGene Suite, Version 10.1, DNASTar, USA) mit den korrespondierenden Konstruktsequenzen verglichen. Weiterhin wurden die Sequenzen in NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit Standardparametern gegen die humane nicht-redundante Expressionsdatenbank auf ihre Aktualität gegengeprüft.

### 2.2.12 Sequenzspezifische Mutagenese

Plasmide lassen sich mit Hilfe PCR-basierter Mutagenese auf Basis von komplementären Oligokonstrukten zielgerichtet modifizieren (Braman *et al.*, 1996).

Das verwendete Protokoll orientierte sich am QuikChange II Site-directed Mutagenese-Protokoll (Agilent, Böblingen), wurde jedoch durch separate Reagenzien und angepasste Parameter optimiert.

#### *Mutagenese mittels „Whole-Template“-PCR*

**Tab. 2.2.12: Einfacher Mutagenese-PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen	Modifizierungen
10x Polymerase-Puffer	2,5 µL	
dNTPs (10 mM)	0,5 µL	
„Forward“-Primer (50 ng/µL)	1,25 µL	Bei höherer DNA-Menge auf 2 µL erhöhen
„Reverse“-Primer (50 ng/µL)	1,25 µL	
DNA (10-15 ng/µL)	0,5 µL	DNA-Konzentration kann bis 40 ng im Gesamtansatz erhöht werden.
PfuPlus! Polymerase	0,4 µL	
H <sub>2</sub> O, RNase-/DNase-frei	18,6 µL	Wasser zügig nach Polymerase hinzugeben und gut mischen

**Tab. 2.2.13: Mutagenese-PCR-Protokoll**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Denaturierung der Ausgangs- DNA	95 °C	45 s	
Denaturierung der dsDNA	94 °C	30 s	Punktmutation: 15 x Basentriplett: 20 x Mehrfachaminosäureaustausch (Insertion/Deletion): 25 x
Primeranlagerung („Annealing“)	55 °C	60 s	
Elongation	72 °C	ca. 70 s/kb	
finale Elongation	72 °C	300-480 s	
Kühlung/Schutz der Probe	16 °C		Bis Entnahme

Nach der PCR wurden 5 µL der Reaktion über ein Agarosegel auf ein vollständiges Amplifikat überprüft. Falls keine Bande sichtbar war, war die Reaktion nicht erfolgreich und wurde modifiziert wiederholt.

#### *Verdau der methylierten Ausgangs-DNA*

Die restlichen 20 µL der Reaktion wurden für den Verdau mit *DpnI* eingesetzt, um das nicht-mutierte Konstrukt nicht als Hintergrund in der Transformation zu verschleppen. Möglich war dies durch die endogene Methylierung der Plasmid-DNA, die aus *E. coli* isoliert wurde. Methylierte DNA stellt das Substrat für *DpnI* dar.

**Tab. 2.2.14: Ansatz für einen einfachen Restriktionsverdau**

Komponente	Volumen
Mutagenese-PCR-Reaktion	20 µL
10x Acet-Puffer	2,5 µL
<i>DpnI</i>	0,75 µL
H <sub>2</sub> O	1,75 µL

Die Inkubierung erfolgte bei 37 °C für 75 min, anschließend wurde bei 80 °C für 15 min inaktiviert. Es war keine Aufreinigung nötig. Die DNA stand für die Transformation zur Verfügung.

### **2.2.13 Quantitative PCR („real time“ PCR)**

Die quantitative PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip, die Amplifizierung eines Gens im Reaktionsgemisch in Echtzeit („real time“) pro Zyklus zu verfolgen und in Relation zu einem Standard zu stellen (Bustin, 2000).

Der zentrale Messwert der qPCR, „Threshold Cycle“ (C<sub>T</sub>) beziehungsweise „Crossing Point“ (C<sub>p</sub>) genannt, ist der Amplifizierungszyklus in der exponentiellen Phase, bei dem die Fluoreszenz des Amplifikats über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Er stellt somit einen definierten Punkt der Messung dar, bei dem für alle Proben die gleiche Fluoreszenzintensität erreicht wird und somit die Amplifikatmenge aller Proben annähernd gleich ist.

Für die Berechnung der relativen quantitativen Expressionswerte der Gene werden bestimmte exprimierte Bezugsgene, die ubiquitär in ideal gleichen jedoch mindestens sehr ähnlichen Raten exprimiert werden, sogenannte „housekeeping genes“ benötigt. Die Voraussetzung, dass ein Gen vollkommen unreguliert ist, trifft auf bestimmte experimentelle Rahmenbedingungen zu, kann in

komplexeren Zusammenstellungen (wie z.B. unterschiedliche Gewebezusammensetzung, pharmakologische Einflüsse) jedoch eher schwer erreicht werden (de Kok *et al.*, 2005; Kagedal *et al.*, 2007). Dieser Umstand traf für die erhaltenen Gewebe- und RNA-Proben, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zu. Durch den Einsatz mehrerer Bezugsgene lässt sich die Variation einzelner Gene reduzieren und somit die Vergleichbarkeit zwischen Proben unbekannter Variabilität deutlich erhöhen. Daher wurden in den Genexpressionsanalysen drei gut dokumentierte Bezugsgene eingesetzt:

- $\beta$ -Aktin (Komponente des Zytoskeletts)
- Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (HPRT) (Enzym des Purinmetabolismus)
- Cyclophilin B (Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase)

Der absolute Unterschied der Amplifikationswerte wird mit der Differenz

$$\Delta C_p = C_p(\text{Bezugsgen}) - C_p(\text{Zielgen})$$

angegeben. Für die durchgeführte Messung wäre dies angepasst:

$$\Delta C_p = \bar{x}(C_p(\text{Zielgen})) - \bar{x}(C_p(\beta\text{-Aktin, HPRT, Cyclophilin B}))$$

Das relative Expressionsverhältnis (Ratio) zwischen Zielgen und Bezugsgenen ergäbe sich aus

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_p}$$

wobei die Basis 2 die angenommene ideale Effizienz, also Verdoppelung je Zyklus, der Amplifizierungsreaktion darstellt.

Der Vergleich der Expression eines Gens zwischen zwei Gruppen z.B. Tumor- gegen Normalgewebe erfolgte mittels:

$$\Delta \Delta C_p = \bar{x}(\Delta C_p(\text{Tumor})) - \bar{x}(\Delta C_p(\text{Normal})) \text{ und } \text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_p}$$

Für die Genexpressionanalysen wurde der KAPA SYBR FAST Mix (PeqLab, Erlangen) verwendet, der den Cyanin-Farbstoff SYBR Green I mit einem Absorptionsmaximum bei 494 nm und einem Emissionsmaximum bei 521 nm enthält. Nach der Interkalierung in doppelsträngige DNA zeigt er eine bis zu 1000-fach höhere Fluoreszenz als im ungebundenen Zustand. Die Reaktionsansätze (siehe Tab. 2.2.15) wurden als Mastermix angesetzt, wobei die cDNA separat in geeigneten 96- (PeqLab-Erlangen) beziehungsweise 384-Loch-Platten (Roche, Mannheim) vorgelegt wurde. Jede Probe wurde als Triplikat gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9  $\mu$ L Mastermix, das Versiegeln der Platte mit klarer Folie (PeqLab, Erlangen) und ein Sammeln der Flüssigkeit durch Zentrifugation der Platten bei 500 x g für 10 s (MEGAFUGE 40 R, Thermo Fisher Scientific, Dreieich). Die Messung fand in LightCycler LS480-Systemen (Roche, Mannheim) mit passendem PCR-Block und den entsprechenden Amplifizierungsprogrammen (siehe Tab. 2.2.16) statt.

**Tab. 2.2.15: 1x qPCR-Ansatz**

Komponente	Volumen [ $\mu$ L]
2x SYBR Green Mix	5,5 $\mu$ L
„Forward“-Primer (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L
„Reverse“-Primer (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3,1 $\mu$ L
cDNA 1:2 - 1:5 mit H <sub>2</sub> O verdünnt	2 $\mu$ L



**Tab. 2.2.16: qPCR-Protokoll zur Amplifizierung und Detektion der Expression**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung der Ausgangs-cDNA	96 °C	90 s	40-45
Denaturierung der cDNA	96 °C	15 s	
Primeranlagerung („Annealing“)	52-60 °C	25 s	
Elongation/Detektierung	72 °C	10 s	
Aufnahme der Schmelzkurve	60-95 °C	Kontinuierliche Messung	
Kühlung	< 40 °C	Bis Entnahme	

Die Ergebnisse wurden hinsichtlich ihrer Qualität überprüft, indem die Schmelzkurven und  $C_p$ -Werte ausgewertet wurden. Ausgefallene Messungen, nachweisbar durch keinen  $C_p$ -Wert und fehlende Schmelzkurve, beziehungsweise suboptimale Amplifikationen, die anhand von uneindeutigen Schmelzkurven charakterisiert waren, wurden entfernt und wiederholt.

Die Auswertung der finalen Daten erfolgte durch eine statistische Analyse (siehe Kapitel 2.6).

### 2.2.14 Analyse der DNA-Methylierung in CpG-Bereichen

Die epigenetische Regulierung der Genexpression stellt einen wichtigen zell- und gewebespezifischen Mechanismus dar, der gezielt zur Aktivierung beziehungsweise Deaktivierung der Transkription von Genen führt, ohne die DNA-Sequenz zu verändern (Bernstein *et al.*, 2007). Auf DNA-Ebene ist der bestuntersuchtete Mechanismus die Methylierung von Cytosinen am C5-Atom, die vor Guaninen liegen, und in sogenannten CpG-Inseln („CpG-Islands“) gehäuft vorkommen können. Diese Inseln befinden sich in der Promotorregion von Genen.

Zur Analyse der Methylierung relevanter Regulierungsbereiche wurde die Bisulfit-Sequenzierung verwendet (Frommer *et al.*, 1992). Hierzu wurde genomische DNA aus der Probe (Gewebe, Zellen) mittels des QIAamp DNA Micro Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gewonnen. 20-40  $\mu$ L der DNA-Lösung wurden anschließend mit dem EpiTect Bisulfit Kit (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers in der Reaktion eingesetzt. Im Anschluss wurde die DNA mittels PCR und spezifischen Oligomeren (siehe Kapitel 2.1.5), die die entsprechenden Bereiche abdecken, amplifiziert und die aufgereinigten Amplifikate mittels TA-Klonierung in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert (siehe Kapitel 2.2.9). Aus diesem konnte die Sequenz über einen T7-Promotorprimer erhalten werden. Durch Vergleich von 8-10 verschiedenen Klonen einer Probe wurde in einem Sequenzvergleich der Grad der Methylierung identifiziert. Konvertierte Cytosine erschienen in der Sequenzierung als Thymin, die vor Guaninen lagen, während methylierte Cytosine weiterhin als solche sequenziert wurden.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Prokaryotische Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte in *E. coli*-Rosetta(DE3)pLys-Zellen. Eine Starterkultur einer Bakterienkolonie wurde mindestens 6 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Diese diente als Inokulum für eine 60 mL Vorkultur in LB-Medium mit Antibiotikum. Deren Inkubation fand bei 37 °C und 180 rpm über Nacht statt. 2 x 400 mL LB-Medium mit Antibiotikum dienten nach Inokulierung mit je 25 mL der Vorkultur als Expressionskulturen und wurden bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von mindestens 0,5 angezogen. Die Induktion der Expression bei 37 °C erfolgte mit je 100 µL 1 M IPTG und nachfolgend eine Inkubation bei 37 °C für 3 h und 180 rpm. Nach der jeweiligen Expressionszeit wurden die Zellen 10 min bei 4000 x g und 4 °C in einer J2-MC-Zentrifuge mit JA-14-Rotor (Beckman, Krefeld) pelletiert. Das Pellet wurde in 15 mL kaltem PBS resuspendiert und in 50 mL Schraubgefäßen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.3.2 Zellaufschluss

**Tab. 2.3.1: RIPA-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM TrisHCl, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, SDS 0,1 % (v/v), Natriumdesoxycholate 0,5 % (w/v), Triton X-100 1 % (v/v)

Für den Aufschluss prokaryotischer Zellen wurden je nach Maßstab zwei Methoden eingesetzt:

- chemisch/physikalischer Aufschluss mit Hitze in 2x Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für kleine Zellmengen
- mechanischer Aufschluss im EmulsiFlex-B-15 Batch-Hochdruckhomogenisator für größere Zellmengen

Der denaturierende chemisch/physikalische Aufschluss wurde für die Gewinnung von Proteinlysate für Western Blot-Analysen eingesetzt.

Für den Aufschluss eukaryotischer Zellen standen je nach Maßstab drei Methoden zur Verfügung:

- chemischer Aufschluss in RIPA-Puffer für kleine Zellmengen
- mechanischer Aufschluss im Precellys Homogenisator für kleine Zellmengen
- mechanischer Aufschluss im EmulsiFlex-B-15 Batch-Hochdruckhomogenisator für größere Zellmengen

Die ersten beiden Methoden wurden für die RNA-Isolierung (siehe Kapitel 2.2.1) sowie die Gewinnung von Proteinlysate für Western Blot-Analysen eingesetzt.

Natives Protein erhielt man durch den Aufschluss mit dem „Batch“-Homogenisator. Eine mit einer Tablette Complete-Proteaseinhibitormix (Roche, Mannheim) versetzte Zellsuspension von 5-15 mL wurde in einem EmulsiFlex-B-15 Hochdruckhomogenisator (Avestin, Mannheim) mittels dreimaligem Durchlauf bei einem Druck von mindestens 70 bar aufgeschlossen. Die Separierung von löslichen und

unlöslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 20 000 x g und 4 °C in einer J2-MC-Zentrifuge mit JA-17-Rotor (Beckman, Krefeld). Der Überstand wurde in ein neues 50 mL Röhrchen übertragen und die Proteinkonzentration (siehe Kapitel 2.3.4) bestimmt. Für die weitere Nutzung und Lagerung wurde das Lysat mit einem äquivalenten Volumen wasserfreien Glycerins versetzt und bei -20 °C gelagert.

### ***2.3.3 Anreicherung von sekretierten Proteinen aus Zellkulturüberständen***

Die von eukaryotischen Zellen exprimierten und in das Kulturmedium sekretierten Proteine lagen in einer hohen Verdünnung vor und wurden daher mit dem StrataClean Material (Agilent, Waldbronn) nach Herstellerprotokoll angereichert. Die an die Silikatmatrix nicht selektiv gebundenen Proteine wurden durch Aufkochen bei 95 °C für 5 min in 2x Laemmli-Puffer (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gelöst.

### ***2.3.4 Proteinbestimmung mittels der Bradfordmethode***

Die Bradfordmethode zur Quantifizierung des Proteingehalts einer Lösung nutzt die Bindung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 an unpolare und kationische Aminosäureseitenketten und die damit verbundene Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 auf 595 nm, die durch den Ladungsausgleich im Molekül zu Stande kommt (Bradford, 1976).

Für die Quantifizierung wurde eine Standardreihe mit BSA angesetzt. Die Proben wurden in Wasser verdünnt. Nach Ansetzen aller Verdünnungen wurden jeweils 200 µL des Bradford-Reagenz (BioRad, München) hinzupipettiert, die Flüssigkeiten durch Vortexen gemischt und ca. 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm im Photometer.

### ***2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)***

**Tab. 2.3.2: SDS-PAGE-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1,5 M TrisHCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M TrisHCl, pH 6,8
1x SDS-Laufpuffer	25 mM TrisHCl, pH 8,3, 192 mM Glycin, SDS 0,1 % (v/v)

Je nach notwendigem Auftrennungsbereich wurden 10 - 15 %-ige SDS-Polyacrylamidgele in Glaskammern mit 1 mm Geldicke (BioRad, München) hergestellt.

Die SDS-PAGE zur Auftrennung eines Proteingemisches nach deren Molekulargewicht wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) bei einer Spannung von 60 V für das Sammelgel und 140 V für das Trenngel in einem Mini-PROTEAN-System (BioRad, München) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker diente der peqGold Protein-Marker (peqLab, Erlangen).

### 2.3.6 Immunblot („Western Blot“)

**Tab. 2.3.3: Puffer für den Immunblot**

Stoff	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	300 mM Tris, Methanol 10 % (v/v)
Anodenpuffer II	30 mM Tris, Methanol 10 % (v/v)
Kathodenpuffer	30 mM Tris, 40 mM Glycin, Methanol 10 % (v/v)
PBS-Tween	1x PBS, Tween-20 (Polysorbat 20) 0,1 % (v/v)
Blockpuffer	1x PBS, Tween-20 (Polysorbat 20) 0,1 % (v/v), Magermilch 5 % (w/v)
ECL-Detektlösung	2,5 mM Luminol, 0,4 mM 4-Hydroxycimtsäure, 100 mM TrisHCl, pH 8,5

Mittels „Semi-Dry“-Immunblot in einer Trans-Blot SD Kammer (BioRad, München) wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Protran-Nitrocellulosemembran (GE Healthcare, Frankfurt/Main) übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Pro Blot-Paket (Blotpapier (GE Healthcare, Frankfurt/Main), Membran und Gel) war eine Stromstärke von 70 mA ausreichend, um die Proteine in 1 h zu transferieren.

Anschließend wurden unspezifische Proteinbindestellen der Membran durch Inkubation mit Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C besetzt. Es erfolgte eine jeweils einstündige Inkubation mit Primär- beziehungsweise Sekundärantikörpern, die in Blockpuffer verdünnt waren, wobei nach jeder Inkubation drei Waschschrte je 10 min mit PBS-Tween durchgeführt wurden.

Für die Detektion wurden je Membran 2 mL ECL-Detektlösung und 0,75 µL Wasserstoffperoxid aufgetragen und das durch die enzymatische Reaktion hervorgerufene Chemilumineszenzsignal im digitalen Fusion-System (PeqLab, Erlangen) für die gesamte Membran detektiert.

### 2.3.7 Titrations-ELISA („Enzyme linked immuno-sorbent assay“)

**Tab. 2.3.4: ELISA-Puffer**

Stoff	Zusammensetzung
Benetzungspuffer	0,01 M Dinatriumcarbonat, 0,04 M Natriumhydrogencarbonat, 0,00002 % Glutathioncasein, pH 9,6
Blockpuffer	1x PBS, Tween-20 (Polysorbat 20) 0,05 % (v/v), Casein 0,2 % (w/v)
Waschpuffer	1x PBS, Tween-20 (Polysorbat 20) 0,05 % (v/v)
Stopplösung	0,5 M Schwefelsäure

Der Titrations-ELISA diente der Validierung der Qualität und relativen Quantität der prokaryotisch exprimierten GST-Fusionsproteine im Bakterienlysat. Der Ansatz verfolgte eine *in-situ* Aufreinigung des spezifischen Proteins an der Mikrotiterplatte, die durch Bindung der Glutathion-S-transferase des Fusionsproteins an gekoppeltes Glutathioncasein (GC) erreicht wurde (Sehr *et al.*, 2001).

Je Bakterienlysat wurden zwei Reihen einer über Nacht mit GC beschichteten 96-Lochplatte eingesetzt. In die erste Spalte wurde das Bakterienlysat mit einer Konzentration von 1 mg/mL vorgelegt und durch Übertragung in jeder weiteren Spalte 1:3 verdünnt. Dieses wurde 1 h auf der Platte inkubiert.

Es wurden Primärantikörper, die gegen die N-terminale Glutathion-S-transferase (Verdünnung 1:10 000) beziehungsweise den C-terminalen TAG (Verdünnung 1: 1000) gerichtet waren, eingesetzt. Die Antikörper wurden 1 h bei Raumtemperatur auf der Platte inkubiert. Es folgten drei Waschschrte. Die HRP-konjugierten Zweitantikörper (Anti-Ziege beziehungsweise Anti-Maus, Verdünnung je 1:10 000) wurden 1 h bei Raumtemperatur auf der Platte inkubiert. Es folgten drei Waschschrte. Die Detektion von gebundenem Protein wurde mittels Farbumschlags von ortho-Phenylendiamin (Dako, Hamburg), der bei der Katalyse von Wasserstoffperoxid eintritt, nach Zugabe der Stopplösung bei 490 nm gemessen.

### 2.3.8 Multiplex-Serologie basierend auf der Luminex xMAP-Technologie

Der ELISA erlaubt einen sensitiven und robusten Nachweis von Autoantikörpern in Patientenseren, jedoch ist diese Methode nicht hochdurchsatzgeeignet. In einer 96-Lochplatte lässt sich je Vertiefung nur ein Antigen gegen ein Serum messen.

Die xMAP-Technologie (Luminex, Austin, USA) umgeht diese Problematik, indem

- 1) als stationäre Phase farbcodierte Polystyrolkugeln (sog. „Microspheres“ beziehungsweise „Beads“) mit einem Durchmesser von 5,6 µm eingesetzt werden und

2) die Detektierung der „Beads“ als auch des Probensignals durchflusszytometrisch mittels zweier Laser erfolgt.

Durch die Farbcodierung der „Beads“, die sich eindeutig anhand der Emission nach Anregung durch einen 635 nm-Laser bestimmen lässt, stehen je nach System bis zu 500 unterschiedliche „Bead“/Farbregionen für die Messung zur Verfügung, die eine parallele Messung von bis zu 500 verschiedene Analyten pro Vertiefung zulassen. Hierdurch wird bei mindestens vergleichbar guten Ergebnissen zum ELISA besonders der Probenverbrauch stark verringert und die Datengewinnung erhöht (Pickering *et al.*, 2002). Mit Hilfe dieser Technologie konnten sowohl in der AG Jäger als auch in anderen Arbeitsgruppen serologische Daten im Hochdurchsatz erhalten werden (Waterboer *et al.*, 2005; Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht).

#### 2.3.8.1 Prinzipieller Ablauf der Multiplex-Serologie

**Tab. 2.3.5: Multiplex-Serologie-Puffer**

Stoff	Zusammensetzung
Blockpuffer	1x PBS, Casein 0,1 % (w/v)
Lagerungspuffer	1x PBS, Casein 0,1 % (w/v), 0,05 % Natriumazid (v/v)
Präinkubationspuffer	1x PBS, Casein 0,1 % (w/v), Polyvinylalkohol 0,5 % (w/v), Polyvinylpyrrolidon 0,8 % (w/v), CBS-K 2,5 % (w/v), prokaryotisches Lysat mit GST-Tag-Leerprotein 10 % (v/v)

Für serologische Messungen stehen Seromap-„Beads“ (Bio-Rad, München und Multimatrix, Heidelberg) zur Verfügung, die verbesserte Hintergrundeigenschaften zu Standard-„Beads“ besitzen sonst jedoch identisch mit diesen sind.

Die Analyten für die Serologie stellten potentielle Antigene dar, die als GST-Fusionsproteine prokaryotisch exprimiert wurden. Die Bindung der Proteine an die „Beads“ erfolgte über Glutathion-casein (GC). Dieses wurde vorher durch kovalente Kopplung von Glutathion und Casein über SMPB, einem hetero-bifunktionellen „Crosslinker“ zur Kopplung an Amin- und Thiolgruppen, dessen N-Hydroxysuccinimidylrest an die Amingruppen des Caseins und der Maleinimidrest an die Thiolgruppe des Glutathions bindet, hergestellt. Anschließend wurde das GC mittels einer weiteren N-Hydroxysuccinimid vermittelten Reaktion an den Carboxylgruppen der SeroMAP-„Beads“ immobilisiert.

Diese mit GC-gekoppelten „Beads“ wurden anschließend mit GST-Fusionsproteinen beladen. Die Zielmenge pro Vertiefung betrug 2000 „Beads“ je Farbregion, um nach Abzug von Verlusten eine ausreichende Menge an „Beads“ für die Messung zu gewährleisten. Da alle Messungen in Triplikaten stattfanden, erhielt man die finale Beadanzahl durch Multiplizieren:

$$2000 \text{ „Beads“/Vertiefung} * \text{Anzahl der Seren} * 3 = \text{benötigte „Beads“/Region}$$

Für die vollständige Beladung einer Menge von drei Millionen „Beads“ einer Region mit einem spezifischen GST-Fusionsprotein wurde eine Lysatmenge von 1 mg als ausreichend betrachtet, sofern anhand der Messung im Titrations-ELISAs (siehe Kapitel 2.3.7) der Anteil des Fusionsproteins im Gesamtlisat ausreichend war.

Zur Eliminierung von humanen Antikörpern und weiteren störenden Molekülen, die gegen die Glutathiontransferase als auch die SV40-tag-Sequenz gerichtet sein könnten, wurde eine Präinkubation der Patientenseren mit bakteriellem Lysat, das nur das GST-tag-Protein enthielt, durchgeführt. Die finale Verdünnung der Seren für die Messung, der biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Human beziehungsweise Anti-Maus) sowie des Streptavidin-R-Phycoerythrins betrug 1:1000.

Das Bio-Plex 200-System (Bio-Rad, München) wurde nach Vorgaben des Herstellers kalibriert. Die Messbedingungen pro Vertiefung betragen eine Messung von mindestens 100 „Beads“ pro Region in einem maximalen Volumen von 80 µL und einer maximalen Zeit von 120 s.

### 2.3.8.2 Auswertung der Messdaten

Die erhaltenen Messwerte als mediane Fluoreszenzintensitäten („median fluorescence intensity“, MFI) der gemessenen „Beads“ pro Analyt wurden mittels einer Excel-Auswertungsvorlage aus den Rohdaten zusammengefasst und ausgewertet. Hierzu wurde zuerst der Wert für den Hintergrund einer Probe, der unspezifische Interaktionen des Serums mit dem GST-tag-Proteinbereich aufzeigte, vom jeweiligen Messwert subtrahiert und anschließend der Median des Triplikats eines Analyten pro Probe als finaler Messwert gebildet. Da bisher kein geeigneter Standard für die Multiplex-Serologie existiert, wurde zur Bestimmung positiver Antikörperantworten ein iteratives Verfahren auf Basis der Messwerte gesunder Spenderseren mit vergleichbarer Alters- und Geschlechterverteilung verwendet (Waterboer *et al.*, 2005). Hierbei wurde ein Schwellenwert für jeden Analyten aus dem Mittelwert der MFIs addiert mit der dreifachen Standardabweichung berechnet. Über diesem Schwellenwert musste ein Messwert liegen, um als positiv zu gelten. Als minimaler Schwellenwert wurde jedoch ein MFI von 50 gewählt, um über dem Detektionslimit des Gerätes zu liegen und zu geringe, schwankungsanfällige Messwerte

auszuschließen. Zur Erhöhung der Stringenz und zum Vergleich zwischen schwach und stark positiven Antikörperantworten wurden die Messwerte gegen 1x und 3x Schwellenwerte überprüft.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM inklusive entsprechender Zusätze (siehe Kapitel 2.1.2) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert (HERA Cell 150, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) und den Empfehlungen der American Type Culture Collection (ATCC) folgend über das Ablösen der Zellen mit 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies, Darmstadt) subkultiviert.

### 2.4.2 Transiente Transfektion

Das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen, die Transfektion, fand mittels des Reagenzes Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Darmstadt) statt, das mit DNA Liposomen ausbildet, die mit der Zellmembran verschmelzen und die DNA in die Zelle einschleusen.

Zur Transfektion wurde das Herstellerprotokoll für 6-Loch-Zellkulturplatten, 10 cm-Zellkulturschalen beziehungsweise T25- oder T75-Zellkulturflaschen verwendet. Im Fall von Plasmiden mit exprimierten GFP-Proteinen wurde die Transfektionseffizienz durch Einsatz unterschiedlicher DNA-Mengen und DNA zu Reagenz-Mischungsverhältnissen durchflusszytometrisch bestimmt und die optimalen Parameter in späteren Experimenten verwendet.

### 2.4.3 Epigenetische Regulation der Genexpression

Der Einfluss der epigenetischen Regulation auf die Genexpression wurde mit dem Demethylierungsagens 5-Azacytidin (Aza), einem Inhibitor der DNA Methyltransferasen (DNMT), und dem Antibiotikum Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor der Histondeacetylasen (HDAC), in den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, BxPC-3, MiaPaCa-2 und Panc-1 bestimmt.

Der experimentelle Ablauf orientierte sich an publizierten Protokollen und ist in Tabelle 2.4.1 dargestellt (Suzuki *et al.*, 2008; Kawamoto *et al.*, 2008).

**Tab. 2.4.1: Experimentprotokoll zur Analyse der Genregulation**

Ansatz	Eingesetzte Konzentration [µM]	Lösungsmittel	Initiale Kultivierung ohne Substanz	Mediumwechsel/Substanz-zugabe und Kultivierungszeitraum	Messzeitpunkte ab Zugabe von Substanz
Aza	4; 1	Aqua dest./Essigsäure 1:1	24 h	Jeweils 24 h; 72 h mit Aza	0 h, 24 h, 48 h, 72 h
TSA	0,5; 0,2	DMSO	48 h	Jeweils 24 h; 48 h mit TSA	0 h, 24 h, 48 h

Kombination (Aza/TSA)	4/0,5; 1/0,2	Siehe oben	24 h	Jeweils 24 h; 48 h mit Aza, 24 h mit TSA	72 h
--------------------------	--------------	------------	------	---	------

Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät und ohne Zusätze 24 h (Aza und Kombination) beziehungsweise 48 h (TSA) kultiviert. Ab dem jeweiligen Zeitpunkt erfolgte die Kultivierung mit der jeweiligen Substanz und einem täglichen Mediumwechsel. Überstände und Zellen der jeweiligen Messzeitpunkte wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen humaner Zelllinien wurden am inversen Mikroskop CKX41 (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Mit Hilfe der gekoppelten Kamera und der cellSense-Anwendung wurden Digitalaufnahmen gespeichert.

#### **2.4.5 Durchflusszytometrische Analysen**

Das Prinzip der Methode basiert auf der Messung von lichtbrechenden und Fluoreszenzeigenschaften von in einer Kapillaren vereinzelt Zellen. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden an einem FACS CantoII (BD Biosciences, Heidelberg) mit dem Steuer- und Analyseprogramm FACS DIVA (Version 6.1.2, BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Es standen drei Laser mit den Wellenlängen 405, 488 und 635 nm zur Verfügung. Dies erlaubte neben der Messung der Zellgröße („Forward Scatter“ - FSC) und der internen Struktur sowie Zellgranularität („Side Scatter“ - SSC) bei 488 nm, weitere Analysen mittels Fluoreszenzfarbstoffen durchzuführen.

Als Kontrollen wurden unmarkierte Zellen zur Bestimmung der Autofluoreszenz der Population und im Falle von Mehrfachmarkierungen einfachmarkierte Zellen benötigt, um Emissionsüberstrahlungen eines Fluorochroms in den Detektionskanal eines anderen zu identifizieren und in ein Kompensationsprotokoll aufzunehmen. In jeder Messung wurden mindestens 10 000 Zellen eingelesen.

Die Endanalyse und grafische Darstellung wurde mit dem Programm FlowJo (Version 7.6.5, Tree Star, Ashland, USA) durchgeführt.

##### **2.4.5.1 Transfektionseffizienz von Plasmiden in humanen Zelllinien**

Die Effizienz der Transfektion von Plasmiden, die für GFP- beziehungsweise GFP-Fusionsproteine codieren, in humane Zelllinien wurde anhand des Verhältnisses der positiven zur Gesamtzellpopulation bestimmt. Positive waren hierbei diejenigen Zellen, die auf Grund vorhandenen GFP-Proteins nach Anregung bei 488 nm eine über dem Schwellenwert liegende Emission bei 510 nm zeigten.



#### *2.4.5.2 Apoptosebestimmung humaner Zelllinien*

Mittels des Fluorochrom gekoppelten Allophycocyanin-(APC)-Annexin-V-Farbstoffs (BD Biosciences, Heidelberg) (Anregung: 635 nm/Emissionsmessung bei 660 nm) und dem Chromophor enthaltenden 7-amino-Actinomycin (7-AAD)(BD Biosciences, Heidelberg) (Anregung: 488 nm/ Emissionsmessung bei 670 nm) konnten Zellpopulationen in lebende, apoptotische und nekrotische Zellen differenziert werden. APC-Annexin-V bindet nur an Phosphatidylserin, wenn es bei Einleitung der Apoptose an der Oberfläche der Zellmembran vorliegt. 7-AAD interkaliert in DNA, die nur in späten Apoptosestadien oder Nekrose der Zellen erreicht werden kann.

Die Markierung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

#### *2.4.5.3 Proliferationsmessung humaner Zelllinien*

Die Proliferation wurde mit dem Farbstoff Paul Karl Horan-(PKH)-26 (Anregung: 488 nm/ Emissionsmessung bei 585 nm) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), der in der Zellmembran fixiert wird, über mehrere Messtage hinweg bestimmt. Da der Farbstoff nicht kontinuierlich zugeführt wurde, titrierte er sich mit jeder Zellteilung aus, sodass die Intensität pro Zelle abnahm. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll verfahren.

### **2.4.6 Histologische Schnittpräparate**

#### *2.4.6.1 Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe („Formalin-fixed Paraffin-embedded tissue“ [FFPE])*

Präpariertes Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Pankreasgewebe wurde für Schnittpräparate aus dem Europäischen Pankreaszentrum (Universitätsklinik Heidelberg) erhalten. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 4-6 µm hergestellt und auf speziell beschichtete Objektträger HistoBond+ (Marienfeld, Lauda Königshofen) aufgetragen. Sofern möglich wurden je Probe 15 Schnitte präpariert.

#### *2.4.6.2 Kryogewebe*

Kryokonserviertes Gewebe für Schnittpräparate wurde vom Europäischen Pankreaszentrum (Universitätsklinik Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde fixiert im Tissue-Tek OTC-Einbettmedium (Sakura, Staufen) im Kryostat-Mikrotom Microm 550 MVP (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) bei ca. -22 °C präpariert, indem Schnitte mit einer Dicke von 5-7 µm hergestellt und auf speziell beschichtete Objektträger HistoBond+ (Marienfeld, Lauda Königshofen) aufgetragen wurden. Sofern möglich wurden je Probe 15 Schnitte hergestellt.

### **2.4.7 Immunhistochemische Gewebeanalyse**

Die immunhistochemischen Färbungen zur SFRP2-Detektion in Formalin fixiertem in Paraffin eingebettetem Pankreasgewebe, sowohl die Gewebe-„Arrays“ als auch die Gewebeschnitte, wurden am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg etabliert und durchgeführt. Hierzu wurde ein automatisiertes System verwendet, das auf einer Alkalischen Phosphatase-Detektion basiert. Der Antikörper wurde 1:20 verdünnt eingesetzt.

Die SFRP2-Detektion in Präparaten der kryokonservierten Gewebe wurden mit einer Peroxidase-Detektion in einem BOND-MAX-System (Leica, Nussloch) durchgeführt. Der Antikörper wurde 1:5000 verdünnt eingesetzt.

Die Dokumentation der bearbeiteten Objektträger erfolgte im Digitalaufnahmesystem NanoZoomer2.0-HT (Hamamatsu Photonics, Herrsching), sodass Bilder mit frei wählbaren Vergrößerungsstufen am Rechner zur Verfügung standen. Diese konnten mit dem NanoZoomer Digital Pathology Virtual Slide Viewer-Programm (Version 1.2.36, Hamamatsu Photonics, Herrsching) betrachtet werden.

Die abschließende qualitative Beurteilung der Gewebe und der Färbeintensitäten der SFRP2-Detektion wurden stichprobenartig mit Dr. Frank Bergmann (Arbeitsgruppe Pankreas, Pathologisches Institut der Universitätsklinik Heidelberg) abgeglichen. Die Färbeintensitäten wurden dabei auf einer Skala von 0 (negativ), 1 (schwach positiv, primär Einzelzellen), 2 (deutliche Färbung in mindestens der Hälfte der Zellen/des Gewebes) und 3 (stark positiv im Großteil der Zellen/des Gewebe) bewertet. Die Zwischenwerte 1,5 und 2,5 waren bei uneindeutigen Ergebnissen möglich.

## **2.5 Bioinformatische Methoden**

### **2.5.1 Literaturdatenbankrecherche**

Die Literaturrecherche zu den einzelnen Genen erfolgte mittels der öffentlichen internetbasierten PubMed-Literaturdatenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) der National Institutes of Health (Bethesda, Maryland) und folgenden Suchparametern: "Gencode" + "pancreatic cancer", "melanoma", "auto-antibodies", "tumor-associated antigen" oder "apoptosis".

Die Datenbank wird kontinuierlich aktualisiert und besitzt daher keine Versionsnummer.

### **2.5.2 Proteindatenbankrecherche in UniProtKB/Swiss-Prot**

Die Universal Protein Resource (UniProt) stellt einen Zusammenschluss mehrerer Informationsquellen aus dem European Bioinformatics Institute (Hinxton Cambridge, Großbritannien), dem Swiss Institute of Bioinformatics (Genf, Schweiz) und der Protein Information Resource (Washington, USA) dar, die ihre Daten in der UniProt Knowledge Base bereitstellen. In einer Subdatenbank, der UniProtKB/Swiss-Prot, befinden sich nur Proteineinträge mit experimentell validierten und kontinuierlich

gepflegten Daten (Magrane et al., 2011). Für die Recherche wurden die dort enthaltenen Einträge für humane Proteine genutzt.

### **2.5.3 Genexpressionsdatenbank (*Gene Expression Atlas in der ArrayExpress-Datenbank*)**

Die ArrayExpress-Datenbank am European Bioinformatics Institute (Hinxton Cambridge, Großbritannien) enthält „Microarray“-Expressions- und Hochdurchsatzsequenzierungsdaten (Parkinson *et al.*, 2011). Eingesetzt wurde die Suchanwendung des Gene Expression Atlas, in dem die Einzelgen Daten der Experimente mit weiteren Zusatzinformationen verfügbar sind. Für jedes identifizierte Gen des Hefe-„Screenings“ wurden die hinterlegten Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe beschränkt auf Humanproben abgefragt.

### **2.5.4 Netzwerkanalyse**

#### **2.5.4.1 Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)**

Für Einzelanalysen der nächstwahrscheinlichen Interaktionen der Kandidaten mit anderen Proteinen wurde STRING in den Versionen 8.1-9.0 verwendet, das neben der manuell gepflegten Datenbank zu publizierten Interaktionen auch spezifische Datenbanken (wie z.B. die Human Protein Reference Database (HPRD)) und Kontextdatenbanken (wie z.B. die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)) durchsucht (Snel *et al.*, 2000). Als Suchparameter wurde das in der UniProtKB hinterlegte Proteinkürzel eingegeben und die Suche auf Interaktionen im humanen System beschränkt. Als untere Konfidenzgrenze wurde ein Wert von 0,7 definiert und es sollten maximal 20 Interaktionen angezeigt werden.

#### **2.5.4.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)**

Komplexe Listen der Gene wurden mittels des kommerziell vertriebenen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood, USA) analysiert, um Interaktionen zwischen Kandidatengruppen identifiziert werden konnten. Die Software greift bei der Suche auf die zentrale Datenbank, die Ingenuity Knowledge Base, zurück, die umfangreicher als die STRING-Datenbank ist und zusätzlich u.a. Expressionsdaten und miRNA-Interaktionen enthält. Als Ausgabe standen detaillierte Listen der Ausgangskandidaten und deren identifizierter Partner hinsichtlich Lokalisation und Funktion zur Verfügung. Darüber hinaus wurde eine grafische Übersicht des Netzwerk dargestellt.

## 2.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Natalia Becker und Axel Benner (Abteilung Biostatistik, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Die statistischen Einzelmethode wurden als Anwendungspakete in der R Laufzeitumgebung (Version 2.13.1) ausgeführt.

### 2.6.1 Fisher's exact test

Bei der Analyse von Kontingenztabellen mit kleinen Beobachtungsgrößen wird der Fisher's exact test für zuverlässige Ergebnisse verwendet (Fisher, 1922). Dieser Test überprüft die Signifikanz einer Merkmalsausprägung zwischen Populationen. Der Test war im stats-Basispaket enthalten.

### 2.6.2 Partielle Korrelation

Die partielle Korrelation vergleicht die lineare Korrelation zweier Variablen in einem System von mehreren Variablen unter Konstanthaltung mindestens einer Variablen daraus. Somit lässt sich ein verzerrender Einfluss auf das Verhältnis zwischen beiden beobachteten Variablen minimieren. Die Berechnung wurde mit dem corpcor-Paket (Version 1.6.2) durchgeführt (Schäfer & Strimmer, 2005)

### 2.6.3 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Zwei unabhängige Verteilungen können auf ihre Signifikanz der Übereinstimmung mit dem Parameter freien Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (auch U-Test) überprüft werden, der Messwerten Ränge zuordnet (Wilcoxon, 1945; Mann & Whitney, 1947). Der Test ist auch bei ungleichen Verteilungen robust. Der Test war im multtest-Paket (Version 2.8.0) enthalten (Dudoit *et al.*, 2004).

### 2.6.4 Überlebensanalyse mittels univariater Regression und multivariater proportionaler „Hazard“-Methode nach Cox

Der Einfluss von unabhängigen Variablen auf eine abhängige Variable kann mit der Regressionsanalyse untersucht werden, die ebenso eine Prognose erlaubt. Die Regressionsanalyse wurde eingesetzt, um die Gene zu identifizieren, deren Expression in einem bestimmten Metastasierungsstadium das Überleben von PDAC-Patienten beeinflusste.

Die multivariate Analyse des Einflusses einer Antikörperantwort beziehungsweise der Expression eines Gens auf das Überleben wurde nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox durchgeführt (Cox, 1972). Als Einflussparameter wurden neben einer Antikörperantwort beziehungsweise der Expression definiert: Metastasierungsgrad, Alter, Geschlecht, Resektionsrand des Tumors, Therapie, wobei nicht zwischen Therapien unterschieden wurde. Das Überleben eines Patienten hing

dementsprechend nicht nur von dem Zielparameter „Antikörperantwort“ beziehungsweise „Genexpression“ ab, sondern wurde adjustiert auf das sich aus den anderen Parametern ergebende Risiko („Hazard“-Funktion). Der erhaltene Wert stellte den Effekt auf das Überleben bei Vorhandensein einer Antikörperantwort beziehungsweise der Höhe der Expression dar, wobei Werte größer 1 auf einen negativen und Werte kleiner 1 auf einen positiven Effekt deuteten.

Für die Überlebensanalyse wurde das survival-Paket (Version 2.36-9) verwendet (Therneau & Grambsch, 2000).

## **2.7 Identifizierung anti-apoptotischer Proteine im funktionellen Hefe-„Screening“**

Im Rahmen des Kooperationsprojektes zur Identifizierung und Evaluierung potentiell anti-apoptotischer Zielstrukturen für die Diagnostik, Prognostik und für Therapieansätze im Melanom und Pankreaskarzinom wurden in der AG Zörnig (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) cDNA-Banken von Melanom- und Pankreaskarzinomgewebe in einem „Yeast survival Screening“ analysiert, um anti-apoptotische Proteine zu identifizieren. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes System mit zwei Hefestämmen, in denen sich durch verschiedene Selektionsbedingungen die Apoptose an zwei unterschiedlichen Punkten der Kaskade induzieren lässt (Brezniceanu *et al.*, 2003). Genprodukte der plasmidkodierten in Hefe exprimierten cDNA-Klone, die die induzierte Apoptose blockieren, führen somit zum Überleben der Zellen („yeast survival“). Die Plasmide können aus der Hefe isoliert und anschließend sequenziert werden.

Das Ausgangsmaterial für die Herstellung der cDNA-Banken war im Fall der Melanombank RNA aus dem Gewebe einer Lungenmetastase eines mit einem Malignen Melanom diagnostizierten Patienten, für die Pankreaskarzinombank wurde RNA aus Gewebe mit pankreatischem duktalem Adenokarzinom und Lebermetastasen verschiedener Pankreaskarzinompatienten vereinigt. Neben diesen konnte zudem auf Daten älterer Experimente mit Glioblastom- und Leukämie-cDNA-Banken zugegriffen werden, um mögliche Mehrfachtreffer in den Experimenten zu identifizieren.

### 3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Genen beziehungsweise deren Produkten, die sich für das pankreatische duktales Adenokarzinom als diagnostische und/oder prognostische Biomarker eignen beziehungsweise für diese Tumorentität eine biologische Relevanz besitzen.

Ausgehend von in einem „Yeast Survival Screening“ funktionell identifizierten Genen wurden diejenigen für weitere Experimente in *in silico* Analysen und einer semi-quantitativen Genexpressionsanalyse selektiert, für die anhand veröffentlichter und verfügbarer Daten eine gewebespezifische und differentielle Expression im Tumor, Immunogenität des Proteins beziehungsweise extrazelluläre Lokalisation nachgewiesen oder sehr wahrscheinlich war. Experimentell wurden diese Gene anschließend mittels einer Multiplex-Serologie auf ihre Immunogenität und einer quantitativen Genexpressionsanalyse für das PDAC im Vergleich zu Normalgewebe auf ihre differentielle Expression untersucht.

Das Gen, das für das Secreted Frizzled-related Protein 2, codiert wurde im Tumorgewebe stark überexprimiert nachgewiesen und weiter hinsichtlich der Lokalisierung der Proteinexpression, der epigenetischen Regulierung der Genexpression und funktioneller Aspekte in Proliferations- und Apoptoseexperimenten untersucht.

Die Daten der Multiplex-Serologie und der quantitativen Genexpressionsanalyse wurden mit verfügbaren klinischen Daten der Patientenproben korreliert, um prognostische Marker für das PDAC zu identifizieren.

#### 3.1 *In silico* Analyse der Gene aus dem „Yeast-Survival Screening“ und parameterabhängige Selektion von zu untersuchenden Genen

##### 3.1.1 Identifizierte Gene aus dem „Yeast-Survival Screening“

Ausgangspunkt der Analysen war die zur Verfügung gestellte Genliste aus dem „Yeast-Survival Screening“ des Georg-Speyer-Hauses (siehe Kapitel 2.7).

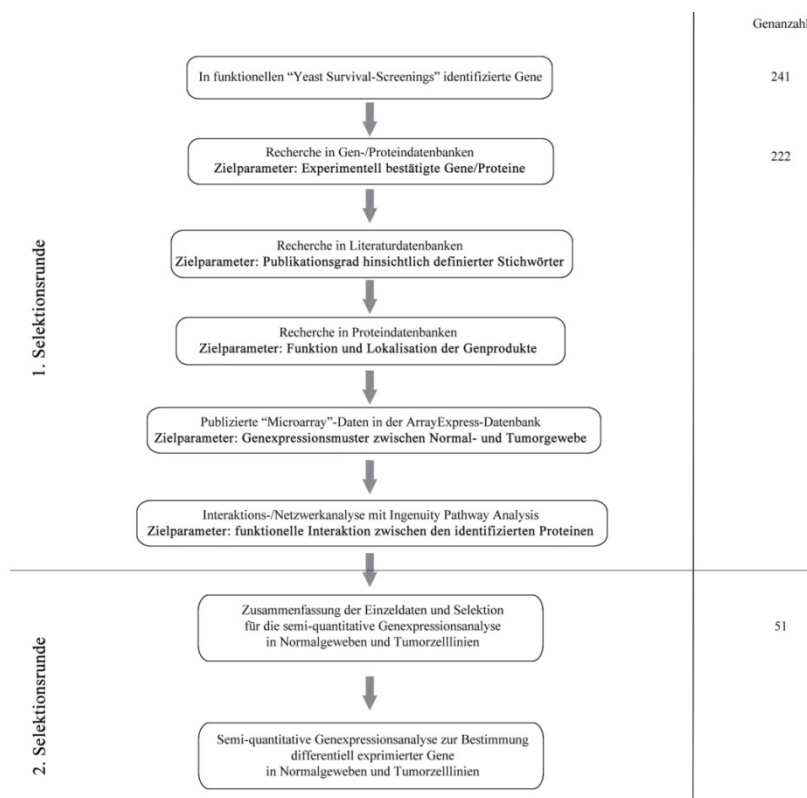
**Tab. 3.1.1: Identifizierte Anzahl an Klonen, deren exprimierte Produkte anti-apoptotisch wirken, aus vier Tumor-cDNA-Banken und Anzahl der redundanten Treffer aus mehreren Banken.** Die Identifizierung der Gene wurde in der AG Zörnig (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/Main) durchgeführt und die Daten für diese Arbeit bereitgestellt.

Screening	Identifizierte cDNA-Klone	Übereinstimmungen zu anderen Screenings
1) Melanom	146	2x zu 2); 7x zu 3); 4x zu 4)
2) Pankreaskarzinom	39	2x zu 1); 1x zu 3)
3) Glioblastom	54	7x zu 1); 1x zu 2)
4) Leukämie	16	4x zu 1)

Insgesamt 185 cDNA-Klone, davon 146 aus der Melanom- und 39 aus der Pankreaskarzinom-cDNA-Bank, enthielten nach dem „Yeast Survival-Screening“ potentiell anti-apoptotische Genprodukte (siehe Tab. 3.1.1). Die erhaltene Liste wurde durch Daten älterer Experimente mit Glioblastom- und Leukämie-cDNA-Banken erweitert, um mögliche Mehrfachtreffer in den Experimenten zu identifizieren. Gene, die in verschiedenen „Screenings“ identifiziert wurden, könnten auf eine stärkere Relevanz im Tumorgewebe deuten. Insgesamt 14 redundante Gene lagen in den Listen vor, wobei sich Übereinstimmungen auf jeweils zwei „Screening“-Experimente beschränkten (siehe Tab. 3.1.1). Nach der Korrektur der redundanten Gene lag die Gesamtanzahl der zu analysierenden Gene bei 241.

### 3.1.2 Ablauf der Selektion der Gene für weitere experimentelle Analysen

Um die interessanten Gene aus der Gesamtliste herauszufiltern, die die genannten Kriterien eines Biomarkers oder tumorrelevanten Protein am ehesten erfüllen, wurden zunächst Publikations- sowie Datenbankrecherchen zur Charakterisierung, Funktion und Lokalisation der Gene und deren Produkten durchgeführt. Netzwerkanalysen sowie Daten aus Genexpressionsanalysen und Serologien dienten der weiteren Übersicht. Die kombinierten Daten führten zu einer ersten Selektion potentiell interessanter Gene (siehe Abb. 3.1.1). Die im ersten Schritt zusammengestellten Daten enthielten nur publizierte, valide Ergebnisse und keine Vorhersagen. Die einzelnen Analyseparameter wurden nicht speziell gewichtet jedoch bestimmte Gen-/Proteineigenschaften und experimentelle Ergebnisse, die Kriterien eines Biomarkers oder Therapieziels waren, positiv bewertet. Diese sind unter 3.1.8 näher dargestellt.



**Abb. 3.1.1: Fließschema: Ablauf der Kandidatenselektion ab Initialdaten.** Die einzelnen unabhängigen Selektionsparameter sowie die Genanzahl zu Beginn und am Ende der Selektionsrunden sind aufgeführt.

### ***3.1.3 Recherche zum Grad der Charakterisierung der Gene und ihrer Produkte in Gen-/Protein- und Literaturdatenbanken***

Die erste Analyse der Genliste ergab das Vorhandensein von 19 Genen, deren Sequenzen mit uncharakterisierten vorhergesagten Proteinen übereinstimmten oder nur Teile codierender Sequenzen enthielten. Da diese, wie die Bezeichnung impliziert, nicht mit experimentellen Ergebnissen in den Datenbanken hinterlegt waren und somit keine Einordnung möglich war, wurden sie nicht weiter bearbeitet. Somit blieben für den ersten Selektionsschritt 222 zu analysierende Gene.

Zu diesen wurde eine Literaturrecherche zu Publikationen mit relevanten Stichwörtern (siehe Kapitel 2.5.1), die bis Juli 2009 veröffentlicht wurden, durchgeführt. Die Stichworte gaben den initialen Fokus der Arbeit wieder. Somit wurde ermittelt, welche Gene im Aufgabenfeld wie intensiv studiert wurden. Zu ca. 50 % der Gene konnten 1-49 Publikationen zu allen gesuchten Stichwörtern gefunden werden, was einer ausreichenden jedoch nicht intensiven Dokumentation der Gene entsprach (siehe Tab. 3.1.2). Mehr als 50 Publikationen lagen für 23 Gene (ca. 10 %) vor, wobei zu neun hiervon mehr als 200 Publikationen zu den gesuchten Stichwörtern veröffentlicht wurden. Hierzu zählten u.a.  $\beta$ -Catenin und CD135/ Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), deren Rolle in der Tumorentstehung und dem -wachstum intensiv studiert wurden (Takahashi 2011); White *et al.*, 2012).

Demgegenüber standen 89 Gene (ca. 40 %) ohne Publikation zu den gesuchten Stichwörtern.

**Tab. 3.1.2: Anzahl der Gene mit kombinierter Publikationsanzahl zu gesuchten Stichwörtern.** Publikationsdaten von insgesamt 222 Genen zu den Stichwörtern „pancreatic cancer“, „melanoma“, „auto-antibodies“, „tumor-associated antigen“, „apoptosis“ wurden zusammengetragen. Die Daten entstammen der PubMed-Datenbank (Stand: Juli 2009).

<b>Gene mit</b>	<b>0 Publikationen</b>	<b>1-49 Publikationen</b>	<b>50-199 Publikationen</b>	<b>über 200 Publikationen</b>
<b>Anzahl</b>	89	110	14	9

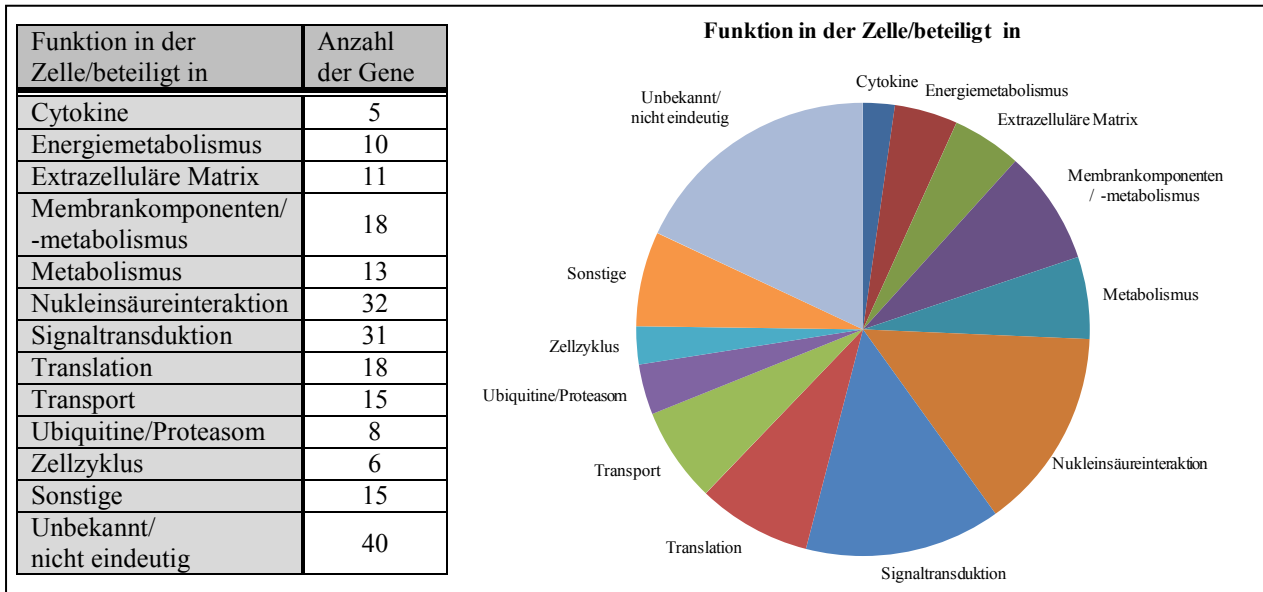
### ***3.1.4 Recherche zu Funktions- und Lokalisationsdaten der Genprodukte in Gen- und Proteindatenbanken***

Experimentelle Daten zu Genen und darin codierter Produkte sind in der umfangreichen UniProt-Datenbank zusammengefasst. Die Funktions- und Lokalisationsdaten wurden aus den Einträgen der humanen Variante jedes Gens extrahiert und zur Übersicht der Verteilung in Gruppen eingeteilt.

Die zellulären Funktionen der Genprodukte verteilten sich in 13 Gruppen (siehe Abb. 3.1.2). Proteine, die mit Nukleinsäuren interagieren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren und Polymerasen, und Proteine mit einer Funktion in der Signaltransduktion, wie z.B. Kinasen und assoziierte Proteine, stellten mit einer Anzahl von 32 beziehungsweise 31 (je ca. 15 %) jeweils die größten Gruppen mit Funktionszuweisung dar. Die hohe Anzahl von Treffern in diesen funktionellen Gruppen könnte mit der „Screening“-Methode zusammenhängen, da die Signaltransduktion und die Regulation der Transkription für die Initiierung und den Ablauf der Apoptose entscheidend sind.

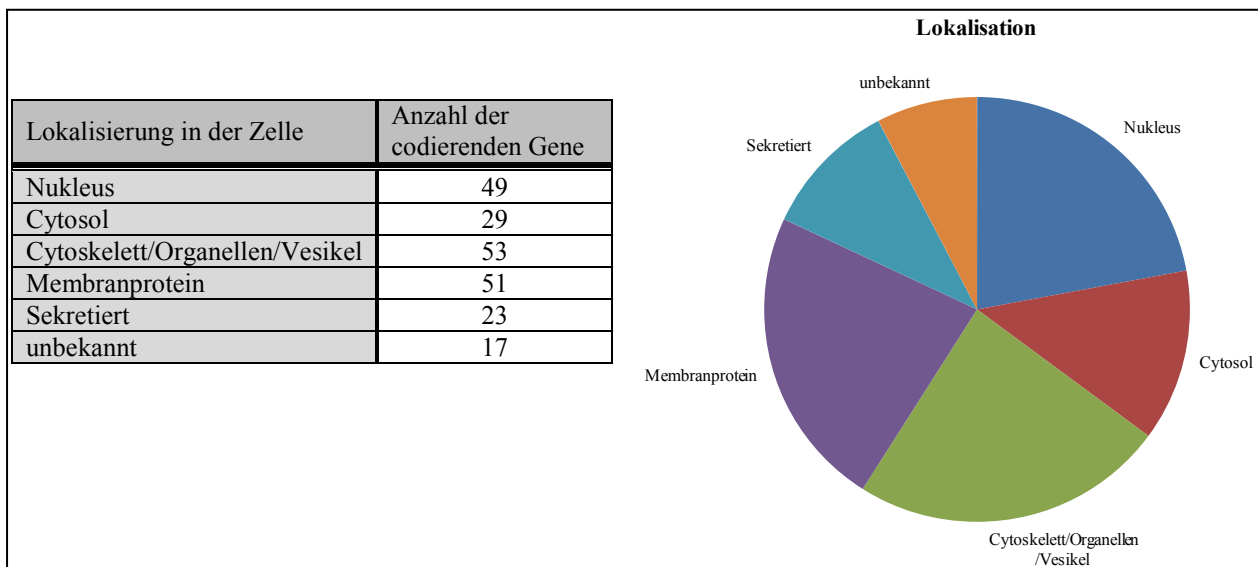


Weitere identifizierte Genprodukte waren funktionell in der Translation (18) und an Transportprozessen beteiligt (15) sowie integrale Komponenten und Enzyme der Membranen (18). Für 40 Genprodukte fehlten experimentelle oder eindeutige Daten zur Funktion.



**Abb. 3.1.2: Anzahl (links) und prozentuale Verteilung (rechts) der Genprodukte auf die jeweiligen zellulären Funktionen.** Daten von insgesamt 222 Genen wurden zusammengetragen. Die Daten entstammen der UniProt-Datenbank (Stand: Juli 2009).

Hinsichtlich der Lokalisierung wurden die Genprodukte in sechs Gruppen eingeteilt (siehe Abb. 3.1.3). Konnte ein Genprodukt an mehreren Lokalisierungen vorliegen, wurde diejenige des primären biologischen Effekts gewählt.



**Abb. 3.1.3: Anzahl (links) und prozentuale Verteilung (rechts) der Genprodukte auf die jeweiligen Lokalisierungen.** Daten von insgesamt 222 Genen wurden zusammengetragen. Die Daten entstammen der UniProt-Datenbank (Stand: Juli 2009).

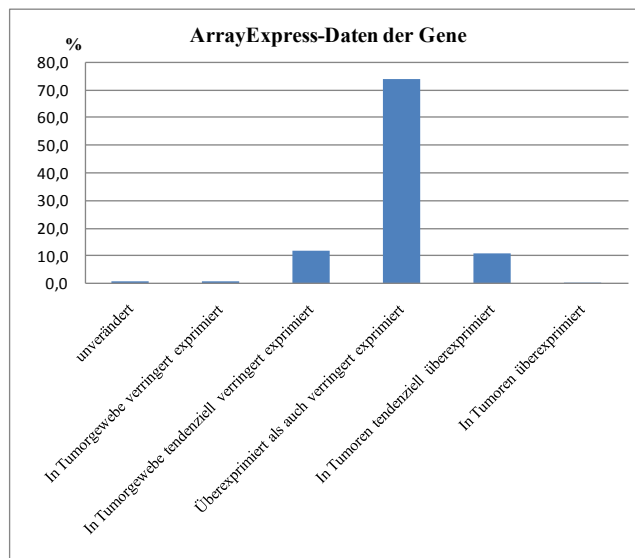
Der Großteil der Genprodukte (ca. 70 %) war gebunden an oder in zellulären Komponenten wie dem Cytoskelett, Organellen oder Vesikeln (53), an oder in Membranen (51) oder im Nukleus (49) lokalisiert. Ein kleinerer Teil lag im Cytosol (29) vor oder wurde sekretiert (23). Obwohl 40 Genprodukte funktionell nicht oder nicht eindeutig beschrieben waren, war die Lokalisation nur von 17 Genprodukten unbekannt.

Somit konnten zu ca. 80 % der Genprodukte eine Information zur Funktion und zu über 90 % der Genprodukte Daten zu Lokalisation bestimmt werden.

### 3.1.5 Genexpressionsdaten in der ArrayExpress-Datenbank

„Array“-Analysen eignen sich, um verhältnisbezogene Quantifizierungen einer hohen Anzahl an Untersuchungsobjekten bei mittlerem Probendurchsatz zu erhalten.

Genexpressionsanalysen mit „Microarrays“ liefern einen Überblick über relative Transkriptverhältnisse und mögliche Korrelationen einer Vielzahl von Genen zwischen verschiedenen Proben. Eine Applikation ist der Vergleich zwischen Normal- und Tumorgeweben. Die Ergebnisse solcher Studien sind in der ArrayExpress-Datenbank zusammengefasst und können parameterspezifisch selektiert werden.



**Abb. 3.1.4: Verteilung der Expressionsdaten der Gene in Tumorgewebe im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe aus der ArrayExpress-Datenbank (Stand: August 2009).** Eine tendenziell veränderte Expression lag bei einer mindestens doppelten Anzahl an Ergebnissen für die eine Gruppe im Vergleich zur anderen vor, eine veränderte Expression bei einer vierfachen Anzahl an Ergebnissen. Geringere Abweichungen in der Anzahl der über- und verringert exprimierten Proben wurden nicht aufgetrennt.

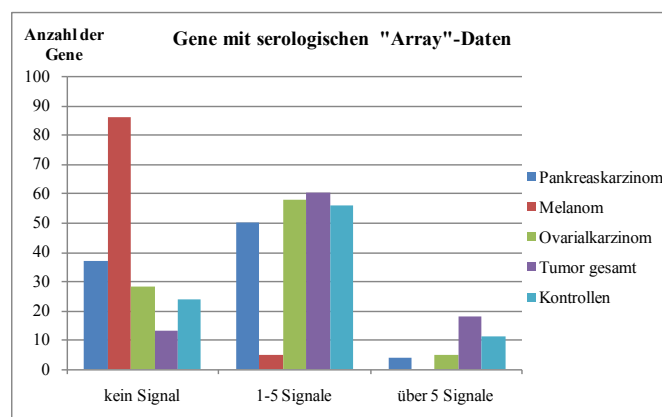
Die Gene wurden einzeln auf ihre gemessenen Expressionsunterschiede in allen Tumor- gegen Normalgewebe ausgewertet und anhand der absoluten Zahlen der Beobachtungen in sechs Expressionsgruppen eingeordnet (siehe Abb. 3.1.4). Eine identische Expression zwischen Tumor- und Normalgeweben lag in der unveränderten Gruppe vor und war bei zwei Genen beschrieben. Für jeweils 10 % der Gene zeigte die Datenbank eine tendenziell veränderte Expression an, die vorlag, wenn das

Expressionsverhältnis in mehr als der doppelten Anzahl der Proben im Vergleich zu den anderen erhöht beziehungsweise verringert war. Nur zwei Gene beziehungsweise ein Gen waren im Großteil der untersuchten Proben verringert exprimiert beziehungsweise überexprimiert, was eine gegensätzliche Expression in wenigen Geweben nicht ausschloss. Geringere Abweichungen in der Anzahl der überexprimierten im Vergleich zu den verringert exprimierten Proben wurden für ca. 75 % der Gene gemessen.

### 3.1.6 Analyse von Protein-, „Array“-Daten zu induzierten Serumantikörperantworten

Serologische „Arrays“ ermöglichen die Identifizierung von Antikörpern in Seren gegen eine Vielzahl von auf einem Träger befindlichen Antigenen, wodurch kombinierte Antikörperantworten in einem Serum gemessen werden können.

Ein entsprechendes Experiment auf Basis des ProtoArray v4.1 (Invitrogen) wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Sacha Gnjatic am Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center (New York) mit je ca. 50 Seren von Tumorpatienten mit Pankreas-, Ovarialkarzinom oder Melanom und gesunden Spendern durchgeführt (Gnjatic *et al.*, 2010). Der vom Hersteller produzierte „Array“ enthielt in der Standardausführung etwa 90 der Gene (ca. 40 %) aus dem „Hefe“-Screening als Testproteine. Die gemessenen Rohdaten wurden von Dr. Sacha Gnjatic freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.1.5: Anzahl identifizierter Antikörperantworten gegen exprimierte Proteine aus der Genliste in Tumorpatienten- und Kontrollseren auf Protein-, „Arrays“.** Es standen je 50 Seren von Tumorpatienten (Pankreaskarzinom (dunkelblau), Melanom (rot), Ovarialkarzinom (grün), gesamt (violett)) und Kontrollen (hellblau) zur Verfügung. Die Messungen wurden mit ProtoArray v4.1-Chips (Invitrogen) am Memorial-Sloan-Kettering Cancer Center (New York) durchgeführt und die Rohdaten von Dr. Sacha Gnjatic zur Verfügung gestellt. Publierte Daten unter Gnjatic *et al.*, 2010.

Die Anzahl der Proteine, gegen die Antikörper in Pankreas- und Ovarialkarzinompatientenseren sowie in den Kontrollen detektiert werden konnten, glied sich in diesen Kollektiven mit ca. 55-65 (siehe Abb. 3.1.5). Die Zahl an Proteinen, für die mehr als 10 % der Seren in den beiden Patientenkollektiven positiv reagierten und somit auf eine Relevanz hindeuten könnten, lag bei drei bis vier. Jedoch waren auch die Kontrollen vergleichbar positiv, sodass kein Unterschied zwischen Patienten und gesunden

Spendern auftrat. Die Melanomseren waren größtenteils negativ für die untersuchten Proteine. Eine höhere Anzahl an positiven Seren war hier erwartet worden, da in Seren von Melanompatienten häufiger spontan induzierte Autoantikörperantworten beobachtet wurden (Hartmann *et al.*, 2005).

### **3.1.7 Netzwerk- und Interaktionsanalyse mit Ingenuity Pathway Analysis**

Die bisherige Recherche umfasste Einzeldaten zu Genen und deren Produkten. Die Identifizierung einer funktionellen Interaktion der Gene untereinander und deren Einbindung in zelluläre Prozesse war anhand der gewonnenen Daten und dem Rechercheansatz nicht möglich. Um eine Aussage über die Zusammenhänge der Gene treffen zu können, wurden diese mit Hilfe des Programms Ingenuity Pathway Analysis (IPA) analysiert.

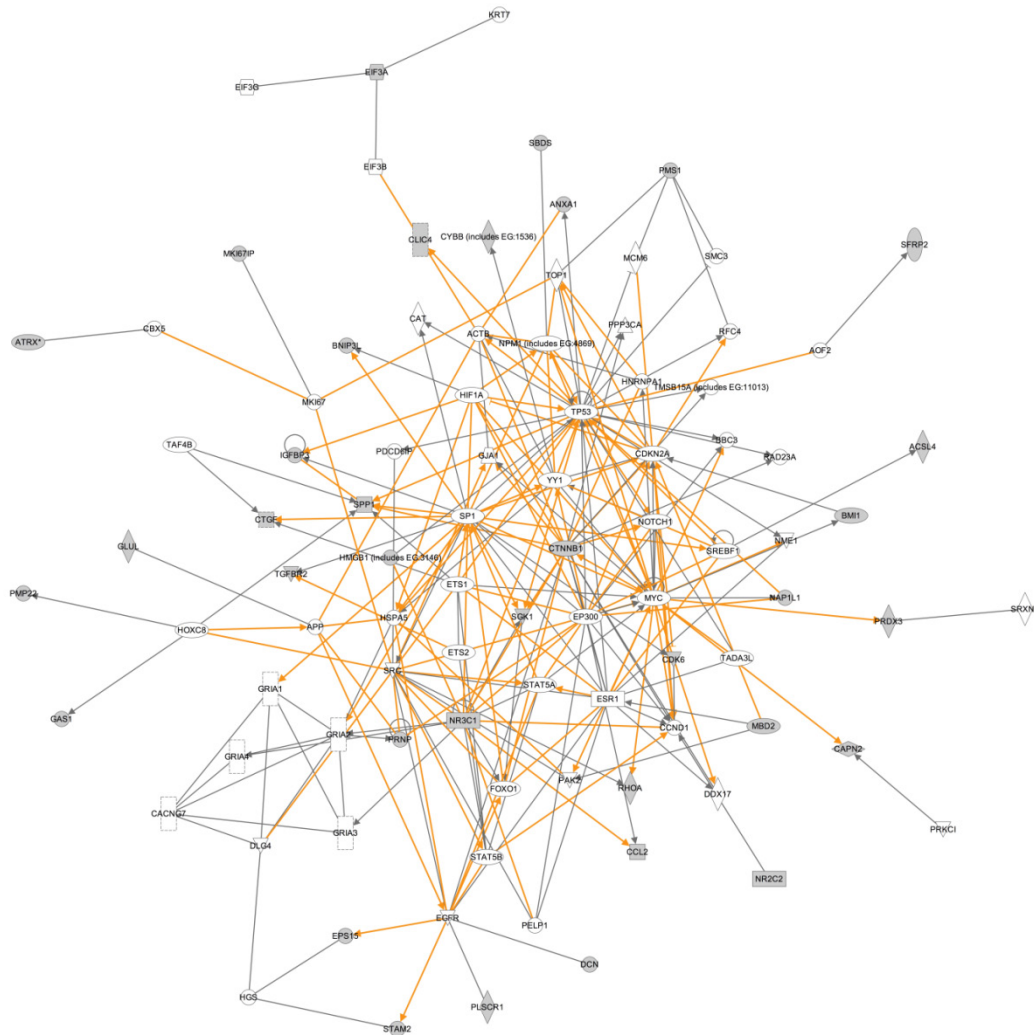
Das Programm ermöglicht die Bearbeitung komplexer Genlisten zur Identifizierung von Korrelationen und Interaktionen im biologischen Kontext, die mit experimentellen Daten belegt sind. Neben vielen Optionen zur zielgerichteten Analyse und Darstellung der Daten je nach der Fragestellung kann der Nutzer entscheiden, wie hoch der Verknüpfungs- und Konfidenzgrad der Interaktionen sein soll.

Höhere Werte bei der Verknüpfung führen zu komplexeren Netzwerken durch Einschluss von mehr möglichen Netzwerkknoten, höhere Werte bei der Konfidenz zur Darstellung hochsignifikanter Interaktionen. Für die Analyse der vorliegenden Genliste wurde ein geringer Verknüpfungsgrad, um abgeschlossene Interaktionsnetzwerke zu erhalten, sowie ein hoher Konfidenzgrad gewählt, um die Gene sicher in das jeweilige Netzwerk einzuordnen.

Mit den gewählten Einstellungen konnten acht relevante Netzwerke identifiziert werden, in denen 170 der 222 Gene durch Interaktionen eingruppiert waren (siehe Tab. 3.1.3). Der Hauptteil der nicht eingruppierten Gene waren die in der Funktions- und Lokalisierungsrecherche ohne ausreichende Daten hinterlegten Gene.

**Tab. 3.1.3: Von der Ingenuity Pathway Analysis-Anwendung identifizierte relevante Netzwerke mit jeweiliger Anzahl der codierenden Gene.** Die Generierung der Netzwerke erfolgte anhand der Anzahl und Relevanz der Gene sowie publizierter Daten im jeweiligen Kontext.

<b>Relevantes Interaktionsnetzwerk</b>	<b>Anzahl der codierenden Gene</b>
Tumorrelevante Interaktionen	45
Zelltod	31
Morphologie	22
Zell-Zell-Interaktion	17
Motilität	17
DNA Replikation und Reparatur	15
Proliferation	12
Zellzyklus	11



**Abb. 3.1.6: Von der Ingenuity-Anwendung erzeugtes Interaktionsnetzwerk der Kategorie „Zelltod“.** Grau unterlegte Knoten entsprechen Genen aus der untersuchten Liste, weiße stellen notwendige Verknüpfungen dar. Graue Verbindungen entsprechen Interaktionen in initialen Subnetzwerken, während orangene die Verknüpfung zum Hauptnetzwerk darstellen. Eine Linie bedeutet eine Interaktion beider Proteine, ein Pfeil zeigt die Aktivierung eines Proteins durch ein anderes an.

Etwa ein Drittel der Genprodukte war in ein Tumor (45) beziehungsweise in ein Zelltod (31) relevantes Netzwerk eingruppiert. Somit zeigten viele der Gene einen funktionellen Zusammenhang, der für eine potentielle Tumorrelevanz sprach. Auch weitere identifizierte Netzwerke, die z.B. Zell-Zell-Interaktionen oder die Proliferation umfassten, wären funktionell und biologisch im Tumor interessant. Die IPA-Anwendung generiert Abbildungen der identifizierten Netzwerke, deren Komponenten eine feste Nomenklatur besitzen. Grau unterlegte Knoten, deren Form von der Lokalisierung des Genproduktes abhängt, entsprechen Genen aus der untersuchten Liste, weiße stellen notwendige Verknüpfungen dar. Graue Verbindungen entsprechen Interaktionen in initialen Subnetzwerken, die zuerst angelegt werden, während orangene die Verknüpfung zum Hauptnetzwerk darstellen, deren Anzahl von der Einstellung des Verknüpfungsgrades abhängt. Eine Linie bedeutet eine Interaktion beider Proteine, ein Pfeil zeigt die Aktivierung eines Proteins durch ein anderes an.

Als zentrale notwendige Verknüpfungspunkte des Zelltodnetzwerks setzte die IPA-Anwendung die Gene von *TP53*, *SPI1* und *MYC*, die für Transkriptionsfaktoren mit einer Relevanz in der Apoptose codieren

(siehe Abb. 3.1.6). Die meisten Genprodukte aus der initialen Liste besaßen ein bis zwei Interaktionspartner im Netzwerk, während  $\beta$ -Catenin die meisten Verknüpfungen hatte, was sich auf Grund der zentralen Rolle des Proteins in der Zelle und seiner guten Dokumentation erklären ließ.

Die identifizierten Netzwerke mit einer kleineren Zahl an eingruppierten Genen wären bei einem höher eingestellten Verknüpfungsgrad potentiell verbunden worden, da z.B. die DNA Replikation, die Proliferation und der Zellzyklus funktionell ineinandergreifen.

### ***3.1.8 Zusammenfassung der Daten und erster Selektionsschritt***

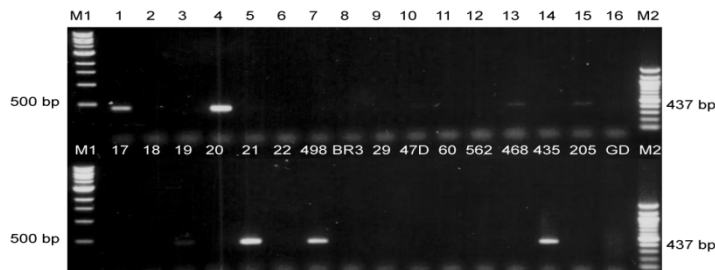
Potentielle Zielmoleküle einer Therapie zeichnen sich durch eine exklusive oder differentielle Expression in Geweben aus, die idealerweise hoch in Tumorgewebe und signifikant geringer in gesundem Gewebe ist (King *et al.*, 1985). Dies erhöht die Chancen der Therapieentwicklung und minimiert Nebenwirkungen durch das Fehlen des Zieles im Körper (Pegram *et al.*, 1998). Für antikörperbasierte Verfahren sind extrazellulär vorliegende Strukturen ideale Zielmoleküle.

Die Daten der *in silico*-Analysen zur funktionellen und lokalen Gruppierung der identifizierten Gene sowie zur Zuweisung relevanter Daten im Hinblick auf Expressionsmuster zwischen Tumor- und Normalproben und identifizierter Autoantikörperantworten in Krebspatientenseren wurden zusammengefasst und ermöglichten eine erste Selektion der Gene. Da das Ziel der Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung von Markern für die Diagnose, Prognose und/oder tumorrelevanten Proteinen des pankreatischen duktales Adenokarzinoms war, wurde ein Querschnitt aus Genen gewählt, die für Membranproteine beziehungsweise sekretierte Proteine oder anhand der Literatur mögliche tumorassoziierte Antigene codieren oder die funktionell relevant für die Regulierung der Tumorentstehung und dessen Wachstum sein könnten. Diese Strategie wurde als optimal angesehen, um unterschiedlich stark charakterisierte Proteine in die Auswahl zu nehmen und dabei die initiale breite Verteilung an Funktionen und Lokalisierungen aufrechtzuerhalten. Es wurden 51 Gene, die in Tabelle 3.2.1 dargestellt sind, für eine weitere Selektionsrunde eingeschlossen.

### 3.2 Semi-quantitative Expressionsanalyse auf Transkriptebene der selektierten Gene

In einem zweiten, experimentellen Schritt wurde mittels einer semi-quantitativen PCR von im ersten Schritt selektierten Genen deren differentielle und gewebespezifische Expression in verschiedenen Normalgeweben und Tumorzelllinien analysiert.

Die Genexpressionsdaten der ArrayExpress-Datenbank schwankten hinsichtlich der Anzahl analysierter Gewebe. Um eine konsistente Anzahl an Expressionsdaten aus demselben Probenkollektiv für einen Vergleich der differentiellen Expression auf Transkriptebene in Normalgewebe und Tumorzelllinien zu erhalten, wurden die Gene mittels semi-quantitativer PCR amplifiziert. Das Probenkollektiv umfasste RNA von 22 Normalgeweben einer kommerziellen Bank und neun Tumorzelllinien, die aus dem Melanom (MDA-MB-435), Leukämiezellen (HL-60, K562), dem Mamma-(SK-BR3, T47D, MDA-MB-468), Colon-(HT29, Colo205) und Renalzellkarzinom (A498) stammten (siehe Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1: Semi-quantitative Expressionsanalyse mittels PCR von *SPPI* (Osteopontin) in Normalgeweben und Tumorzelllinien.** Nach der Amplifizierung wurden die Produkte elektrophoretisch in 1 %-igen Agarosegelen bei 5 V/cm aufgetrennt. Die jeweiligen Gewebe und Tumorzelllinien sind in Tabelle 3.2.1 angegeben. (M1: 1 kb Marker; M2: 100 bp Marker)

Nach der PCR mit 28 Zyklen wurden die Amplifikate gelelektrophoretisch getrennt und anhand der 300 bp Bande des Markers in ihrer Intensität beurteilt. Banden mit gleicher oder stärkerer Intensität wurden als „stark exprimiert“, schwächere Banden als „schwach exprimiert“ und keine sichtbare Bande als „sehr gering bis nicht nicht exprimiert“ definiert.

Die Expressionsmuster der Gene auf der Grundlage des Bewertungssystems waren sehr heterogen, jedoch konnten fünf Gruppen anhand bestimmter Muster identifiziert werden (siehe Tab. 3.2.1):

- in Normalgewebe, jedoch nicht in Tumorzelllinien exprimiert (6 Gene)
- gering in wenigen Normalgeweben und Tumorzelllinien exprimiert (keine hohe Expression in einem der untersuchten Gewebe/einer Zelllinie) (15 Gene)
- in Normalgewebe und Tumorzelllinien exprimiert (hohe Expression in einem der untersuchten Gewebe/einer Zelllinie und sonst schwache Expression) (23 Gene)
- gewebespezifische Expression (1 Gen)
- stark in Tumorzelllinien exprimiert (5 oder mehr Zelllinien mit hohem Expressionsmuster) (6 Gene)

**Tab. 3.2.1: Semi-quantitative Expressionsanalyse mittels PCR der selektierten Gene in Normalgeweben und Tumorzelllinien.** Nach der Amplifizierung wurden die Produkte elektrophoretisch in 1 %-igen Agarosegelen bei 5 V/cm aufgetrennt. Deutlich sichtbare Banden entsprechen einer dunkelroten Füllung, schwache einer hellroten, fehlende einer weißen. Das Normalgewebeskollektiv entstammte einer kommerziellen RNA-Bank, aus verfügbaren Tumorzelllinien wurde RNA isoliert.

Gen	1: Gehirn	2: Leber	3: Herz	4: Niere	5: Lunge	6: Trachee	7: Dickdarm	8: Knochenm.	9: Dünndarm	10: Thymus	11: Milz	12: Magen	13: Brustdrüse	14: Prostata	15: Ovar	16: Testis	17: Uterus	18: Skelettmusk.	19: Pankreas	20: Haut	21: Plazenta	22: Melanozyten	A498	SK-BR3	HT29	T47D	HL-60	K562	MDA-MB-468	MDA-MB-435	Colo205	Gen	
ACSL4																																	ACSL4
ANXA1																																	ANXA1
BMI1																																	BMI1
BNIP3L																																	BNIP3L
C8orf4																																	C8orf4
CALU																																	CALU
CNIH																																	CNIH
CTNNB1																																	CTNNB1
CYR61																																	CYR61
DAD1																																	DAD1
FLT3																																	FLT3
GADD45																																	GADD45
GPM6A																																	GPM6A
HEG1																																	HEG1
HIGD1A																																	HIGD1A
HMGB1																																	HMGB1
HMGN3																																	HMGN3
LUM																																	LUM
MBD2																																	MBD2
MPHOSP H6																																	MPHOSP H6
NAP1L1																																	NAP1L1
NDUFB5																																	NDUFB5
PAICS																																	PAICS
PGRMC1																																	PGRMC1
PLSCR1																																	PLSCR1
PMP22																																	PMP22
PMS1																																	PMS1
PPAP2B																																	PPAP2B
PRDX3																																	PRDX3
PRNP																																	PRNP
PRRC1																																	PRRC1
PSAT																																	PSAT
PTPN13																																	PTPN13
RGS5																																	RGS5
RPL23a																																	RPL23a
SCAMPI																																	SCAMPI
SCYE1																																	SCYE1
SFRP2																																	SFRP2
SGK1																																	SGK1
SLC38A2																																	SLC38A2
SLC39A6																																	SLC39A6
SNAP25																																	SNAP25
SPP1																																	SPP1
SPRED2																																	SPRED2
STEAP1																																	STEAP1
TGFBR2																																	TGFBR2
UBE2B																																	UBE2B
UBE2D1																																	UBE2D1
UBE2V1																																	UBE2V1
UBQLN1																																	UBQLN1
ZDHC17																																	ZDHC17
Gen	1: Gehirn	2: Leber	3: Herz	4: Niere	5: Lunge	6: Trachee	7: Dickdarm	8: Knochenm.	9: Dünndarm	10: Thymus	11: Milz	12: Magen	13: Brustdrüse	14: Prostata	15: Ovar	16: Testis	17: Uterus	18: Skelettmusk.	19: Pankreas	20: Haut	21: Plazenta	22: Melanozyten	A498	SK-BR3	HT29	T47D	HL-60	K562	MDA-MB-468	MDA-MB-435	Colo205	Gen	



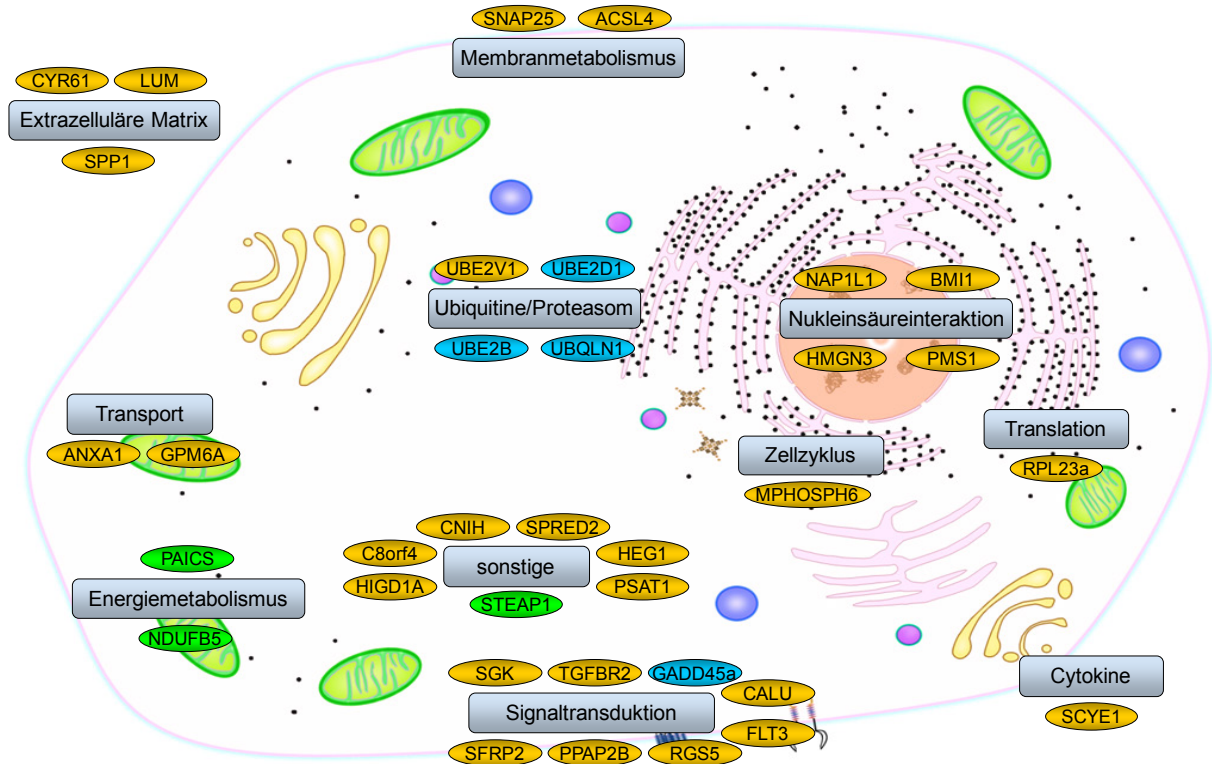
Bei ca. 70 % der Gene konnte in mindestens der Hälfte der Normalgewebe und der Tumorzelllinien eine Expression nachgewiesen werden. Jedoch unterschieden sich hier die Muster zwischen denjenigen Genen, von denen einige eine starke Expression in wenigen Normalgeweben und Tumorzelllinien (*ACSL4*, *SPP1*) und andere eine ubiquitäre Expression zeigten (*BNIP3L*, *DADI*, *SCYE1*). Bei sechs Genen lag eine insgesamt sehr schwache Expression in nur wenigen Geweben und Tumorzellen vor (*FLT3*, *PMP22*, *PTPN13*, *SCAMP1*, *UBE2D1*, *UBE2VI*). Keines der Gene war nur in Tumorzellen exprimiert, jedoch zeigten insgesamt sechs Gene in diesen eine hohe Expression (*CTNNB1*, *HMGB1*, *NAP1L1*, *PGRMC1*, *RPL23a*, *UBE2B*). Demgegenüber standen sechs Gene, für die keine Expression in Tumorzelllinien allerdings in Normalgewebe detektierbar war (*C8orf4*, *GPM6A*, *LUM*, *PPAP2B*, *RGS5*, *SFRP2*). Ein Gen war gewebespezifisch nur im Gehirn stark exprimiert (*SNAP25*).

### ***3.2.1 Finale Genliste und weiterer experimenteller Ablauf***

Die semi-quantitative Expressionanalyse der nach der ersten Runde selektierten Gene schloss die zweite Selektionsrunde ab. Aus den Gengruppen, die ähnliche Expressionsmuster aufwiesen, wurden Gene für eine weitere Bearbeitung so gewählt, dass die initiale Verteilung auf die Funktionen und die Lokalisierungen ähnlich blieb. Gene, die in zwei Hefe-„Screenings“ identifiziert wurden, und deren Proteine als tumorassoziierte Antigene beschrieben waren beziehungsweise Autoantikörperantworten induziert hatten, wurden bevorzugt in die finale Liste eingeschlossen.

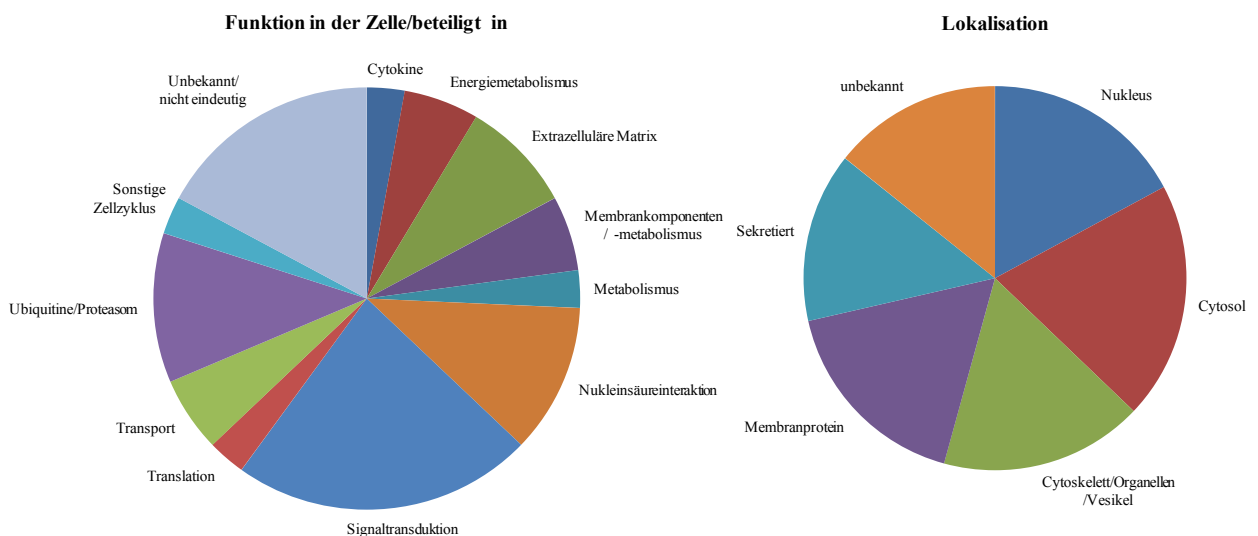
Es verblieben 35 Kandidaten, die auf ihre Relevanz für Diagnostik und Prognostik und in der Karzinogenese des PDAC evaluiert werden sollten, für die weiteren experimentellen Analysen (siehe Abb. 3.2.2).

Die 35 final selektierten Gene bildeten die initiale Verteilung von Funktion und Lokalisation der Genprodukte sehr gut ab, was den offenen unbeeinflussten Selektionsprozess unterstützt, durch den jedoch zusätzliche Daten für die Fragestellung, wie Relevanz im Tumor und der Apoptose, Antikörperantworten und Expressionmuster, gewonnen werden konnten (siehe Abb. 3.2.3; Vergleich siehe Abb. 3.1.2 und 3.1.3).



**Abb. 3.2.2: Übersicht der 35 selektierten finalen Gene nach Funktion und Lokalisation der codierten Produkte in der Zelle.** Gelb unterlegte Gene wurden in der Melanom-, blau unterlegte in der Pankreaskarzinom-cDNA-Bank und grün unterlegte in beiden cDNA-Banken im anti-apoptotischen „Screening“ identifiziert.

Die im Hefe-„Screening“ positiv identifizierten cDNA-Klone wurden auf die darin enthaltenen Sequenzen überprüft, indem vom Vektor aus beide Enden der inserierten cDNA ansequenziert wurden und die Daten gegen Nukleotiddatenbanken analysiert wurden. Dadurch wurde das jeweilige Gen identifiziert. Jedoch war es bei einigen Sequenzen durch zu geringe Leseweiten nicht möglich, zwischen Spleißvarianten eines Gens zu unterscheiden. Entsprechend wurden alle Varianten eines Gens in den Klonierungsplan aufgenommen (siehe Tab. 3.2.2).



**Abb. 3.2.3: Verteilung der Genprodukte der selektierten finalen Liste auf die jeweiligen Funktionen und Lokalisierungen in der Zelle**

**Tab. 3.2.2: Final selektierte Gene mit offizieller Bezeichnung, Länge der kodierenden Sequenz und dazu korrespondierendem Molekulargewicht des Proteins beziehungsweise des exprimierten GST-Fusionsproteins und NCBI- und UniProt-Kennung.**

Gen-bezeichnung	Bezeichnung	Länge der kodierenden Sequenz	Proteinmolekulargewicht/ als GST-Fusionsprotein	NCBI- „Accession“- Nummer	UniProt- Kennung
<i>ACSL4v2</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	2130 bp	74,5 kDa / ca. 100 kDa	NM_022977	O60488
<i>ANXA1</i>	Annexin 1	1040 bp	38,7 kDa / ca. 64,2 kDa	NM_000700	P04083
<i>BMI1</i>	Polycomb ring finger oncogene	980 bp	37,0 kDa / ca. 62,5 kDa	NM_005180	P35226
<i>CALUv1</i>	Calumenin	950 bp	37,2 kDa / ca. 62,7 kDa	NM_001219	O43852
<i>CNIH</i>	cornichon homolog	440 bp	16,7 kDa / ca. 42,2 kDa	NM_005776	O95406
<i>CYR61</i>	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	1150 bp	42,1 kDa / ca. 67,6 kDa	NM_001554	O00622
<i>C8orf4</i>	thyroid cancer protein 1	280 bp	12,4 kDa / ca. 37,9 kDa	NM_020130	Q9NR00
<i>FLT3</i>	fms-related tyrosine kinase 3	2980 bp	112,9 kDa / ca. 138,5 kDa	NM_004119	P36888
<i>GADD45a</i>	growth arrest and DNA-damage-inducible $\alpha$	490 bp	18,4 kDa / ca. 43,9 kDa	NM_001924	P24522
<i>GPM6A</i>	Glycoprotein M6A	840 bp	31,3 kDa / ca. 56,8 kDa	NM_005277	P51674
<i>HEG1</i>	heart development protein with EGF-like domains 1	4140 bp	147,5 kDa / ca. 173 kDa	NM_020733	Q9ULI3
<i>HIGD1Av1</i>	hypoxia inducible domain family, member 1A	330 bp	10,2 kDa / ca. 35,7 kDa	NM_001099668	Q9Y241
<i>HIGD1Av2</i>	Siehe oben	280 bp	11,8 kDa / ca. 37,3 kDa	NM_001099669	Q9Y241
<i>HMGN3v1</i>	high mobility group nucleosomal binding domain 3	300 bp	10,7 kDa / ca. 36,2 kDa	NM_004242	Q15651
<i>LUM</i>	Lumican	1020 bp	38,5 kDa / ca. 64,0 kDa	NM_002345	P51884
<i>MPHOSPH6</i>	M-Phasephosphoprotein 6	480 bp	19,1 kDa / ca. 44,6 kDa	NM_005792	Q99547
<i>NAPIL1</i>	nucleosome assembly protein 1-like 1	1170 bp	45,4 kDa / ca. 70,9 kDa	NM_139207	P55209
<i>NDUFB5</i>	NADH-Dehydrogenase (Ubiquinon) 1 $\beta$ Untereinheit 5	570 bp	21,8 kDa / ca. 47,3 kDa	NM_002492	O43674
<i>PAICSv1</i>	Phosphoribosylamino-imidazolcarboxylase, Phosphoribosylamino-imidazolsuccinocarboxamidsynthase	1300 bp	47,2 kDa / ca. 72,7 kDa	NM_001079525	P22234
<i>PAICSv2</i>	Siehe oben	1270 bp	47,1 kDa / ca. 72,1 kDa	NM_001079524	P22234
<i>PMS1</i>	postmeiotic segregation increased 1	2800 bp	105,8 kDa / ca. 131 kDa	NM_000534	P54277
<i>PPAP2B</i>	phosphatidic acid phosphatase type 2B	940 bp	35,1 kDa / ca. 60,6 kDa	NM_003713	O14495
<i>PSAT1v1</i>	Phosphoserin-aminotransferase 1	1110 bp	40,5 kDa / ca. 66,0 kDa	NM_058179	Q9Y617
<i>PSAT1v2</i>	Siehe oben	980 bp	35,2 kDa / ca. 60,7 kDa	NM_021154	Q9Y617
<i>RGS5</i>	Regulator der G-Protein Signale 5	540 bp	21,0 kDa / ca. 46,5 kDa	NM_003617	O15539
<i>RPL23a</i>	Ribosomales Protein L23a	470 bp	17,8 kDa / ca. 43,3 kDa	NM_000984	P62750
<i>SCYE1v1</i>	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1	940 bp	34,4 kDa / ca. 59,9 kDa	NM_004757	Q12904
<i>SCYE1v3</i>	Siehe oben	1010 bp	62,0 kDa / ca. 87,5 kDa	NM_001142416	Q12904
<i>SFRP2</i>	secreted frizzled-related protein 2	880 bp	33,5 kDa / ca. 59,0 kDa	NM_003013	Q96HF1
<i>SGK1v1</i>	Serum/Glukokortikoid regulierte Kinase 1	1290 bp	49,0 kDa / ca. 74,5 kDa	NM_005627	O00141
<i>SGK1v2</i>	Siehe oben	1580 bp	59,9 kDa / ca. 85,4 kDa	NM_001143676	O00141
<i>SGK1v3</i>	Siehe oben	1380 bp	50,6 kDa / ca. 76,1 kDa	NM_001143677	O00141
<i>SGK1v4</i>	Siehe oben	1340 bp	47,9 kDa / ca. 73,4 kDa	NM_001143678	O00141
<i>SNAP25v2</i>	synaptosomal-associated protein, 25kDa	620 bp	23,4 kDa / ca. 48,9 kDa	NM_130811	P60880
<i>SPP1v1</i>	Sekretiertes Phosphoprotein 1 (Osteopontin)	950 bp	35,5 kDa / ca. 61,0 kDa	NM_001040058	P10451
<i>SPP1v2</i>	Siehe oben	900 bp	33,9 kDa / ca. 59,4 kDa	NM_000582	P10451
<i>SPRED2v1</i>	sprouty-related, EVH1 domain containing 2	1250 bp	50,5 kDa / ca. 76,0 kDa	NM_181784	Q7Z698
<i>SPRED2v2</i>	Siehe oben	1250 bp	50,4 kDa / ca. 75,9 kDa	NM_001128210	Q7Z698
<i>STEAP1</i>	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	1020 bp	39,9 kDa / ca. 65,4 kDa	NM_012449	Q9UHE8
<i>TGFBR2v2</i>	Transforming growth factor $\beta$ -Rezeptor II	1700 bp	64,6 kDa / ca. 90,1 kDa	NM_003242	P37173
<i>UBE2B</i>	Ubiquitin konjugierendes Enzym E2B	450 bp	17,4 kDa / ca. 42,9 kDa	NM_003337	P63146
<i>UBE2D1</i>	Ubiquitin konjugierendes Enzym E2D 1	440 bp	16,7 kDa / ca. 42,2 kDa	NM_003338	P51668
<i>UBE2V1v4</i>	Ubiquitin konjugierendes Enzym E2 Variante 1	440 bp	16,5 kDa / ca. 42,0 kDa	NM_001032288	Q13404
<i>UBQLN1</i>	Ubiquilin 1	1700 bp	62,6 kDa / ca. 88,1 kDa	NM_013438	Q9UMX0

### **3.3 Klonierung und prokaryotische Expression der selektierten Gene**

Für die im weiteren Verlauf der Arbeit geplante Multiplex-Serologie zum Nachweis spezifischer Antikörper in Patientenseren gegen die Proteine, für die die selektierten Gene codieren, wurde ein etabliertes Expressionsplasmid, das auf einem modifizierten pGEX4T3-Vektor für eine prokaryotische Expression in *E. coli* eines GST-Fusionsproteins basiert, zurückgegriffen. Zusätzlich befindet sich 3‘ hinter der Klonierungsstelle eine Sequenz für eine elf Aminosäure lange Erkennungssequenz am C-Terminus jedes Fusionsproteins. Diese dient der Qualitätskontrolle nach der Expression und in der Multiplexmessung mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Die Glutathiontransferase ist essentiell für die Bindung des Proteins in den verwendeten Messsystemen, da die feste Phase mit Glutathioncasein modifiziert war, um eine spezifische Bindung der Fusionsproteine und eine vorteilhafte *in situ*-Aufreinigung zu ermöglichen.

#### ***3.3.1 Klonierung in den Expressionsvektor pGEX4T3tag***

Von den 44 Genen, die für die Amplifizierung bestimmt waren, konnten 35 in die Expressionsvektoren kloniert werden. Fünf Gene (*FLT3*, *HEG1*, *PMS1* und *SPRED2* in beiden Varianten) ließen sich als Stammgen nicht amplifizieren und fehlten dementsprechend vollständig. Weiterhin war es nicht möglich, Amplifikate von *PSATv2* sowie *SGK1v2*, *-v3* und *-v4* in ausreichenden Mengen zu gewinnen. Jedoch lag hier eine weitere Variante zur Expression vor.

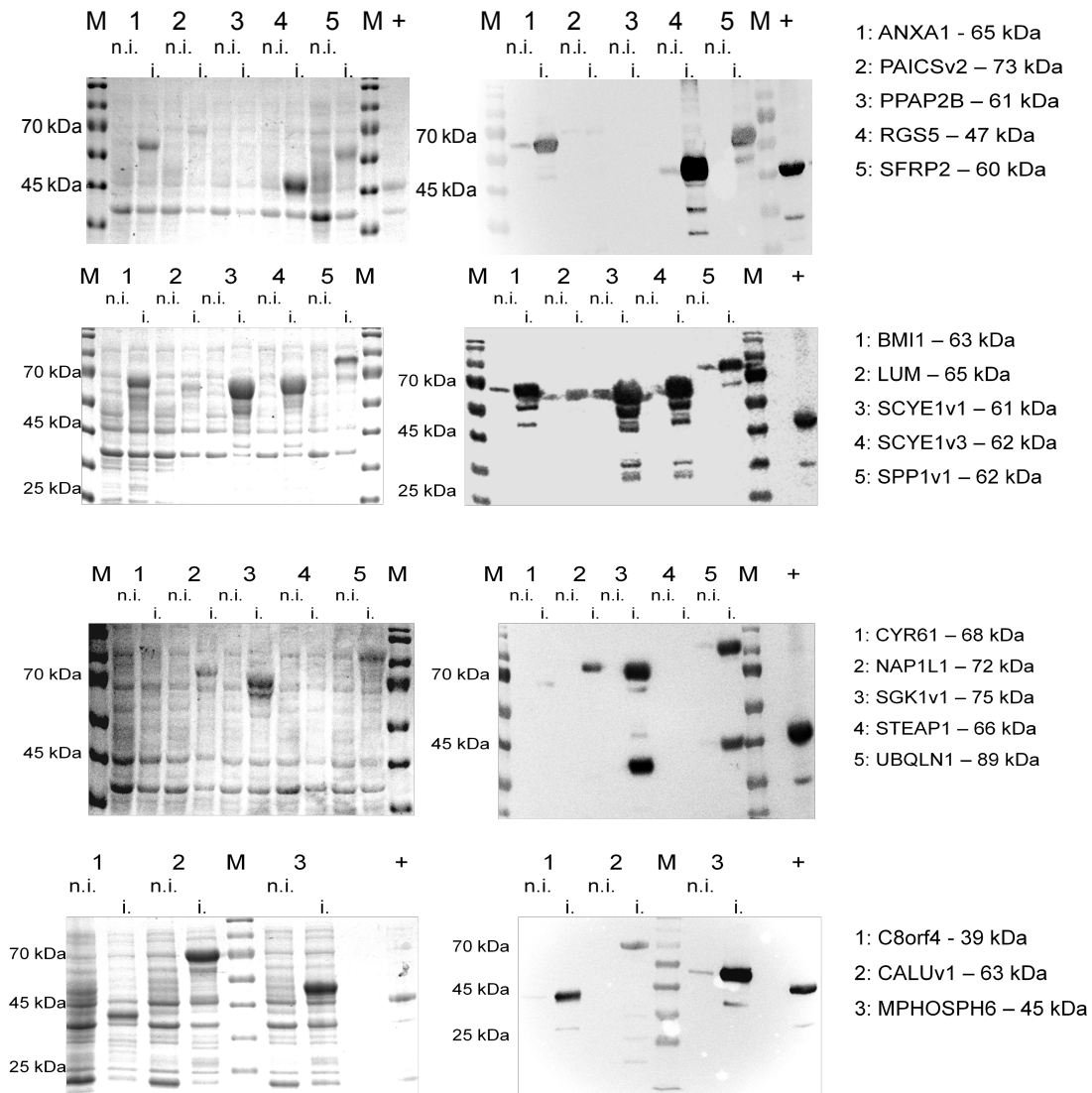
Da die Sequenzen von *ACSL4v2*, *HMG3v1*, *MPHOSPH6* und *TGFBR2v2* an einzelnen Basen der klonierten Gene von den Originalsequenzen in der NCBI-Nukleotiddatenbank abwichen und diese nicht als Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphism“ - SNP) hinterlegt waren, wurden die Originalsequenz durch positionsgerichtete Mutagenese wiederhergestellt. Die Klone mit der abweichenden Sequenz wurden jedoch gelagert, falls die Mutation im Rahmen von Sequenzierungsprojekten als relevante Abweichung identifiziert werden sollte. Weiterhin wurden die Plasmide zur Expression von *PAICSv1* beziehungsweise *SPP1v2* durch Mutagenese der Plasmide für *PAICSv2* beziehungsweise *SPP1v1* hergestellt, da sich die Isoformen nur in wenigen Aminosäuren unterschieden.

#### ***3.3.2 Heterologe Expression der Proteine in E. coli Rosetta-Zellen und Gewinnung des Bakterienlysats***

Die Expression von humanen Proteinen in Prokaryoten, im Speziellen *E. coli* als primärem Expressionswirt, erfordert durch Unterschiede in der Codonnutzung und fehlenden Modifizierungs- und Faltungshelfermechanismen optimierte Systeme und Bedingungen. Daher wurde von vornherein

## ERGEBNISSE: KLONIERUNG UND EXPRESSION VON FUSIONSPROTEINEN

der spezielle *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS mit einem angepassten Translationssystem eingesetzt. In den Expressionsvektor erfolgreich klonierte Gene wurden zuerst in kleinem Maßstab bei 37 °C über 3 h exprimiert und mittels Hitze aufgeschlossene Bakterienvolllysate auf den Gehalt des Fusionsproteins überprüft. Dies geschah durch Trennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteinfärbung durch Coomassie Brilliant-Blau sowie Detektion des Proteins über die C-terminale Erkennungssequenz im Immunblot (siehe Abb. 3.3.1).



**Abb. 3.3.1: Detektion von prokaryotisch exprimierten GST-Fusionsproteinen mit (i.) und ohne Induzierung (n.i.) der Expression in Coomassie Brilliant-Blau gefärbten SDS-Gelen (links) und als Vollängenprotein per Immunblot (rechts) nach elektrophoretischer Auftrennung.** Bakterielle Lysate (je 4 µL Auftrag) wurden in 12 %-igen Polyacrylamidgelen gelelektrophoretisch getrennt und entweder in einer Coomassie Brilliant-Blaulösung 2 h gefärbt oder im „Semi Dry“-Verfahren auf die Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-Tag-Antikörper (1:7500 verdünnt) als Primärantikörper und einem anti-Maus-Antikörper (1:10000 verdünnt) als Sekundärantikörper mittels einer Peroxidase-reaktion und einer Lumineszenzmessung über ein Kamerasystem. (M: Molekulargewichtsmarker; +: Positivkontrolle)

Die Induktion der Proteinexpression mit IPTG führte in den meisten Fällen zu einer guten bis sehr guten Ausbeute an GST-Fusionsprotein, wie die Immunblots verdeutlichten. Anhand der präsenten Banden in den Coomassie gefärbten Gelen waren die Fusionsproteine im Vergleich zum übrigen Bakterienproteom zum Teil deutlich überexprimiert und korrelierten mit den Signalstärken der Immunblotdetektion. Der Ansatz im kleinen Maßstab verdeutlichte, dass eine Expression bei 37 °C für die meisten Proteine optimal war und gute Ausbeuten erbrachte.

Proteine, die strukturelle Bereiche für einen Membraneinbau besaßen, und komplexere Multidomänenproteine ließen sich anhand der Ergebnisse der Immunblotdetektion nicht oder nur unzureichend exprimieren. Hierzu gehörten GPM6A, PPAP2B und STEAP beziehungsweise CALUv1, CYR61, LUM, NAP1L1 und PAICS in beiden Varianten. Dies ist ein häufiges Problem bei der Expression in *E. coli*, da die Bakterien eine abweichende Translationsaktivität zu eukaryotischen Zellen besitzen und wichtige Faltungs- und Transportmechanismen für diese Proteinklassen fehlen (Endo & Sawasaki, 2006). Durch Senkung der Kultivierungstemperatur, was zu einer Verlangsamung zellulärer Prozesse führt, und Zugabe von chaperoninduzierenden Substanzen wie z.B. Ethanol können die Proteinausbeuten in einigen Fällen verbessert werden (Kirkpatrick *et al.*, 2003).

Die Verringerung der Kultivierungstemperatur verbesserte die Expressionsqualität einiger Proteine wie z.B. CYR61, während dies keinen Effekt bei anderen Proteinen wie z.B. LUM zeigte. Entsprechend der Ergebnisse wurden die Bedingungen für die Expression im großen Maßstab gewählt (siehe Tab. 3.3.1). Die integralen Membranproteine GPM6A, PPAP2B und STEAP1 konnten trotz Optimierungsschritten nicht als lösliche Proteine exprimiert werden. Sie wurden daher nicht in der Serologie analysiert.

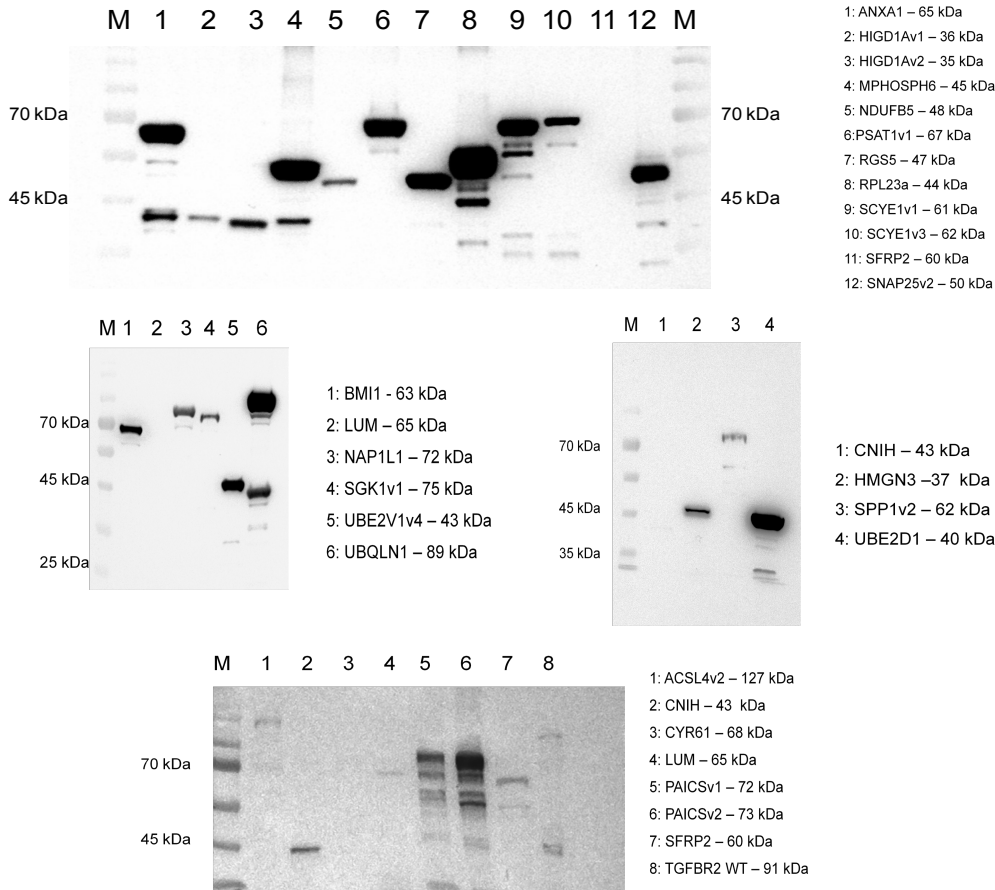
Die ermittelten Expressionsbedingungen wurden auf den Großansatz mit 800 mL Kulturvolumen übertragen, der genügend Material für den Zellaufschluss und mehrere Serologieanalysen sicherstellte.

Die Detektion des Volllängenproteins im Immunblot wurde ebenfalls zur Qualitätskontrolle durchgeführt (siehe Abb. 3.3.2). Dabei zeigte sich, dass insbesondere bei Proteinen mit einem hohen Gehalt an GST-Fusionsprotein niedermolekulare Banden detektierbar waren (wie z.B. RPL23 - Spur 8, SCYE1v1 - Spur 9). Hierbei handelte es vermutlich um Artefakte, die auf einen proteolytischen Abbau der Proteine in der wegen der hohen Expressionsrate oder auf Degradierung während des Zellaufschlusses schließen lassen. Proteinfragmente ohne oder nur mit partieller Glutathiontransferase im N-Terminus würden jedoch durch die *in-situ* Aufreinigung des ELISA- und Multiplex-Protokolls entfernt. Proteine, die sich bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 10 µg nicht detektieren ließen, wurden mit einem Auftrag von 25 µg wiederholt.

Ebenso wurde die Konzentration an Gesamtprotein im Bakterienlysat mit der Bradford-Methode bestimmt (siehe Tab. 3.3.1). Hierbei handelte es sich nicht um die spezifische Konzentration an GST-Fusionsprotein im Lysat und sollte als Näherung für die notwendige Einsatzmenge im ELISA und der Serologie dienen. Da die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins bei der Detektionsgenauigkeit der Bradford-Methode eine Rolle spielt, ist dies ein zusätzlicher Fehlerfaktor für ungenaue Proteinbestimmungen.

## ERGEBNISSE: KLONIERUNG UND EXPRESSION VON FUSIONSPROTEINEN

Zu erkennen war die mögliche Variabilität der gemessenen Proteingesamtkonzentration beim Vergleich mit dem Immunblot, bei dem mit 10 µg pro Spur identische Proteinmengen aufgetragen wurden (siehe Abb. 3.3.2). Die Bandenstärke variierte jedoch zum Teil stark und zeigte den unterschiedlichen Anteil des GST-Fusionsproteins im Bakterienlysat.



**Abb. 3.3.2: Immunblots von bakteriellen Lysaten nach elektrophoretischer Auftrennung zur Detektion von prokaryotisch exprimierten GST-Fusionsproteinen für serologische Messungen.** Bakterielle Lysate (10 µg pro Spur, 25 µg pro Spur im untersten Gel) wurden in 12 %-igen Polyacrylamidgelen gelelektrophoretisch getrennt und im „Semi Dry“-Verfahren auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit einem anti-Tag-Antikörper (1:7500 verdünnt) als Primärantikörper und einem anti-Maus-Antikörper (1:10000 verdünnt) als Sekundärantikörper mittels einer Peroxidase-reaktion und einer Lumineszenzmessung über ein Kamerasystem. (M: Molekulargewichtsmarker)

Sowohl im ELISA als auch in der Multiplex-Serologie wird eine Konzentration des Bakterienlysats von 1 mg/mL eingesetzt, um mit dem GST-Fusionsprotein im Sättigungsbereich der Kopplungsphase zu liegen. Da die Bakterienlysate nach der Proteinbestimmung mit wasserfreiem Glycerin im Verhältnis 1:1 versetzt wurden, betrug die minimale Lysatkonzentration 2 mg/mL. Alle Lysate lagen über dieser Konzentrationsgrenze, wobei diejenigen von CYR61, LUM und SFRP2 mit 3,5 bis 4,0 mg/mL am geringsten konzentriert waren.

**Tab. 3.3.1: Expressionsbedingungen der GST-Fusionsproteine im prokaryotischen System und erhaltene Gesamtproteinkonzentration des Lysates.** Die angegebenen Lysatkonzentrationen bezogen sich auf das reine Lysat, das nach dem Aufschluss jedoch mit wasserfreiem Glycerin 1:1 für die Lagerung verdünnt wurde.

<b>Protein</b>	<b>Expressionsbedingungen in <i>E. coli</i></b>	<b>Lysat-Konz. [mg/mL]</b>
ACSL4v2	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	5,02
ANXA1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	13,3
BMI1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	4,64
CALUv1	Rosetta; 30 °C, 3-4 h Expression	47,5
CNIH	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	5,37
CYR61	Rosetta; 30 °C, 3-4 h Expression	3,6
C8orf4	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	8,35
GADD45a	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	8,68
HIGD1Av1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	12,6
HIGD1Av2	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	13,6
HMGN3v1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	6,06
LUM	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	3,93
MPHOSPH6	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	16,6
NAP1L1	Rosetta; 30 °C, 3-4 h Expression	5,6
NDUFB5	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	8,0
PAICSV1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	7,4
PAICSV2	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	8,93
PSAT1v1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	18,5
RGS5	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	17,5
RPL23a	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	24,6
SCYE1v1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	11,3
SCYE1v3	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	13,4
SFRP2	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	3,5
SGK1v1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	4,24
SNAP25v2	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	6,2
SPP1v1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	7,9
SPP1v2 & v3	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	5,67
TGFBR2v2		
Volllänge	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	7,5
N-Terminus	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	22,2
UBE2B	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	12,1
UBE2D1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	15,0
UBE2V1v4	Rosetta; 30 °C + 1 % EtOH, 3-4 h Expression	6,09
UBQLN1	Rosetta; 37 °C, 3-4 h Expression	16,5

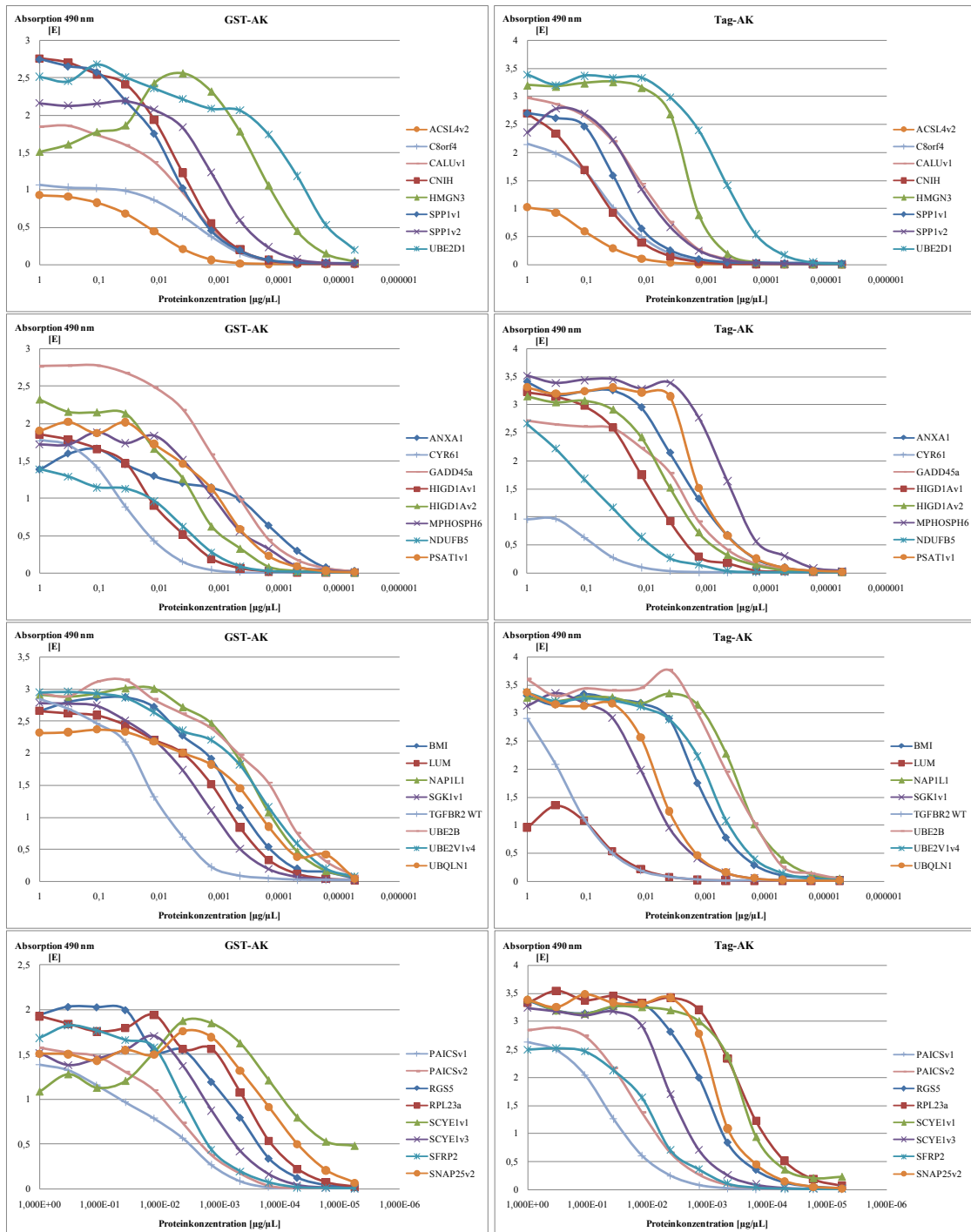
### 3.3.3 Validierung der exprimierten GST-Fusionsproteine im Titrations-ELISA

Der Immunblot erlaubte eine qualitative und bedingt quantitative Aussage zu den Fusionsproteinen, die jedoch auf Grund der Methode denaturiert waren. Die Proteinbestimmung nach Bradford lieferte quantitative Aussagen zum Gehalt an nativem Protein jedoch nur als Gesamtproteinkonzentration. Daher war der Titrations-ELISA die notwendige Methode, um die Qualität und die verhältnismäßige Quantität der nativen GST-Fusionsproteine zu bestimmen und deren Menge anhand des Verlaufs der Titrationskurve einzuschätzen.

Im Titrations-ELISA erfolgte für jedes Protein die Detektion mit dem anti-GST- beziehungsweise anti-Tag-Antikörper (siehe Kapitel 2.3.7).



Ersterer bindet ein Epitop in der N-terminalen Glutathiontransferase und zeigt, ob native GST-Fusionsproteine im Lysat existieren, letzterer detektiert native Volllängenfusionsproteine. Die initiale Proteinkonzentration war identisch wie für serologische Analysen und lag bei 1 µg/µL. Es folgten elf weitere Verdünnungsstufen im Verhältnis 1:3 (siehe Abb. 3.3.3).



**Abb. 3.3.3: Titrations-ELISAs der bakteriellen Lysate zur Bestimmung der Quantität und der Qualität des enthaltenen GST-Fusionsproteins.** Für den Titrations-ELISA wurden die Proben initial auf eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt, 11x seriell 1:3 in Puffer verdünnt und auf Glutathion-Casein gekoppelte 96-Loch-Multititerplatten übertragen. Die Detektion erfolgte mit einem anti-GST- (links) beziehungsweise anti-Tag-Antikörper (rechts) (jeweils 1:5000 verdünnt) als Primärantikörper und einem anti-Ziege- beziehungsweise anti-Maus-Antikörper (jeweils 1:5000 verdünnt) als Sekundärantikörper mittels einer Peroxidase-reaktion und der Absorptionsmessung bei 490 nm.

Alle GST-Fusionsproteine ließen sich sowohl mit dem anti-GST- als auch dem anti-Tag-Antikörper bei einer Lysatkonzentration von 1 mg/mL mit Absorptionen von 1 und höher detektieren. Dies bedeutete, dass zum einen die Bindung von Glutathiontransferase an die feste Phase (hier der mit Glutathion behandelten Oberfläche der Mikrotiterplatte) erfolgte und zum anderen mindestens ein hoher Anteil der gebundenen Proteine die C-terminale Erkennungssequenz besaß. Die GST-Fusionsproteine konnten demnach für die serologischen Messungen eingesetzt werden.

Mit steigender Verdünnung nahm die Absorption unterschiedlich stark ab und erreichte in der 6. bis 9. Verdünnungsstufe einen Wert unter 0,1 (siehe Abb. 3.3.3).

### *3.3.3.1 Stabilität ausgewählter exprimierter GST-Fusionsproteine*

Die die GST-Fusionsproteine enthaltenden Bakterienlysate wurden zur Lagerung und Stabilisierung der Proteine 1:1 mit wasserfreiem Glycerin versetzt. Da die Lagerung bei -20 °C erfolgte, verhinderte dies das Einfrieren des Lysates und schädigende Einfrier-/Auftauzyklen zwischen den Messungen.

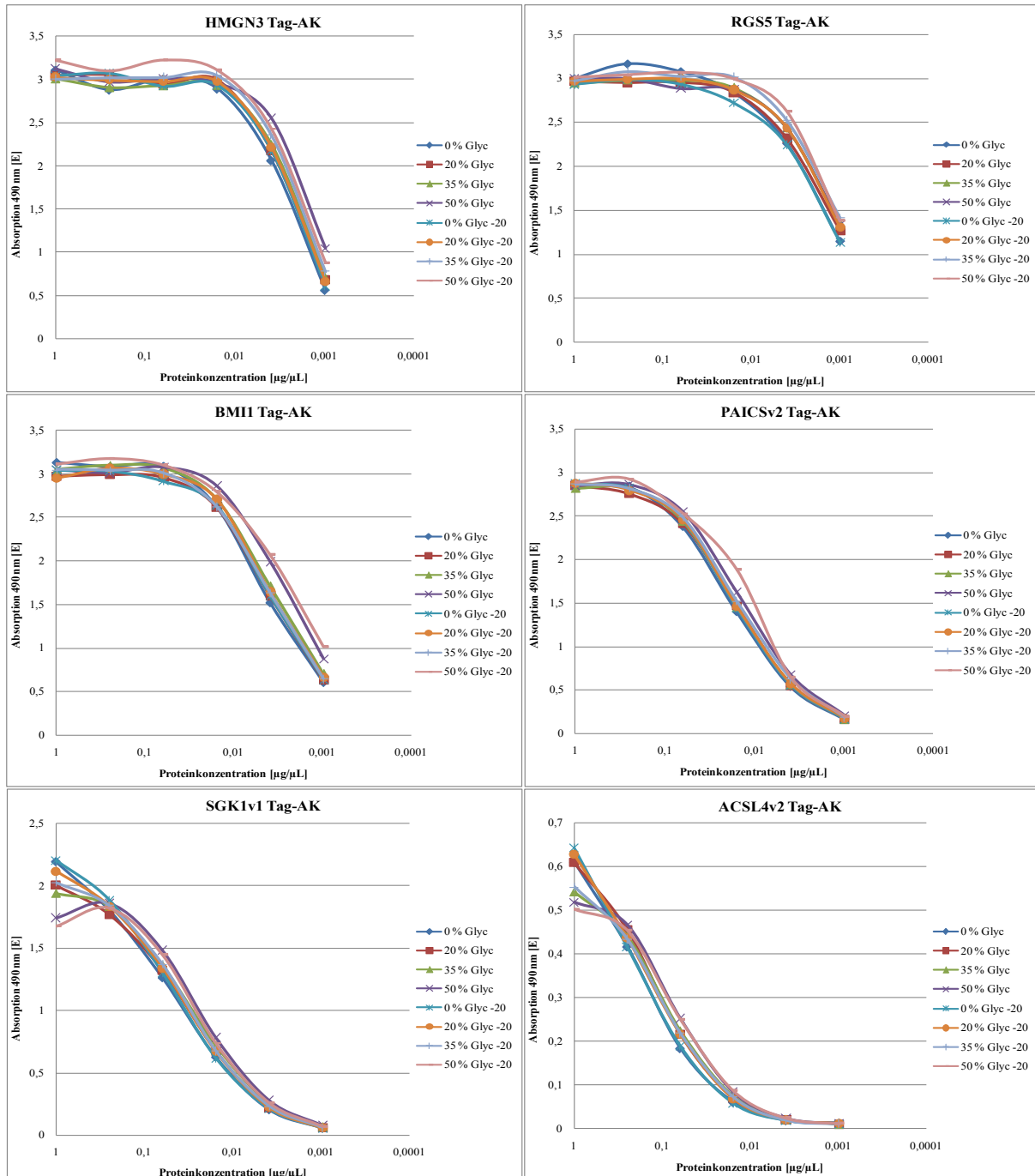
Jedoch kann die Stabilität von Proteinen auch von anderen Faktoren abhängen und andere Zusätze können notwendig sein (Sharma & Kalonia, 2003). Daher wurden exemplarisch sechs Proteine hinsichtlich ihrer Stabilität bei unterschiedlichen Glycerinkonzentration (0 %, 20 %, 35 %, 50 %) und unterschiedlichen Entnahmebedingungen (2-wöchige dauerhafte Lagerung bei -20 °C beziehungsweise Lagerung bei -20 °C und Entnahme jeden 2-3 Tag mit 4 stündiger Lagerung auf Eis) über den Verlauf der Titrationskurven im ELISA untersucht. Dies bedeutete, dass die glycerinfreien Proben zum Teil mehrfach aufgetaut und wieder eingefroren wurden. Die Verdünnungsstufen wurden auf fünf beschränkt, eine 1:3 Verdünnung je Verdünnungsschritt jedoch beibehalten. Die gewählten Proteine HMGN3 (37 kDa), RGS5 (47 kDa), BMI (63 kDa), PAICsv2 (73 kDa), SGK1v1 (75 kDa) und ACSL4v2 (101 kDa) bildeten den Bereich der Molekulargewichte der erhaltenen GST-Fusionsproteine vollständig ab und besaßen verschiedene Funktions- und Lokalisierungszuordnungen.

Zwischen den eingesetzten Glycerinkonzentrationen sowie den Lagerbedingungen konnte kein eindeutiger Unterschied bei den untersuchten Proteinen festgestellt werden (siehe Abb. 3.3.4). Die abgebildeten Diagramme zeigen die Ergebnisse mit dem anti-Tag-Antikörper, der die Volllängensproteine detektiert. Bei höheren Verdünnungen lag die Absorption der Bakterienlysate mit einer 50 %igen Glycerinkonzentration bei allen Proteinen leicht höher im Vergleich zu den anderen Konzentrationen. Bei den höhermolekularen Proteinen SGK1v1 und ACSL4v2 führten höhere Glycerinkonzentration zu einer geringfügig niedrigeren Absorption bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL. Mit steigender Verdünnung nivellierte sich dieser Effekt, was einen leichten Einfluss des Glycerins bei der Bindung dieser Proteine an die stationäre Phase vermuten lässt. Der Unterschied in den Absorptionswerten lag bei ca. 20 %.

Die Temperaturwechsel hatten keinen Effekt auf die Proteindetektion.

Für die exemplarisch untersuchten Proteine war die Glycerinkonzentration im beobachteten Zeitraum unbedeutend und die Stabilität gleichbleibend. Jedoch könnte über einen längeren Zeitraum dieser

Faktor eine Rolle spielen, weshalb eine 1:1 Verdünnung der Lysate mit Glycerin keine Nachteile bringt.

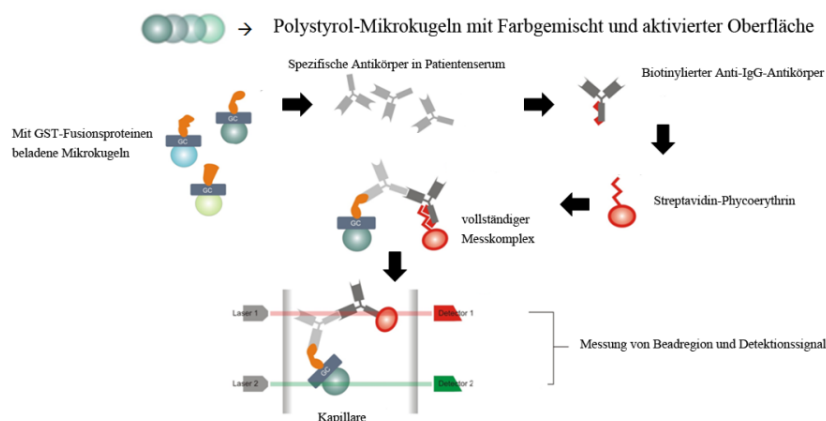


**Abb. 3.3.4:** Titrations-ELISAs der bakteriellen Lysate der Proteine HMGN3 (37 kDa), RGS5 (47 kDa), BMI1 (63 kDa), PAICSv2 (73 kDa), SGK1v1 (75 kDa) und ACSL4v2 (101 kDa) nach unterschiedlicher Lagerung und mit variablen Glycerinkonzentrationen zur Bestimmung der Stabilität des enthaltenen GST-Fusionsproteins. Mit dem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossene Bakterienlysate wurden im Doppelansatz mit wasserfreiem Glycerin in Endkonzentrationen von 20 %, 35 % und 50 % versetzt und zusammen mit unbehandelten Proben bei -20 °C über zwei Wochen gelagert. Eine Hälfte der Proben wurde dauerhaft gelagert, die andere in Abständen von zwei bis drei Tagen entnommen, 4 h auf Eis gelagert und anschließend wieder auf -20 °C gestellt. Die Detektion erfolgte mit einem anti-GST- beziehungsweise anti-Tag-Antikörper (jeweils 1:5000 verdünnt) als Primärantikörper und einem anti-Ziege- beziehungsweise anti-Maus-Antikörper (jeweils 1:5000 verdünnt) als Sekundärantikörper mittels einer Peroxidasereaktion und der Absorptionsmessung bei 490 nm.

### 3.4 Multiplex – Serologie zur Identifizierung immunogener Proteine bei Melanom- und Pankreaskarzinompatienten

Die Existenz von induzierten Antikörpern gegen körpereigene Proteine ist bekannt und deren Messung attraktiv, da das Ausgangsmaterial Serum einfach und patientenschonend gewonnen werden kann (Shiku *et al.*, 1976; Lu *et al.*, 2008). Autoantikörper werden im Hinblick auf ihre diagnostische und prognostische Relevanz für Tumorerkrankungen studiert, teilweise mit signifikanten Ergebnissen für Patientenseren teilweise jedoch sind die beobachteten Raten positiver Seren gegen bestimmte Antigene niedrig oder zu Kontrollen ähnlich (Gnjatic *et al.*, 2009; Nolen *et al.*, 2009; Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht).

Mittels des Multiplex-Verfahrens (siehe Kapitel 2.3.8 und Abb. 3.4.1) wurden Serenkollektive von Melanom- und Pankreaskarzinompatienten (siehe Kapitel 2.1.9.1), die auf Grund ihrer Dokumentation mit klinischen Daten zusammengestellt worden waren, auf die Existenz von Antikörpern gegen die 33 selektierten GST-Fusionsproteine untersucht. Die Messungen wurden an drei verschiedenen Messtagen durchgeführt, da die Messkapazität limitiert war.



**Abb. 3.4.1: Prinzip der Multiplex-Serologie auf Basis der Luminex xMAP-Technologie (modifiziert nach Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht).** Ausgehend von mit Antigenen beladenen farbkodierten Mikrokugeln werden Patientenseren auf spezifische Antikörper untersucht. An das Protein gebundene Antikörper werden mit einem biotinylierten Sekundäntikörper detektiert. Die Biotinylierung dient zur Bindung von Streptavidin-Phycoerythrin, das als Detektionssonde dient. Die Messung erfolgt im speziellen Durchflusszytometer bei 488 nm für das Phycoerythrin und 633 nm für die Diskriminierung der Kugelfarbe (GC: Glutathioncasein).

Die Multiplex-Serologie umfasste Kollektive von 368 Melanompatienten, die mit 86-99 Proben ähnlich verteilt auf die Stadien I-IV waren, 236 Pankreaskarzinompatienten aus zwei Quellen mit 145 (EPZ) beziehungsweise 91 Proben (CapRI), die nach dem Metastasierungsgrad in N0M0, N1M0 und N1M1 klassifiziert waren, und 50 Kontrollseren (siehe Kapitel 2.1.9.1). Die Altersspanne und der Median lagen in den EPZ- und CapRI-Proben des Pankreaskarzinomkollektivs ähnlich bei 31,8-84,3 Jahren (Median: 64,7) beziehungsweise 33,4-77,0 Jahre (Median: 63,8), jedoch über dem Median des Kontrollkollektivs (Spanne: 46-66 Jahre, Median: 54,5 Jahre) (Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht).

Ca. 14 % der Patienten der EPZ-Proben erhielten eine neoadjuvante Radiochemotherapie, die Patienten der CapRI-Proben waren unbehandelt.

Die Proben des EPZ wurden so gewählt, dass eine größtmögliche Anzahl an korrespondierenden RNA- und Gewebeproben für Vergleichsanalysen zur Verfügung stand (siehe Kapitel 2.1.9). Zu 41 der gewählten Seren wurde RNA und Gewebe für Schnittpräparate bereitgestellt, für 13 weitere Seren stand nur RNA und bei einem Serum nur Gewebe zur Verfügung.

Eine statistische Betrachtung der Ergebnisse erfolgte in dieser Arbeit nur für die Seren aus dem Pankreaskarzinomkollektiv, da dies parallel zu der Analyse der Genexpressionsdaten aus Punkt 3.5 geschah. Die statistische Analyse der Messdaten des Melanomkollektivs und eine Korrelation mit den Pateintendaten stehen noch aus. Jedoch werden die Messwerte der Melanomserologie nachfolgend beschrieben, um die absoluten Werte und Ergebnisse des Pankreaskarzinomkollektivs in Relation zu einer weiteren Tumorentität zu stellen.

#### ***3.4.1 Bestimmung der Schwellenwerte für jedes Protein anhand von Seren einer Kontrollgruppe***

Als Referenz zur Bestimmung einer positiven oder negativen Antikörperantwort gegen ein Protein in der Multiplex-Serologie diente ein Schwellenwert, der aus einem separaten Kontrollkollektiv von 40 Seren berechnet wurde (siehe Kapitel 2.3.8) (Waterboer *et al.*, 2005). Der Schwellenwert wurde für jeden Messtag der Multiplex-Serologie neu bestimmt, um mögliche Schwankungen zwischen den Messungen auszugleichen.

Für den Großteil der Proteine konnten für alle drei Messtage Schwellenwerte berechnet werden, die bei einer MFI von 50 bis 70 lagen und um maximal 20 % zwischen den Tagen von ihrem Mittelwert abweichen (siehe Tab. 3.4.1).

Ausgenommen hiervon waren die Schwellenwerte für MPHOSPH6, PAICSv2, RGS5, SCYE1v1 und v3 sowie UBE2D1, die größere Unterschiede von bis zu 60 % aufwiesen. Die Schwankung konzentrierte sich nicht auf einen Messtag, sondern betraf je nach Protein unterschiedliche Tage. Da andere Proteine des gleichen Messtages nicht betroffen waren, war ein systematischer Einfluss unwahrscheinlich.

Problematisch bei der Berechnung des Schwellenwertes, jedoch auch bei der vergleichenden Analyse zwischen Kontroll- und Patientenkollektiv, können gegen eine Vielzahl von Antigenen positive Seren sein (Nolen *et al.*, 2009). Diese besonders reaktiven Seren mit Antikörpern gegen mehr als 50 % der untersuchten Proteine lassen sich ohne erkennbaren Zusammenhang und Ursache in gesunden Spendern sowie Patienten nachweisen. Durchschnittlich wird eine Zahl von 1 - 5 % der Seren mit einer solchen Reaktion geschätzt. Jedoch zeigte keines der Spenderseren solch ein Verhalten.

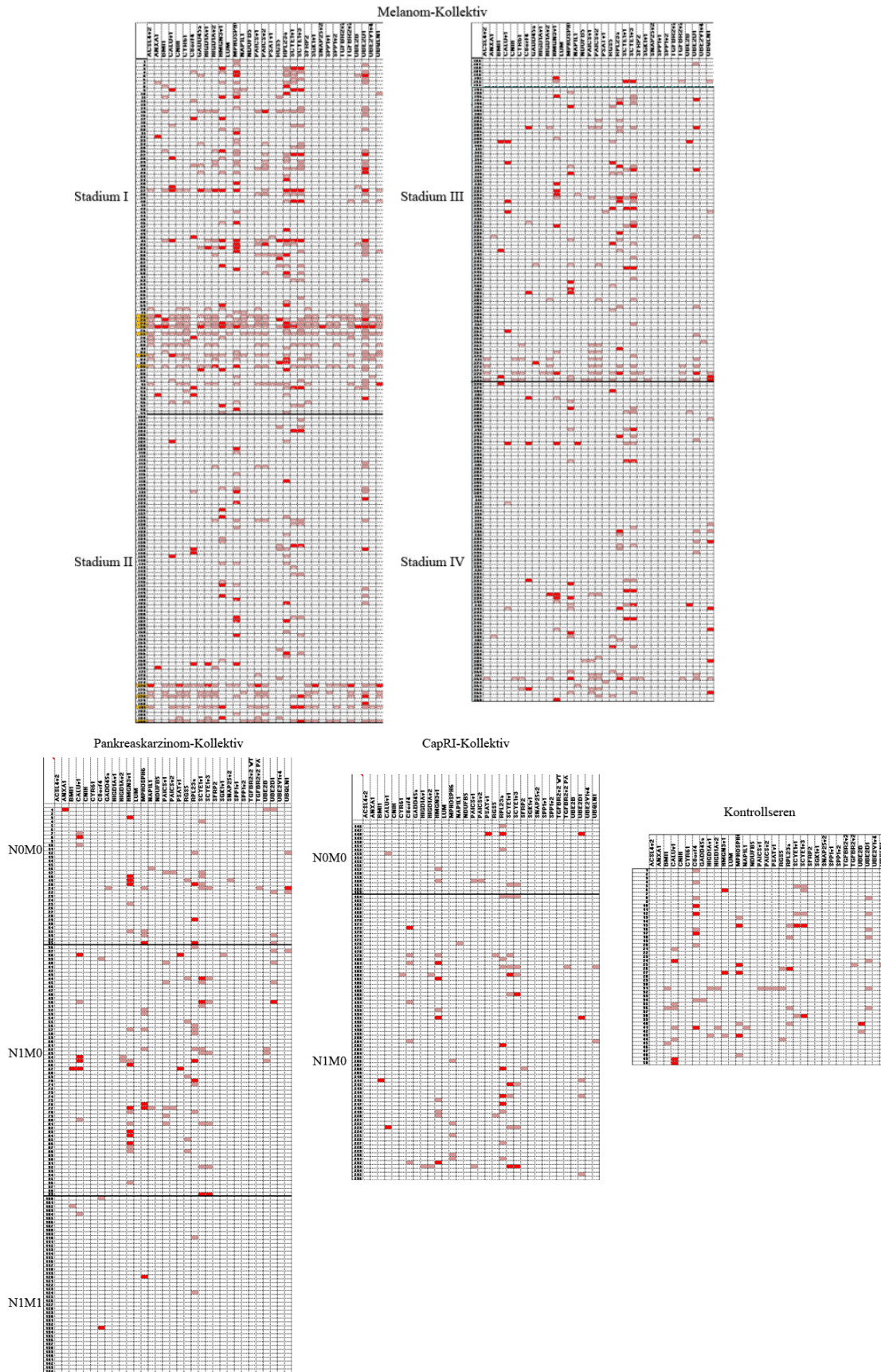
Tab. 3.4.1: Berechnete 1x Schwellenwerte für die Melanom- und Pankreaskarzinom-Multiplex-Serologie.

Protein	1x-Schwellenwert der Melanom-Multiplex-Serologie (Messtag 1 / Messtag 2)	1x-Schwellenwert der Pankreaskarzinom-Multiplex-Serologie	Mittelwert aller drei Messtage
ACSL4v2	56,26 / 50,00	59,05	55,10
ANXA1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
BMI1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
CALUv1	50,11 / 50,00	50,00	50,04
CNIH	50,00 / 50,00	50,00	50,00
CYR61	50,00 / 50,00	50,00	50,00
C8orf4	56,24 / 50,00	50,00	52,08
GADD45a	50,00 / 50,00	53,66	51,22
HIGD1Av1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
HIGD1Av2	68,05 / 50,00	75,73	64,59
HMG3v1	50,00 / 50,00	55,69	51,90
LUM	50,00 / 50,00	50,00	50,00
MPHOSPH6	62,21 / 50,00	140,56	84,26
NAP1L1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
NDUFB5	50,00 / 50,00	50,00	50,00
PAICSv1	69,11 / 52,67	62,92	61,57
PAICSv2	63,64 / 50,00	108,41	74,02
PSAT1v1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
RGS5	133,80 / 52,40	196,33	127,51
RPL23a	54,72 / 50,00	62,65	55,79
SCYE1v1	50,00 / 112,59	62,78	75,12
SCYE1v3	124,03 / 91,93	291,93	169,30
SFRP2	50,06 / 50,00	50,00	50,02
SGK1v1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
SNAP25v2	50,00 / 50,00	50,00	50,00
SPP1v1	50,00 / 50,00	50,00	50,00
SPP1v2 & v3	50,00 / 50,00	50,00	50,00
TGFBR2v2			
Volllänge	50,00 / 50,00	50,00	50,00
N-Terminus	50,00 / 50,00	50,80	50,27
UBE2B	50,00 / 50,00	50,00	50,00
UBE2D1	694,57 / 370,46	693,96	586,33
UBE2V1v4	50,00 / 50,00	50,00	50,00
UBQLN1	53,78 / 50,00	50,00	51,26

### 3.4.2 Verteilung der Antikörperantworten im PDAC-, Melanom- und Kontrollkollektiv

Die Multiplex-Serologie identifizierte antikörperpositive Seren in allen Kollektiven und zugehörigen Stadien für viele der untersuchten Proteine (siehe Abb 3.4.2). Positive Signale dominierten in den M0-Stadien des Pankreaskarzinom- und im Stadium I des Melanomkollektivs.

Die Analyse auf Seren, die positiv auf mehr als 50 % der untersuchten Proteine reagieren, identifizierte elf Seren (ca. 3 %) im Melanomkollektiv, davon sieben in Stadium I und vier in Stadium II, mit einem solchen Muster bei 1x Schwellenwert mit positiven Reaktionen gegen 50 - 90 % der Proteine. Diese Seren wurden aus der weiteren Analyse entfernt. Ähnlich reagierende Seren wurden im Pankreaskarzinom- und im Kontrollkollektiv nicht beobachtet.



**Abb. 3.4.2:** Übersicht der identifizierten Antikörperantworten gegen die 33 selektierten Proteine bei 1x (hellrot) und 3x Schwellenwert (rot) in allen Kollektiven. Das Melanomkollektiv ist in die Stadien I - IV (oben), das Pankreaskarzinomkollektiv (links unten) in die Metastasierungsgrade N0M0, N1M0 und N1M1 und das CapRI-Kollektiv (mittig unten) in N0M0 und N1M0 eingeteilt und gegen das Kontrollkollektiv dargestellt (rechts unten). Seren mit Antikörpern gegen mehr als 50 % der Proteine sind an der Probennummer gelb markiert.

### 3.4.2.1 Negative, einfach und mehrfach antikörperpositive Seren

Von den Seren des Pankreaskarzinomkollektivs waren 44 % bei 1x Schwellenwert beziehungsweise 17 % bei 3x Schwellenwert positiv gegen mindestens ein Antigen (siehe Tab. 3.4.2). In den jeweiligen Metastasierungsgraden der EPZ-Proben des Pankreaskarzinomkollektivs konnten antikörperpositive Seren hauptsächlich in den nicht fernmetastasierten (M0) Patienten beobachtet werden. Hier betrug die Anzahl positiver Seren ca. 55 - 60 % bei 1x beziehungsweise 20 - 25 % bei 3x Schwellenwert. Die Werte der CapRI-Proben lagen ca. 10 % unter den Werten der EPZ-Proben. Seren aus Patienten mit Fernmetastasen (M1) waren nur zu 15 % bei 1x beziehungsweise 4 % bei 3x Schwellenwert positiv. Jeweils ca. 20 -25 % der Seren waren bei 1x Schwellenwert positiv gegen eines oder mehrere Proteine, bei 3x Schwellenwert nur noch 13 % beziehungsweise 5 %. Bei der Analyse der mehrfach positiven Seren des Pankreaskarzinomkollektivs bei 1x Messgrenze stellte sich heraus, dass ca. 50 % von diesen Antikörper gegen zwei der Antigene und weitere ca. 33 % Antikörper gegen drei der Antigene enthielten (siehe Abb. 3.4.3). In einem Serum ließen sich Antikörper gegen sechs der Antigene detektieren.

**Tab. 3.4.2: Anzahl der Seren der gemessenen Kollektive bei 1x/3x Schwellenwert ohne Antikörper beziehungsweise mit Antikörpern gegen eines oder mehrere Proteine**

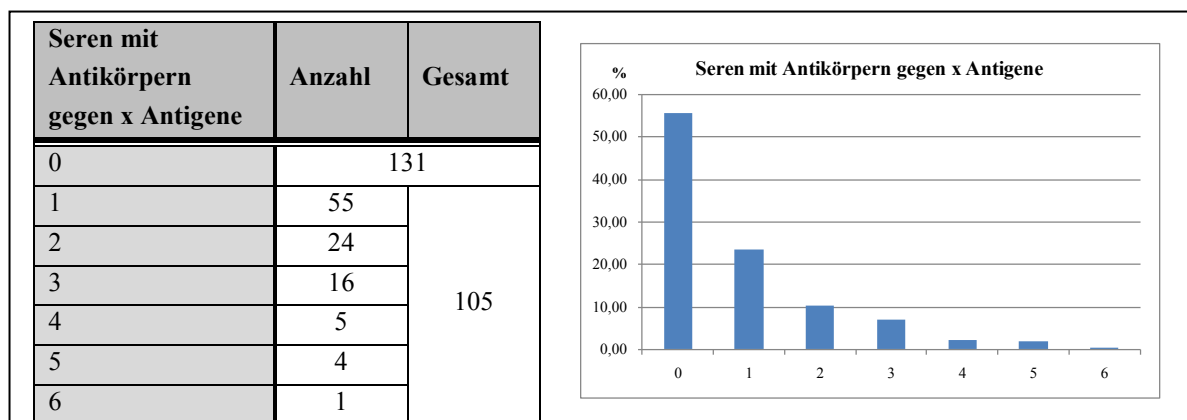
Kollektiv	Klassifikation/ Stadium	Negative Seren bei 1x/3x Schwellenwert (Anzahl/%)	Einfach positive Seren bei 1x/3x Schwellenwert (Anzahl/%)	Mehrfach positive Seren bei 1x/3x Schwellenwert (Anzahl/%)
Melanom	Stadium I	16(16%)/50(51%)	21(21%)/29(29%)	62(63%)/20(20%)
	Stadium II	31(36%)/57(66%)	27(31%)/21(24%)	28(33%)/8(9%)
	Stadium III	37(40%)/59(64%)	20(22%)/20(22%)	35(38%)/13(14%)
	Stadium IV	46(51%)/65(71%)	18(20%)/17(19%)	27(30%)/9(10%)
	Gesamt	130(35%)/231(63%)	86(23%)/87(24%)	152(41%)/50(14%)
Pankreas- karzinom	N0M0	16(46%)/26(74%)	8(23%)/7(20%)	11(31%)/2(6%)
	N1M0	25(39%)/50(78%)	21(33%)/8(13%)	18(28%)/6(9%)
	N1M1	39(85%)/44(96%)	7(15%)/2(4%)	0(0%)/0(0%)
	CapRI	51(56%)/75(82%)	19(21%)/13(14%)	21(23%)/3(3%)
	N0M0	11(61%)/17(94%)	4(24%)/0(0%)	3(17%)/1(6%)
	N1M0	40(55%)/58(79%)	15(21%)/13(18%)	18(25%)/2(3%)
	Gesamt	131(56%)/195(83%)	55(23%)/30(13%)	50(21%)/11(5%)
Kontrollen	Gesamt	17(34%)/35(70%)	13(26%)/13(26%)	20(40%)/2(4%)

Das Melanomkollektiv beinhaltete 65 % positiver Seren gegen mindestens ein Antigen bei 1x Schwellenwert beziehungsweise 37 % bei 3x Schwellenwert (siehe Tab. 3.4.2). In den Stadienkollektiven des Melanoms lag die Anzahl positiver Seren in früheren Stadien höher. Bei 1x Schwellenwert konnten 84 % in Stadium I jedoch nur noch 49 % in Stadium IV antikörperpositive Seren identifiziert werden, bei 3x Schwellenwert sanken die Werte von zunächst 49 % auf 29 %.

In den Kontrollen konnten mit 66 % bei 1x Schwellenwert beziehungsweise 30 % bei 3x Schwellenwert ähnlich viele positive Seren wie im Melanom-Kollektiv identifiziert werden, sodass tendenziell weniger Antikörperantworten bei Patienten mit PDAC zu finden waren.



Sowohl bei einem 1x als auch 3x Schwellenwert waren im Melanom- und Kontroll-Kollektiv ca. 20 - 30 % der Seren positiv gegen ein Protein. Antikörperantworten gegen multiple Proteine zeigten sich in 40 % der Seren bei 1x Schwellenwert, jedoch weniger als 15 % bei 3x Schwellenwert.



**Abb. 3.4.3: Aufschlüsselung der Verteilung der Seren des Pankreaskarzinomkollektivs nach Anzahl der Signale bei 1x Schwellenwert.** Absolute Zahlen (links) und prozentuale Verteilung (rechts) der Seren.

### 3.4.2.2 Antikörperantworten pro Patient

Wie bereits die Abbildung 3.4.2 und die Ergebnisse in Tabelle 3.4.2 verdeutlichten, war die Anzahl der identifizierten Antikörperantworten zwischen den Kollektiven unterschiedlich und im Pankreaskarzinomkollektiv tendenziell niedriger. Insgesamt konnten in dem Kollektiv 197 Antikörperantworten über dem 1x Schwellenwert gemessen werden, was 0,83 Antikörperantworten pro Patient entsprach (siehe Tab. 3.4.3). Beschränkt auf die Werte über dem 3x Schwellenwert sank die durchschnittliche Anzahl pro Patient auf 0,23. Die durchschnittliche Anzahl positiver Antikörperantworten pro Patient lag nur in den M0-Graden der EPZ-Proben bei knapp über 1 bei 1x Schwellenwert und war bei fernmetastasierten (M1) Patienten mit 0,15 besonders niedrig.

Im Melanomkollektiv wurden insgesamt 912 Messwerte über dem 1x beziehungsweise 226 über dem 3x Schwellenwert erhalten, sodass pro Patient durchschnittlich 2,48 beziehungsweise 0,61 Antikörperantworten vorlagen. Im Melanomkollektiv nahm die Gesamtzahl als auch die durchschnittliche Anzahl der Antikörperantworten pro Patient mit höherem Stadium von 4,68 auf 1,18 kontinuierlich ab.

Die korrespondierenden Werte im Kontrollkollektiv lagen bei insgesamt 68 positiven Werten entsprechend 1,36 pro Patient bei 1x beziehungsweise 18 positiven Werten entsprechend 0,36 pro Patient bei 3x Schwellenwert und damit höher als im Pankreaskarzinom-Kollektiv.

In allen Stadien der Kollektive war bei 3x Schwellenwert durchschnittlich weniger als eine positive Antikörperantwort pro Patient vorhanden.

**Tab. 3.4.3: Gesamtzahl und je Patient durchschnittliche Zahl der Antikörperantworten der jeweiligen Kollektive und ihrer Stadien/Klassifikationen.** Die Zahlen sind mit einem 1x und 3x Schwellenwert berechnet.

Kollektiv	Klassifikation/ Stadium	Proben- anzahl	Gesamtzahl der Antikörperantworten bei 1x/3x Schwellenwert	Durchschnittliche Anzahl der Antikörperantworten pro Patient bei 1x/3x Schwellenwert
Melanom	Stadium I	99	463/98	4,68/0,99
	Stadium II	86	187/42	2,17/0,49
	Stadium III	92	155/49	1,68/0,53
	Stadium IV	91	107/37	1,18/0,41
	Gesamt	368	912/226	2,48/0,61
Pankreas- karzinom	N0M0	35	39/11	1,11/0,31
	N1M0	64	75/21	1,17/0,33
	N1M1	46	7/2	0,15/0,04
	CapRI-Kollektiv N0M0	18	12/3	0,67/0,17
	N1M0	73	64/17	0,88/0,23
	Gesamt	236	197/54	0,83/0,23
Kontrollen	Gesamt	50	68/18	1,36/0,36

### ***3.4.3 Antikörperantworten gegen die selektierten Proteine im Pankreaskarzinom-, Melanom- und Kontrollkollektiv***

Wie bereits die Daten der Gesamtzahlen an positiven Antikörperantworten in den Kollektiven zeigten, war eine höhere Anzahl an Antikörperantworten gegen die einzelnen Antigene im Melanom- im Vergleich zum Pankreaskarzinomkollektiv zu erwarten. Dies bestätigte sich für die meisten Antigene (siehe Tab. 3.4.4).

Als Protein mit den meisten antikörperpositiven Seren im Pankreaskarzinomkollektiv konnte HMGN3v1 mit 29 bei 1x Schwellenwert beziehungsweise 13 bei 3x Schwellenwert identifiziert werden. Weitere Proteine mit mehr als neun positiven Seren, entsprechend ca. 4 % oder höher der Serenanzahl im Kollektiv, bei 1x Schwellenwert waren CALUv1 (12 positive Signale), C8orf4 (9), MPHOSPH6 (16), RPL23a (28), SCYE1v1 (24) & v3 (15) sowie UBE2D1 (13). Bei 1x Schwellenwert konnten keine Antikörper positiven Seren gegen ACSL4v2, CNIH, LUM, NDUFB5, SPP1v1 & v2, TGFBR2v2 und UBE2V1v4 detektiert werden. Bei 3x Schwellenwert wurden für 21 Proteine im Pankreaskarzinom keine positiven Seren identifiziert.

Mehr als 70 Seren des Melanomkollektivs, was ca. 20 % oder mehr der Serenanzahl im Kollektiv entsprach, waren bei 1x Schwellenwert gegen die vier Proteine MPHOSPH6, RPL23a, SCYE1v3 und UBE2D1 positiv. Die höchste Anzahl an positiven Seren bei 3x Schwellenwert war mit jeweils ca. 30 Seren für HMGN3v1, MPHOSPH6 und RPL23a zu beobachten. 11 weitere Proteine mit 4 % oder mehr an reaktiven Seren, entsprechend einer Anzahl von 15 oder höher, lagen in diesem Kollektiv vor. Keine antikörperpositiven Seren wurden bei 1x Schwellenwert für LUM und TGFBR2v2 als Volllängenprotein gemessen, bei 3x Schwellenwert kamen sechs weitere Proteine hinzu.

**Tab. 3.4.4: Antikörperantworten in Seren von Melanom- und Pankreaskarzinompatienten je Protein bei 1x/3x Schwellenwert.** Grün markiert sind die acht Proteine, die in der Gesamtzahl der Seren bei 3x Schwellenwert 15 und mehr positive Signale zeigten.

Protein	Antikörperantworten im Melanom 1x/3x-Schwellenwert	Antikörperantworten im Pankreaskarzinom 1x/3x-Schwellenwert	Gesamtanzahl der Antikörperantworten 1x/3x-Schwellenwert	Antikörperantworten im Normalkollektiv 1x/3x-Schwellenwert
ACSL4v2	14/1	0/0	14/1	0/0
ANXA1	8/5	1/1	9/6	0/0
BMI1	15/6	3/2	18/8	3/0
CALUv1	20/14	12/6	32/20	8/3
CNIH	12/1	0/0	12/1	0/0
CYR61	16/0	1/0	17/0	0/0
C8orf4	19/14	9/2	28/16	10/4
GADD45a	12/4	1/0	13/4	1/0
HIGD1Av1	12/3	1/0	13/3	2/0
HIGD1Av2	24/3	4/0	28/3	2/0
HMGN3v1	52/30	29/13	81/43	3/2
LUM	0/0	0/0	0/0	0/0
MPHOSPH6	76/33	16/4	92/37	7/4
NAP1L1	6/1	3/0	9/1	1/0
NDUFB5	2/0	0/0	2/0	0/0
PAICSv1	29/1	8/0	37/1	1/0
PAICSv2	34/2	3/0	37/2	1/0
PSAT1v1	5/0	3/3	8/3	1/0
RGS5	31/9	8/0	39/9	3/0
RPL23a	73/29	28/10	101/39	5/1
SCYE1v1	43/17	24/6	67/23	4/1
SCYE1v3	79/23	15/3	94/26	5/2
SFRP2	8/0	1/0	9/0	0/0
SGK1v1	4/1	1/0	5/1	0/0
SNAP25v2	1/1	1/0	2/1	0/0
SPP1v1	1/0	0/0	1/0	0/0
SPP1v2 & v3	1/0	0/0	1/0	0/0
TGFBR2v2 Volllänge	0/0	0/0	0/0	0/0
N-Terminus	10/1	2/0	12/1	1/0
UBE2B	9/3	4/0	13/3	2/1
UBE2D1	71/17	13/3	84/20	7/0
UBE2V1v4	3/1	0/0	3/1	0/0
UBQLN1	23/9	6/1	29/10	1/0

Für acht der Proteine konnten bei stringentem 3x Schwellenwert mehr als 15 positive Seren, was ca. 2,5 % der Gesamtseren entsprach, in beiden Patientenkollektiven kombiniert nachgewiesen werden (siehe Tab. 3.4.4, grüne Markierung). Hierbei handelte es sich um CALUv1 (20 Signale), C8orf4 (16), HMGN3v1 (43), MPHOSPH6 (37), RPL23a (39), SCYE1v1 (23) & v3 (26) sowie UBE2D1 (20).

Die acht Proteine mit den häufigsten Antikörperantworten in Patienten hatten tendentiell mit drei bis zehn auch eine höhere Zahl positiver Seren im Kontrollkollektiv.

#### **3.4.4 Frequenz der Antikörperantworten im Pankreaskarzinom- und Kontrollkollektiv**

Die Induzierung einer Autoantikörperantwort kann als Reaktion auf einen Tumor jedoch ebenso im Rahmen anderer Ereignisse wie z.B. Autoimmunerkrankungen oder auch in gesunden Individuen auftreten (Tan *et al.*, 2009; Nolen *et al.*, 2009).

Die Seroprävalenz für jedes Antigen im Pankreaskarzinom- und Kontrollkollektiv wurde daher statistisch mit dem „Fisher’s exact test“ verglichen, um signifikante Unterschiede zwischen beiden Kollektiven eingrenzen und potentielle diagnostische Marker identifizieren zu können (siehe Kapitel 2.6.1). Zur Berechnung wurden die erhaltenen Werte bei 1x Schwellenwert eingesetzt, um eine auswertbare Zahl an positiven Seren zu erhalten.

Nur die Anzahl der antikörperpositiven Seren für CALUv1 und C8orf4 war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zwischen beiden Kollektiven (siehe Tab. 3.4.5). Die Odds-Ratio von unter 1 deutete auf eine berechnete geringere Anzahl an Antikörpern im Patienten- im Vergleich zum Normalkollektiv hin. Die Unterschiede in der Seroprävalenz drei weiterer Proteine (BMI1, HIGD1Av1, UBE2D1) tendierten mit einem p-Wert von unter 0,1 zu einer Signifikanz. Auch bei diesen waren bei Betrachtung der Odds-Ratio weniger Seren im Patientenkollektiv positiv.

Nur HMGN3v1, PAICSv1, RPL23a, SCYE1v1 und UBQLN1 zeigten anhand der Odds-Ratio verhältnismäßig mehr positive Antworten im Patienten- als im Kontrollkollektiv, allerdings ohne statistische Signifikanz. Im untersuchten Pankreaskarzinomkollektiv konnten demnach keine Proteine identifiziert werden, die in PDAC-Patienten eine signifikant erhöhte Anzahl an spontanen Immunantworten induziert haben. Der statistische Vergleich zwischen dem Melanom- und dem Kontrollkollektiv steht noch aus.

**Tab. 3.4.5:** „Fisher's exact test“ zur Bestimmung signifikanter Unterschiede in der Anzahl der positiven Seren zwischen Pankreaskarzinompatienten und der Kontrollgruppe. Statistisch signifikante Werte eines Proteins sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. Die Spalte "Odds-Ratio" gibt das Verhältnis des Auftretens einer Antikörperantwort in Patienten gegenüber gesunden Spendern an. Werte >1 entsprechen einer höheren Wahrscheinlichkeit, <1 einer geringeren Wahrscheinlichkeit. Das Konfidenzintervall ist in den Spalten "untere/obere Schranke" angegeben.

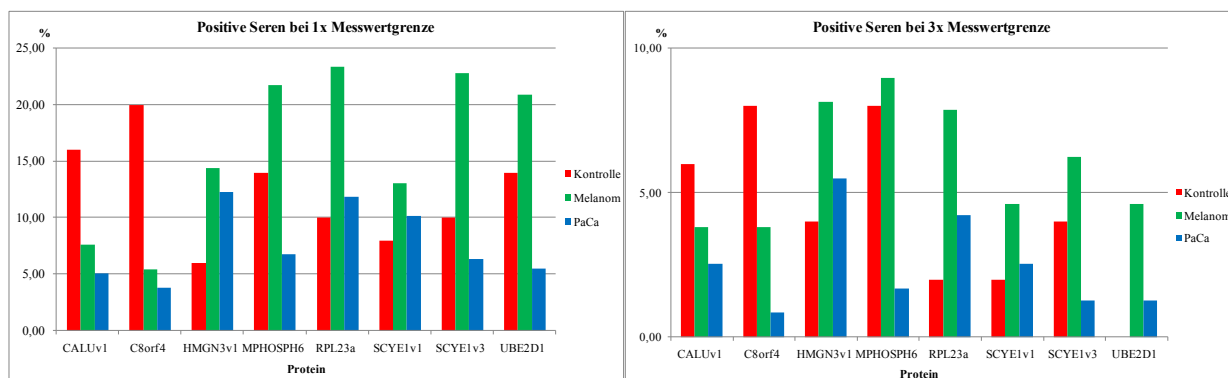
Protein	Odds-Ratio	Untere Schranke	Obere Schranke	p-Wert
ACSL4v2	0	0	∞	1
ANXA1	∞	0,01	∞	1
BMI1	0,2	0,03	1,57	0,0684
CALUv1	0,28	0,1	0,85	<b>0,0118</b>
CNIH	0	0	∞	1
CYR61	∞	0,01	∞	1
C8orf4	0,16	0,05	0,47	<b>0,001</b>
GADD45a	0,21	0	16,7	0,3196
HIGD1Av1	0,1	0	2,02	0,08
HIGD1Av2	0,42	0,06	4,71	0,2824
HMGN3v1	2,19	0,64	11,7	0,3209
LUM	0	0	∞	1
MPHOSPH6	0,45	0,16	1,37	0,1463
NAP1L1	0,63	0,05	33,79	0,5384
NDUFB5	0	0	∞	1
PAICSv1	1,72	0,22	77,8	1
PAICSv2	0,63	0,05	33,79	0,5384
PSAT1v1	0,63	0,05	33,79	0,5384
RGS5	0,55	0,13	3,34	0,4139
RPL23a	1,21	0,43	4,24	0,8121
SCYE1v1	1,3	0,42	5,4	0,7965
SCYE1v3	0,61	0,2	2,26	0,3621
SFRP2	∞	0,01	∞	1
SGK1v1	∞	0,01	∞	1
SNAP25v2	∞	0,01	∞	1
SPP1v1	0	0	∞	1
SPP1v2	0	0	∞	1
TGFB2v2 Volllänge	0	0	∞	1
TGFB2v2 N-Terminus	0,42	0,02	25,21	0,4394
UBE2B	0,42	0,06	4,71	0,2824
UBE2D1	0,36	0,12	1,13	0,0592
UBE2V1v4	0	0	∞	1
UBQLN1	1,28	0,15	59,98	1

### 3.4.5 Analyse der Proteine mit den häufigsten Antikörperantworten im Serenkollektiv von Pankreaskarzinompatienten

Wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, konnten im Pankreaskarzinomkollektiv für die acht Proteine CALUv1, C8orf4, HMGN3v1, MPHOSPH6, RPL23a, SCYE1v1 & v3 sowie UBE2D1 die meisten antikörperpositiven Seren identifiziert werden. Im Melanomkollektiv gehörten HMGN3v1, MPHOSPH6, RPL23a, SCYE1v3 und UBE2D1 zu den Proteinen mit den meisten positiven Seren.

Verglichen mit der Gesamtzahl der Seren im Pankreaskarzinomkollektiv waren für die acht identifizierten Proteine bei 1x Schwellenwert max. 12 % der Seren für zwei der Proteine positiv

(HMGN3v1 und RPL23a) (siehe Abb. 3.4.4). Bei den übrigen sechs lag die prozentuale Verteilung zwischen 4 - 10 %. Bei 3x Schwellenwert sank die Anzahl positiver Seren auf 1 - 5 %. Gegen HMGN3v1, SCYE1v1 und v3 sowie UBE2D1 ließen sich im Pankreaskarzinomkollektiv nur Antikörper in Seren von Patienten ohne Fernmetastasen nachweisen (siehe Abb. 3.4.5). Bei CALUv1, MPHOSPH6 und RPL23a war der Anteil positiver Seren in den M0-Patienten mindestens doppelt so hoch wie bei M1-Patienten.

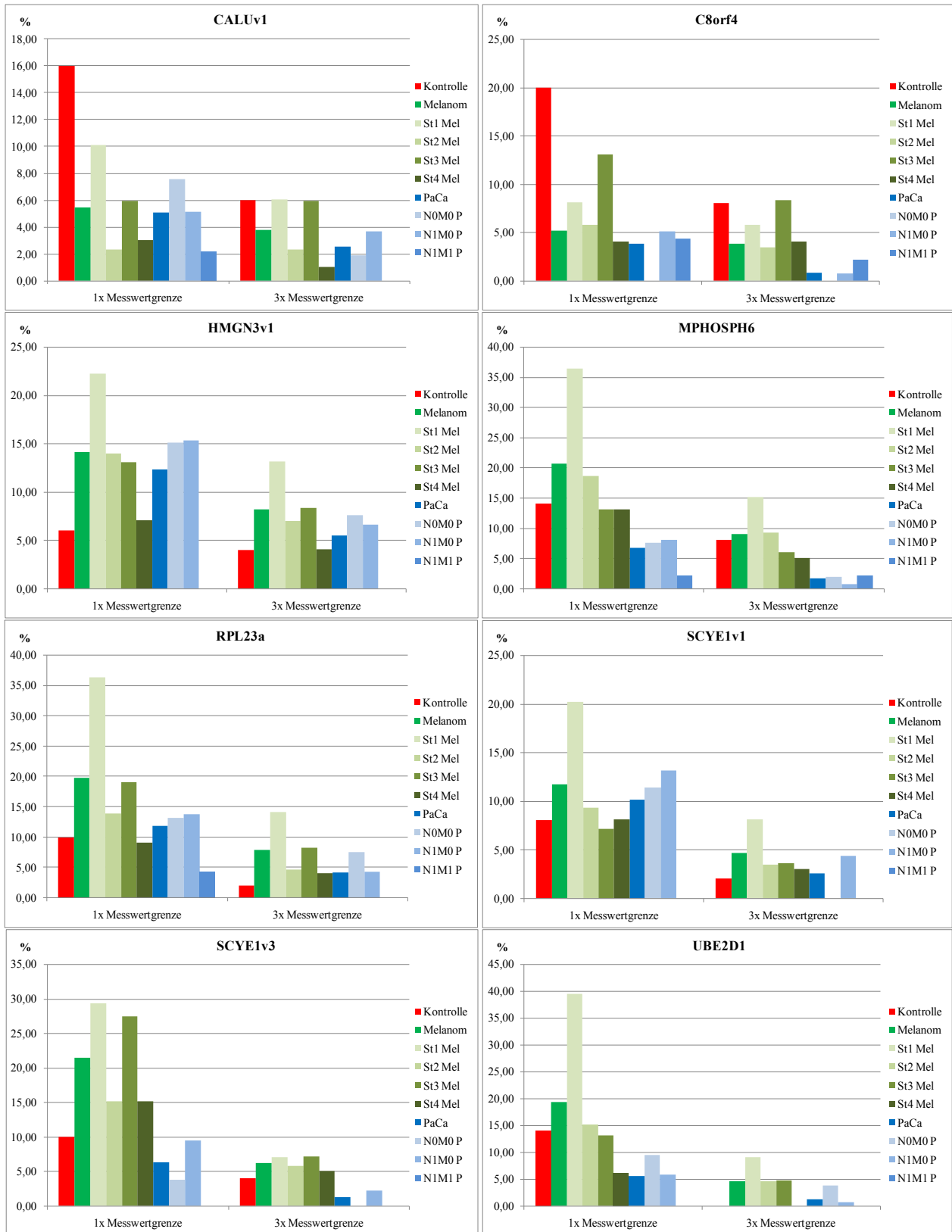


**Abb. 3.4.4: Vergleich der prozentualen Verteilung Antikörper positiver Seren gegen die acht Antigene in den Kontroll- und Patientenkollektiven bei 1x (oben) und 3x (unten) Schwellenwert.** Die Summe der positiven Seren ist gegen die Gesamtzahl an Seren im jeweiligen Kollektiv prozentual angegeben. (rot: Kontrollen; grün: Melanom; blau: Pankreaskarzinom)

Auch im Kontrollkollektiv konnten Antikörper gegen die acht Proteine identifiziert werden. Nur im Fall von HMGN3v1 war die Anzahl positiver Seren bei 1x Schwellenwert in diesem Kollektiv mit 6 % zu 12 % wesentlich geringer als im Pankreaskarzinomkollektiv. Für die übrigen Proteine war die prozentuale Anzahl ähnlich oder zum Teil deutlich erhöht wie bei CALUv1 und C8orf4 mit 16 % beziehungsweise 20 % positiver Seren. Der stringendere 3x Schwellenwert führte zu keiner Änderung an dieser Verteilung. Dies bestätigt die Ergebnisse der in Kapitel 3.4.4 durchgeführten statistischen Analyse.

Da die absoluten Zahlen der acht Proteine im Melanomkollektiv bereits hoch waren, lagen die prozentualen Verteilungen bei allen Proteinen höher als im Pankreaskollektiv. Jedoch gab es eine große Spanne von 5 % positiver Seren (C8orf4) bis ca. 24 % positiver Seren (RPL23a). Der Vergleich zeigte hingegen, dass auch hier die Werte von CALUv1 und C8orf4 unter denen des Kontrollkollektivs lagen. Aufgeteilt nach den Stadien beziehungsweise den Metastasierungsgraden der Kollektive konnte für einige der acht Proteine ein tendenzielles stadien- beziehungsweise gradabhängiges Auftreten beobachtet werden (siehe Abb. 3.4.5). Besonders häufig konnten induzierte Antikörper in Seren von Melanompatienten im Stadium I detektiert werden, wobei für MPHOSPH6, RPL23a und UBE2D1 bei 1x Schwellenwert prozentual Anteile von 35 - 40 % positiver Seren erreicht wurden, die bei 3x Schwellenwert mit 10 - 15 % deutlich niedriger waren. Die Antikörperantworten nahmen in späteren Stadien ab und waren bei HMGN3v1, RPL23a und UBE2D1 in Stadium IV am geringsten.

Positive Seren gegen C8orf4, dem Protein mit den meisten Antworten im Kontrollkollektiv, waren in allen Stadien zu finden, im Pankreaskarzinomkollektiv jedoch nicht bei nicht metastasierten Tumoren.



**Abb. 3.4.5: Vergleich der positiven Seren gegen die acht am häufigsten positiven Kandidaten in den Kontroll- und Patientenkollektiven, aufgeschlüsselt nach Stadium/Metastasierungsgrad, bei 1x- und 3x-Schwellenwert.** Die Summe der positiven Seren bei 1x (linker Teil jedes Diagramms) und 3x Schwellenwert (rechter Teil jedes Diagramms) ist gegen die Gesamtzahl an Seren im Kollektiv und die Anzahl im jeweiligen Stadium prozentual angegeben. (rot: Kontrollen; Grüntöne: Melanom, gesamt und Stadien; Blautöne: Pankreaskarzinom, gesamt und Grade)

Induzierte Antikörper konnten gegen den Großteil der untersuchten Proteine im Pankreaskarzinom- und im Melanomkollektiv identifiziert werden, die 44 % beziehungsweise 65 % positive Seren enthielten. Besonders die acht Proteine CALUv1, C8orf4, HMGN3v1, MPHOSPH6, RPL23a, SCYE1v1 & v3 und UBE2D1 waren antikörperpositiv. Jedoch konnte für keines eine statistisch signifikante höhere Anzahl an positiven Seren im Pankreaskarzinomkollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv beschrieben werden, da deren Werte mit maximal 15 % nicht deutlich über den Kontrollen lagen. Die Anzahl der Antikörper gegen CALUv1 und C8orf4 hingegen waren im Pankreaskarzinomkollektiv im Vergleich zum Kontrollkollektiv signifikant verringert. Ein diagnostischer Einsatz ist unwahrscheinlich, die potentielle Eignung für prognostische Biomarker wurde in Kapitel 3.7 untersucht.



### **3.5 Genexpressionsanalyse mit RNA-Proben von Pankreaskarzinomgewebe und Normalgewebe zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene**

Zwischen Normal- und Tumorgewebe differentiell exprimierte Gene stellen derzeit eine der größten Gruppen dar, die als Biomarker und/oder als Therapiezielstrukturen untersucht und eingesetzt werden (siehe Kapitel 1.2.1 & 1.3) (Segota & Bukowski, 2004). Idealerweise tritt die Expression ausschließlich im Tumorgewebe und immunprivilegierten Geweben auf, mindestens jedoch stark hochreguliert im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe.

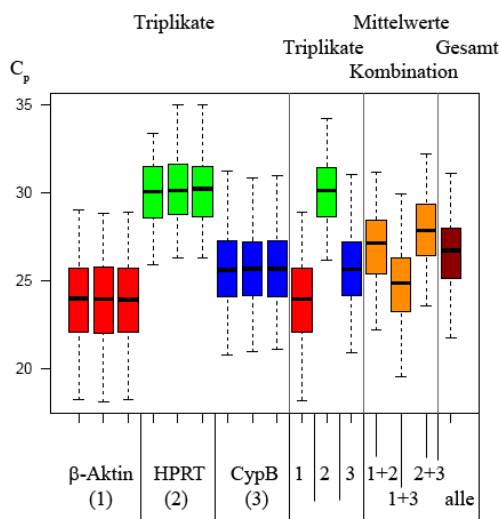
Die selektierten Gene wurden bereits in Kapitel 3.2 semi-quantitativ auf ihre gewebespezifische und differentielle Expression in verschiedenen Normalgeweben und Tumorzelllinien überprüft. Es erfolgte nun eine quantitative Analyse zur Bestimmung der differentiellen Expression in PDAC-Tumorgewebe im Vergleich zu Pankreasgewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP) und Pankreasnormalgewebe. Für die Messung wurden 91 Pankreaskarzinom-RNA-Proben, von denen 64 mit Patientendaten dokumentiert waren, sowie 15 RNA-Proben von Patienten mit chronischer Pankreatitis und 14 Proben von Spendern mit intaktem Pankreas eingesetzt. Klinische Daten standen für die beiden letzten Gruppen nicht zur Verfügung. Darüber hinaus wurde das in der semi-quantitativen PCR eingesetzte Normalgewebeskollektiv auch hier eingeschlossen. Für 47 der Pankreaskarzinom-RNA-Proben stand Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes beziehungsweise kryokonserviertes Gewebe zur Verfügung, um die Genexpressionsdaten auf Proteinebene zu validieren (siehe Kapitel 3.6.1).

Analog der Einteilung der Seren nach dem Metastasierungsgrad der Patienten waren auch die hier eingesetzten RNA-Proben soweit möglich eingeordnet, wobei keine homogene Verteilung erreicht werden konnte (siehe Kapitel 2.1.9.2).

#### ***3.5.1 Validierung der Kontrollbezugsgene***

Die relative quantitative Genexpressionsanalyse erfordert das Mitführen geeigneter Kontrollbezugsgene (oder Referenzgene), um die Expressionswerte der Gene innerhalb der Probe normalisieren und mit den Werten verschiedener Proben in Relation setzen zu können. Als Kontrollbezugsgene wurden  *$\beta$ -Aktin*, *Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (HPRT)* und *Cyclophilin B* gewählt, um mögliche Effekte einer unterschiedlichen Gewebezusammensetzung auszugleichen (siehe Kapitel 2.2.13).

Die ideale Kombination der Gene wurde bestimmt, indem die  $C_p$ -Mittelwerte der einzelnen Triplikate und deren Streuung aus allen Proben gebildet und als „Box-Plot“ aufgetragen wurde (siehe Abb. 3.5.1).



**Abb. 3.5.1:** „Box-Plots“ der Bestimmung der robustesten Kombination der Kontrollbezugsgene  $\beta$ -Aktin, Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase (HPRT) und Cyclophilin B für die Auswertung der Genexpressionsanalyse. Die Mittelwerte der Triplikate und die jeweiligen Streuungen wurden berechnet und anschließend zusammengefasst für jedes einzelne Kontrollgen, als Kombinationen zweier Kontrollgene oder aller drei dargestellt, um die beste Variante für die Analyse zu wählen.

Die Kombination aller drei Bezugsgene zeigte das beste Ergebnis, da die Mittelwerte in einem für eine Referenz guten  $C_p$ -Wertebereich von 25-28 lagen und die Streuung akzeptabel war.

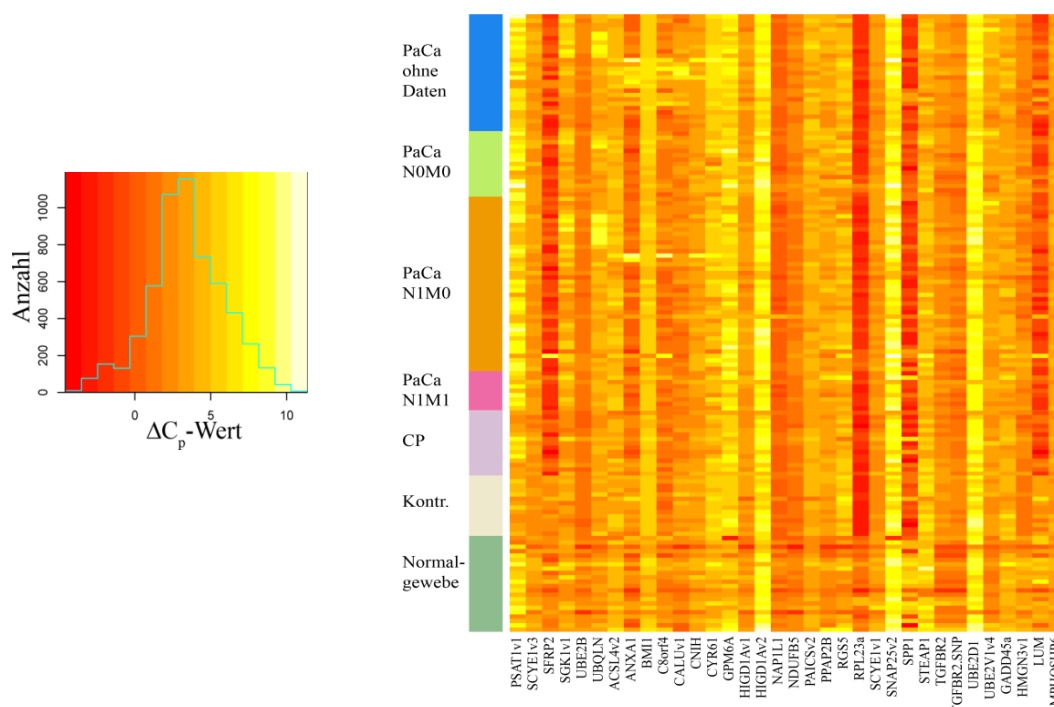
### 3.5.2 Analyse der Genexpression in RNA aus Pankreaskarzinom-, CP- und Pankreasnormalgewebe mittels quantitativer PCR

Die Genexpressionsanalyse wurde für 37 Gene, inklusive der Bezugsgene, in insgesamt 142 RNA-Proben in Triplikaten durchgeführt. Aus den erhaltenen  $C_p$ -Werten der Triplikate je Gen pro Probe wurde ein gegen den Referenzmittelwert normalisierter  $\Delta C_p$ -Wert berechnet, der als negativer Exponent zur Basis 2 das Genexpressionsniveau in der entsprechenden Probe angab (siehe Kapitel 2.2.13). Eine Übersicht der Expressionsniveaus ist als „Heat Map“ in Abbildung 3.5.2 dargestellt.

Das Gen *PAICSv1* musste jedoch aus der Analyse ausgeschlossen werden, da weniger als 20 % der Proben verwertbare Daten lieferten.

Die  $\Delta C_p$ -Werte der untersuchten Gene und Proben lagen primär in einem Bereich von 1 bis 7 und waren dementsprechend etwas geringer exprimiert als der Durchschnitt der Bezugsgene. Es lag im Prinzip eine Normalverteilung der  $\Delta C_p$ -Werte vor.

Die Expressionsniveaus variierten zwischen den Genen sehr stark. Eine tendentiell hohe Expression lag bei *SFRP2*, *ANXA1*, *RPL23a*, *SPPI* und *LUM* vor. Eine besonders niedrige Expression wurde für *HIGD1A2*, *SNAP25v2* und *UBE2D1* gemessen.



**Abb. 3.5.2: Verteilungs- und Intensitätshistogramm (links) und „Heat Map“ (rechts) der Genexpressionsanalyse.** Das Histogramm zeigt die Verteilung und Anzahl der  $\Delta C_p$ -Werte aller gemessenen Gene und Proben nach der Normalisierung. Die Farbskala definiert hoch exprimierte Gene mit einem niedrigen  $\Delta C_p$ -Wert im roten Bereich und staffelt in den gelben Bereich mit niedriger Expression. Die „Heat Map“ stellt die Genexpressionsniveaus aller Gene zusammengefasst nach Kollektiv und Metastasierungsgrad bei den Pankreaskarzinomproben (PaCa) dar. (CP: Chronische Pankreatitis; Kontr.: RNA aus gesundem Pankreasgewebe)

Für die Berechnung und den Vergleich der Genexpression zwischen zwei Populationen wird ein  $\Delta\Delta C_p$ -Wert aus dem Mittelwert der  $\Delta C_p$ -Werte einer Population subtrahiert um den Mittelwert der  $\Delta C_p$ -Werte der zweiten Population gebildet (siehe Kapitel 2.2.13). Dieser Wert gibt als negativer Exponent zur Basis 2 das Expressionsverhältnis zwischen den Populationen an.

Der Vergleich der Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe wird im Regelfall mit Gewebe aus Tumor und nicht betroffenem Gewebe des Organs eines Patienten durchgeführt, sodass die Probenanzahl identisch ist. Im vorliegenden Fall waren die Stichprobengrößen unterschiedlich und die Proben aus unterschiedlichen Individuen gewonnen. Daher wurde auf einen statistischen Vergleich der erhaltenen Expressionsdaten aller Gene mittels des parameterfreien Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests zurückgegriffen (siehe Kapitel 2.6.3). Es wurde ein zweiseitiger Test auf Identität der Expression anhand aller  $\Delta C_p$ -Werte zwischen den Populationen durchgeführt. Somit konnten robustere Werte für die Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe erhalten werden. Die nachfolgenden Signifikanzwerte sind auf die statistische Analyse bezogen, während die Expressionsverhältnisse zur Veranschaulichung aus dem  $\Delta\Delta C_p$ -Wert berechnet wurden.

Zwölf Gene waren zwischen Tumor- und Normalgewebe signifikant unterschiedlich exprimiert (siehe Tab. 3.5.1). Die gemittelten  $\Delta\Delta C_p$ -Werte aller Gene lagen zwischen 0,16 bis 11,20.

Vier Gene (*ANXA1*, *CALU1*, *LUM* und *SFRP2*) waren gemittelt in allen Tumorproben kombiniert als auch in allen Metastasierungsstadien im Vergleich zu den Normalproben statistisch signifikant

überexprimiert. Mit durchschnittlich einer ca. 11-fachen Überexpression zeigten *LUM* und *SFRP2* besonders hohe Werte. Weiterhin konnte eine Überexpression für *RGS5* gemessen werden, die jedoch nur im Gesamtkollektiv und dem N1M0-Grad signifikant war.

Demgegenüber standen sieben signifikant reduziert exprimierte Gene (*HMGN3v1*, *NDUFB5*, *PSAT1v1*, *RPL23a*, *SCYE1v1* und *v3* und *UBE2B*), deren gemittelte Werte im Tumor nur 15-75% der Expression im Normalgewebe entsprachen. Allerdings umfasste die Signifikanz bis auf *PSAT1v1*, bei dem die Expression in allen Metastasierungsgraden signifikant verringert war, nur die Grade ohne Fernmetastasen (*HMGN3v1*, *RPL23a*, *SCYE1v1* und *UBE2B*) beziehungsweise ohne Metastasen (*NDUFB5* und *SCYE1v3*).

**Tab. 3.5.1: Statistische Analyse des Expressionsunterschiedes zwischen Tumorgewebe aller Patienten gegenüber den Kontrollen für jedes Gen nach der Wilcoxon-Mann-Whitney-Methode.** Die Tabellenspalten geben den Expressionsunterschied und die Signifikanz aller Tumorproben und der Proben im jeweiligen Metastasierungsgrad gegenüber dem Normalgewebe an. Statistisch signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) eines Gens sind fett gekennzeichnet.

Gen	Expressionsniveau im Tumorgewebe aller Patienten gegen Kontrollen	Expressionsniveau im Tumorgewebe bei N0M0-Patienten gegen Kontrollen	Expressionsniveau im Tumorgewebe bei N1M0-Patienten gegen Kontrollen	Expressionsniveau im Tumorgewebe bei N1M1-Patienten gegen Kontrollen
<i>ACSL4v2</i>	0,67 / p= 0,654	0,63 / p= 0,723	0,65 / p= 0,604	0,62 / p= 0,778
<i>ANXA1</i>	<b>3,24 / p &lt; 0,01</b>	<b>5,93 / p &lt; 0,01</b>	<b>3,97 / p &lt; 0,01</b>	<b>5,18 / p &lt; 0,01</b>
<i>BMI1</i>	1,03 / p= 0,983	1,14 / p= 0,894	1,15 / p= 0,644	1,18 / p= 0,923
<i>CALUv1</i>	<b>2,05 / p &lt; 0,01</b>	<b>2,54 / p &lt; 0,01</b>	<b>2,78 / p &lt; 0,01</b>	<b>3,19 / p &lt; 0,05</b>
<i>CNIH</i>	1,02 / p= 0,877	0,99 / p= 0,995	1,06 / p= 0,812	1,42 / p= 0,357
<i>CYR61</i>	1,32 / p= 0,877	2,19 / p= 0,161	1,49 / p= 0,522	2,37 / p= 0,543
<i>C8orf4</i>	0,60 / p= 0,877	0,68 / p= 0,894	0,71 / p= 0,970	0,82 / p= 0,983
<i>GADD45a</i>	1,47 / p= 0,423	1,41 / p= 0,770	1,46 / p= 0,530	1,50 / p= 0,749
<i>GPM6A</i>	0,79 / p= 0,877	0,74 / p= 0,987	0,77 / p= 0,782	0,68 / p= 0,923
<i>HIGD1Av1</i>	0,64 / p= 0,624	0,39 / p= 0,197	0,60 / p= 0,522	0,71 / p= 0,923
<i>HIGD1Av2</i>	0,78 / p= 0,877	0,56 / p= 0,428	0,83 / p= 0,914	0,78 / p= 0,983
<i>HMGN3v1</i>	<b>0,53 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,39 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,52 / p &lt; 0,01</b>	0,42 / p=0,071
<i>LUM</i>	<b>10,93 / p &lt; 0,01</b>	<b>10,78 / p &lt; 0,01</b>	<b>12,07 / p &lt; 0,01</b>	<b>17,32 / p &lt; 0,01</b>
<i>MPHOSPH6</i>	0,88 / p= 0,877	0,86 / p= 0,894	0,84 / p= 0,644	0,91 / p= 0,923
<i>NAP1L1</i>	1,12 / p= 0,586	1,01 / p= 0,987	1,18 / p= 0,358	1,46 / p= 0,428
<i>NDUFB5</i>	<b>0,70 / p &lt; 0,05</b>	<b>0,68 / p &lt; 0,05</b>	0,74 / p=0,202	0,85 / p= 0,779
<i>PAICSv2</i>	0,83 / p= 0,877	0,78 / p= 0,948	0,93 / p= 0,985	1,09 / p= 0,923
<i>PPAP2B</i>	0,74 / p= 0,309	0,79 / p= 0,948	0,78 / p= 0,522	0,72 / p= 0,910
<i>PSAT1v1</i>	<b>0,16 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,11 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,17 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,20 / p &lt; 0,05</b>
<i>RGS5</i>	<b>2,34 / p &lt; 0,05</b>	3,21 / p= 0,084	<b>2,55 / p &lt; 0,05</b>	2,46 / p=0,27
<i>RPL23a</i>	<b>0,56 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,37 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,57 / p &lt; 0,01</b>	0,69 / p= 0,253
<i>SCYE1v1</i>	<b>0,68 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,62 / p &lt; 0,05</b>	<b>0,66 / p &lt; 0,01</b>	0,78 / p=0,270
<i>SCYE1v3</i>	<b>0,70 / p &lt; 0,05</b>	<b>0,63 / p &lt; 0,05</b>	0,75 / p=0,111	0,75 / p=0,440
<i>SFRP2</i>	<b>11,20 / p &lt; 0,01</b>	<b>11,92 / p &lt; 0,01</b>	<b>11,27 / p &lt; 0,01</b>	<b>17,14 / p &lt; 0,01</b>
<i>SGK1v1</i>	0,47 / p= 0,072	0,48 / p= 0,428	0,47 / p= 0,155	0,39 / p= 0,084
<i>SNAP25v2</i>	0,81 / p= 0,897	0,73 / p= 0,987	0,71 / p= 0,782	0,74 / p= 0,923
<i>SPP1v1</i>	1,45 / p= 0,877	1,02 / p= 0,995	1,67 / p= 0,736	1,25 / p= 0,923
<i>STEAP1</i>	2,08 / p= 0,062	1,68 / p= 0,672	2,00 / p= 0,086	2,44 / p= 0,058
<i>TGFBR2v2</i>	1,24 / p= 0,654	1,59 / p= 0,742	1,31 / p= 0,356	1,45 / p= 0,778
<i>UBE2B</i>	<b>0,66 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,61 / p &lt; 0,01</b>	<b>0,68 / p &lt; 0,01</b>	0,76 / p=0,211
<i>UBE2D1</i>	1,03 / p= 0,996	0,93 / p= 0,995	0,91 / p= 0,980	1,14 / p= 0,983
<i>UBE2V1v4</i>	0,68 / p= 0,098	0,80 / p= 0,945	0,65 / p= 0,132	0,82 / p= 0,923
<i>UBQLN1</i>	0,61 / p= 0,750	0,71 / p= 0,987	0,54 / p= 0,627	0,94 / p= 0,923

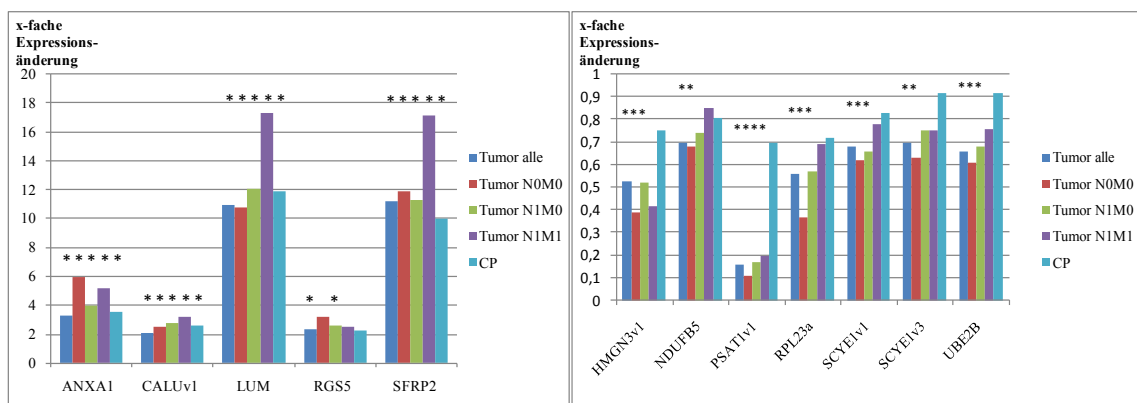
Die Expression der vier im Tumorgewebe überexprimierten Gene *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM* und *SFRP2* war auch in Proben von Gewebe mit chronischer Pankreatitis gegenüber dem Normalgewebe statistisch signifikant erhöht und erreichte ähnlich hohe Faktoren wie im Tumor (siehe Tab. 3.5.2). Zwischen Tumor- und CP-Gewebe wurde eine signifikant reduzierte Expression für *PSAT1v1* und *SGK1v1* identifiziert.

**Tab. 3.5.2: Statistische Analyse des Expressionsunterschiedes zwischen Tumorgewebe aller Patienten gegenüber Pankreasgewebe von Patienten mit chronischer Pankreatitis (CP) und diesen gegenüber den Kontrollen für jedes Gen nach der Wilcoxon-Mann-Whitney-Methode. Statistisch signifikante Werte ( $p < 0,05$ ) eines Gens sind fett gekennzeichnet.**

Gen	Expressionsniveau im Tumorgewebe aller Patienten gegen CP-Patienten	Expressionsniveau im CP-Patienten gegen Kontrollen
<i>ACSL4v2</i>	0,53 / p= 0,147	1,26 / p= 0,990
<i>ANXA1</i>	0,93 / p= 0,966	<b>3,50 / p &lt; 0,01</b>
<i>BMI1</i>	0,82 / p= 0,896	1,25 / p= 0,911
<i>CALUv1</i>	0,79 / p= 0,999	<b>2,60 / p &lt; 0,01</b>
<i>CNIH</i>	0,73 / p= 0,896	1,40 / p= 0,750
<i>CYR61</i>	0,68 / p= 0,588	1,94 / p= 0,084
<i>C8orf4</i>	0,61 / p= 0,832	0,98 / p= 1,000
<i>GADD45a</i>	1,15 / p= 0,975	1,28 / p= 0,986
<i>GPM6A</i>	0,58 / p= 0,591	1,36 / p= 0,986
<i>HIGD1Av1</i>	0,66 / p= 0,966	0,96 / p= 1,000
<i>HIGD1Av2</i>	0,98 / p= 1,000	0,79 / p= 0,999
<i>HMGN3v1</i>	0,70 / p= 0,487	0,75 / p= 0,596
<i>LUM</i>	0,92 / p= 1,000	<b>11,90 / p &lt; 0,01</b>
<i>MPHOSPH6</i>	0,81 / p= 0,832	1,09 / p= 1,000
<i>NAP1L1</i>	1,08 / p= 0,958	1,04 / p= 1,000
<i>NDUFB5</i>	0,87 / p= 0,931	0,81 / p= 0,946
<i>PAICSv2</i>	1,08 / p= 0,998	0,77 / p= 0,916
<i>PPAP2B</i>	0,78 / p= 0,502	0,96 / p= 1,000
<i>PSAT1v1</i>	<b>0,23 / p &lt; 0,05</b>	0,70 / p= 0,999
<i>RGS5</i>	1,05 / p= 1,000	2,23 / p= 0,105
<i>RPL23a</i>	0,78 / p= 0,935	0,72 / p= 0,849
<i>SCYE1v1</i>	0,82 / p= 0,896	0,83 / p= 0,957
<i>SCYE1v3</i>	0,76 / p= 0,896	0,92 / p= 0,990
<i>SFRP2</i>	1,12 / p= 0,999	<b>10,00 / p &lt; 0,01</b>
<i>SGK1v1</i>	<b>0,39 / p &lt; 0,05</b>	1,21 / p= 0,903
<i>SNAP25v2</i>	0,64 / p= 0,975	1,26 / p= 1,000
<i>SPP1v1</i>	1,09 / p= 1,000	1,33 / p= 0,986
<i>STEAP1</i>	1,08 / p= 1,000	1,92 / p= 0,338
<i>TGFBR2v2</i>	0,80 / p= 0,822	1,56 / p= 0,218
<i>UBE2B</i>	0,72 / p= 0,352	0,92 / p= 1,000
<i>UBE2D1</i>	0,76 / p= 0,999	1,35 / p= 1,000
<i>UBE2V1v4</i>	0,77 / p= 0,890	0,89 / p= 0,999
<i>UBQLN1</i>	0,53 / p= 0,630	1,16 / p= 1,000

### 3.5.3 Statistisch signifikant differentiell exprimierte Gene zwischen Tumor- und Normalgewebe

Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben waren die vier Gene *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM* und *SFRP2* in Tumor- und CP-Gewebe und das Gen *RGS5* nur in Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe überexprimiert (siehe Abb. 3.5.3). Die Expressionsniveaus für *LUM* und *SFRP2* lagen gemittelt über einer 10-fachen Steigerung im Tumor- und CP-Gewebe. Im N1M1-Grad wurde eine ca. 17-fache Überexpression gemessen. Für *ANXA1* konnte eine 3-6-fache Überexpression je nach Metastasierungsgrad und für *CALUv1* eine 2-3-fache Überexpression gemessen werden.

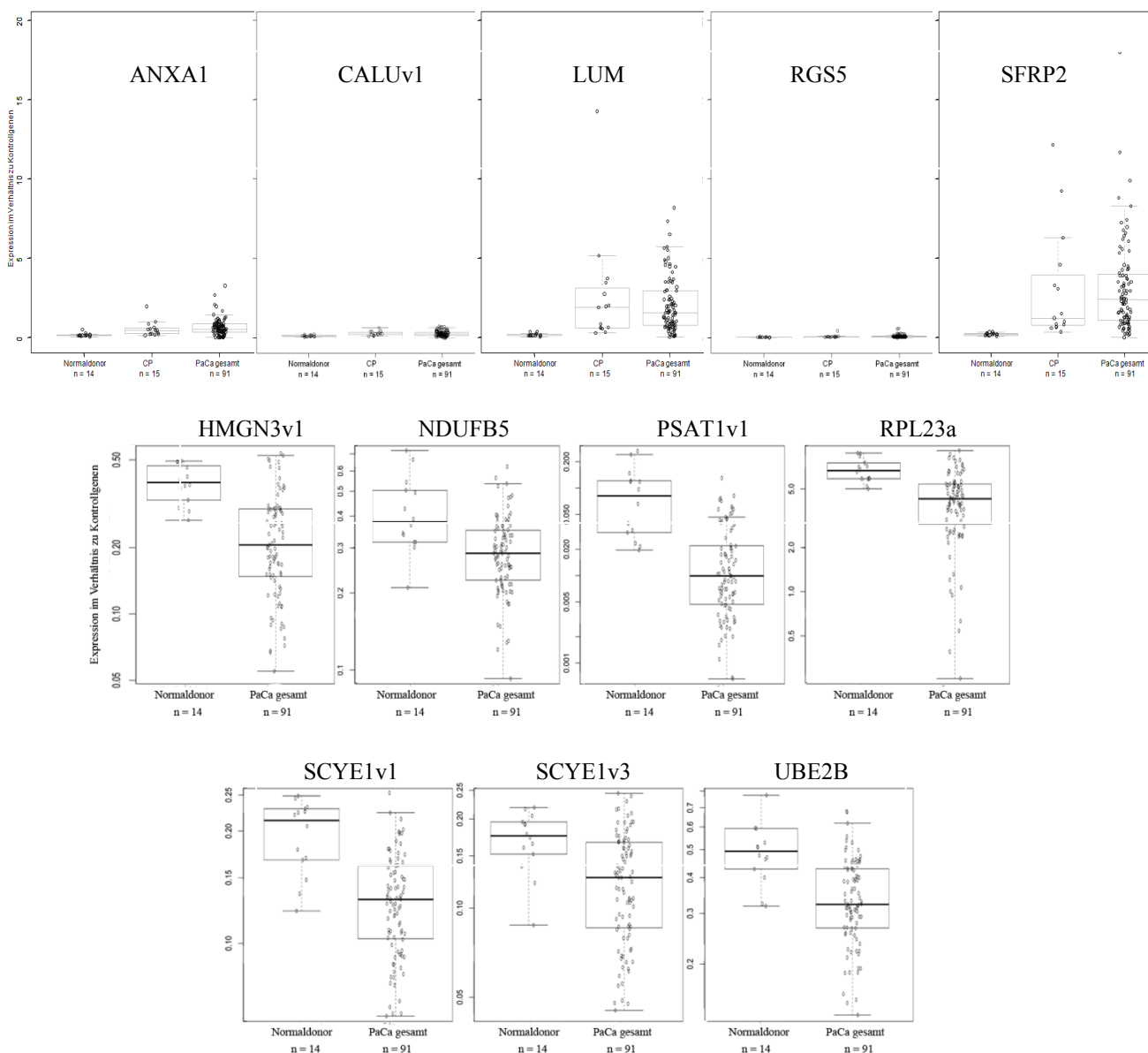


**Abb. 3.5.3:** Im Tumorgewebe, gesamt und aufgeteilt nach Metastasierungsgrad, und chronischer Pankreatitis im Vergleich zu Normalgewebe in der Expression statistisch signifikant veränderte Gene ( $p < 0,05$ : \*). Aufgeführt sind überexprimierte (links) und verringert exprimierte Gene (rechts), die in mindestens einer Gruppe statistisch signifikante Werte aufwiesen, und deren Expressionsänderung im Vergleich zu den Normalgewebeproben.

Das Gen *PSAT1v1* war im Tumorgewebe am stärksten in der Expression reduziert und erreichte in allen Metastasierungsgraden durchschnittlich ca. 10-20 % der Expression des Normalgewebes. Die weiteren signifikant reduziert exprimierten Gene (*HMGN3v1*, *NDUFB5*, *RPL23a*, *SCYE1v1* und *v3* und *UBE2B*) zeigten um 20-60 % verringerte Expressionen. Das Expressionsniveau dieser Gene lag in CP-Gewebe bei 70-90 % des Normalgewebes.

Die normalisierte Expression von *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM*, *RGS5* und *SFRP2* im Normalgewebe war gering und bewegte sich im „Box-Plot“ in einem engen Wertebereich unter 1 (siehe Abb. 3.5.4). Die normalisierten Expressionswerte in CP- und Tumorgewebe lagen bei den zwei am stärksten überexprimierten Genen *LUM* und *SFRP2* im Mittel bei 2-3. Jedoch zeigte sich eine hohe Streuung der Messwerte, die sich in einem Bereich der Werte des Normalgewebes bis über 10-fach der Kontrollbezugs-gene bewegte.

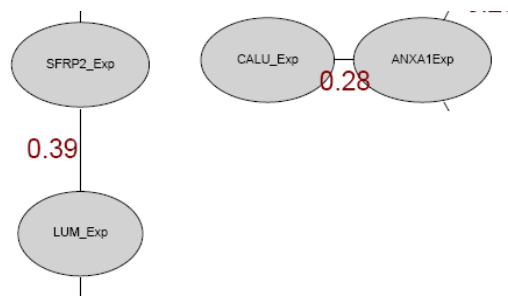
Bei den verringert exprimierten Genen betragen die normalisierten Expressionswerte im Normalgewebe im Mittel zwischen 0,1 bis über 5. Am geringsten war *PSAT1v1* exprimiert, das im Tumorgewebe am stärksten herunterreguliert war und einen gemittelten Wert von ca. 0,01 erreichte.



**Abb. 3.5.4: "Box-Plots" aller normalisierten Messwerte der im Pankreastumorgewebe signifikant verändert exprimierten Gene.** Die signifikant überexprimierten Gene *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM*, *RGS5* und *SFRP2* sind mit gleicher Skala dargestellt (obere Zeile), die signifikant reduziert exprimierten Gene *HMGN3v1*, *NDUFB5*, *PSAT1v1*, *RPL23a*, *SCYE1v1* & *v3* und *UBE2B* mit jeweils angepasster Skala (mittlere/untere Zeile). Die Messwerte aller Proben (als Kreise dargestellt) sind normalisiert gegen die Kontrollgene entsprechend ihres Herkunftsgewebes (für überexprimierte Gene von links nach rechts: Normalgewebe, Chronische Pankreatitis (CP), Pankreaskarzinom (PaCa) gesamt; für reduziert exprimierte Gene von links nach rechts: Normalgewebe, Pankreaskarzinom (PaCa) gesamt) mit Anzahl der Messwerte angegeben. Der Median ist durch die waagerechte Linie in der "Box" dargestellt. Die Gene  *$\beta$ -Aktin*, *HPRT* und *Cyclophilin B* dienen zur Normalisierung.

Auf Grund der deutlichen Expressionsunterschiede und der zum Teil starken Streuungen zwischen Tumor- und Normalgewebe wurden partielle Korrelationen zwischen allen Genen berechnet, um proportionale beziehungsweise anti-proportionale Expressionsmuster zu identifizieren, die auf mögliche funktionelle beziehungsweise regulatorische Zusammenhänge deuten könnten. Hierbei

konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen der *SFRP2*- und *LUM*-Expression sowie der *CALU*- und *ANXA1*-Expression festgestellt werden (siehe Abb. 3.5.5).



**Abb. 3.5.5: Partielle Korrelationen zwischen den überexprimierten Genen bei konstant gehaltenen Einflussvariablen.** Ein positiver Wert entspricht einer proportionalen Reaktion zwischen beiden Genen. Werte im Bereich von 0,2-0,4 geben eine leichte Abhängigkeit an.

Zwölf zwischen Tumor- und Normalgewebe signifikant differentiell exprimierte Gene konnten identifiziert werden, davon fünf überexprimierte und sieben verringert exprimierte. *LUM* und *SFRP2* zeigten jeweils eine mehr als 10-fache Überexpression sowohl in CP- als auch PDAC-Gewebe. Die erhaltenen Expressionswerte wurden nachfolgend mit klinischen Daten korreliert, um eine prognostische Relevanz zu überprüfen (siehe Kapitel 3.7).



### 3.6 Charakterisierung des Proteins Secreted Frizzled-related Protein 2 (SFRP2) im Kontext des pankreatischen duktales Adenokarzinoms

Die Expressionsanalyse auf Transkriptebene wies eine hohe und statistisch signifikante Überexpression des Gens, das für Secreted Frizzled-related Protein 2 (SFRP2) kodiert, in Pankreastumorgewebe nach.

Die Secreted Frizzled-related Proteine (SFRP) stellen eine Familie von fünf sekretierten Proteinen dar, die zwei konservierte Domänen, die Cystein reiche Frizzled- (FZD) und die Netrin-ähnliche Domäne, besitzen (siehe Abb. 3.6.1) (Jones & Jomary, 2002). Sie werden als natürliche extrazelluläre Modulatoren der Wnt-Signalwege angesehen. Die Modulation des Wnt-Signalweges wird durch die FZD-Domäne erreicht, die homolog zu der extrazellulären FZD-Domäne des Frizzled-Rezeptor ist, und Wnt-Proteine binden oder mit dem Rezeptor dimerisieren kann.

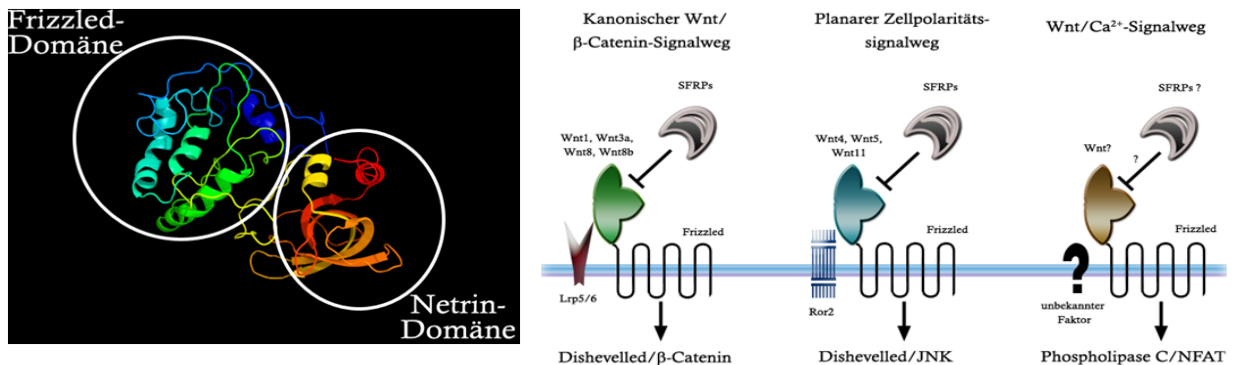


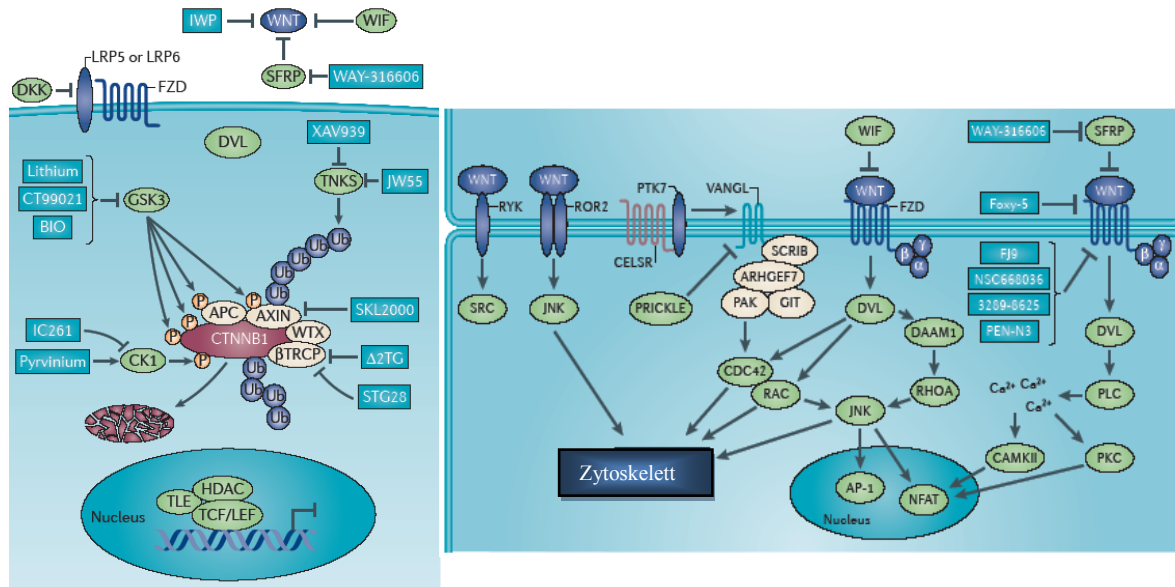
Abb. 3.6.1: Domänenstruktur von Secreted Frizzled-related Protein 2 (links) und Interaktionen mit Wnt-Proteinen bei der Modulation der Signalkaskade (rechts).

In der Embryo- und Fetogenese, der neuronalen Entwicklung jedoch auch in der Karzinogenese besitzen die Wnt-Signalwege eine zentrale Steuerungsfunktion (James *et al.*, 2008; Cadigan & Peifer, 2009). Ihr Name geht auf die sekretierten Signalmoleküle Wnt („**W**ingless - **I**ntegration“) zurück, die an ihre Zelloberflächenrezeptoren Frizzled, eine Proteinfamilie von mindestens zehn Proteinen, binden und je Wnt-Molekül und Rezeptor bestimmte Signalwege aktivieren. Die drei Signalwege umfassen den planaren Zellpolaritäts, den Wnt/Calcium-abhängigen und den kanonischen Wnt-/β-Catenin-Signalweg (siehe Abb. 3.6.2).

Auf Grund von aktivitätsmodulierenden Mutationen, die in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert werden konnten, in einigen zentralen Genen wie *Adenomatous polyposis coli (APC)* und *β-Catenin* wird besonders der kanonische Signalweg hinsichtlich seiner Relevanz in der Entstehung, der Progression und einer potentiellen Therapie eines Tumors untersucht (Anastas & Moon, 2013). Für die Entstehung von Vorläuferläsionen beziehungsweise dem PDAC sind die Signalwege als nicht ursächlich beschrieben, jedoch sind tumorfördernde Interaktionen mit anderen Signalwegen wie Notch

nicht ausgeschlossen (Morris *et al.*, 2010). Zudem wurden ebenfalls Mutationen in oben genannten Genen in ca. 30 % von PDAC-Proben identifiziert.

Aus medizinischer Sicht wird daher der Modulierung/Inhibierung der Wnt-Signaltransduktion ein hoher Nutzen in der Tumorthherapie zugesprochen, sodass z.B. molekulare Inhibitoren und inhibitorische Antikörper mit einem Einfluss auf Pankreastumorzelllinien in der Entwicklung sind (Gurney *et al.*, 2012; Arensman *et al.*, 2013).



**Abb. 3.6.2: Kanonischer Wnt-Signalweg mit beteiligten Proteinen (links) und β-Catenin unabhängige Wnt-Signalwege (rechts) (nach Anastas und Moon, 2013).** Die in hellblau unterlegten Rechtecken benannten Moleküle sind in der Entwicklung befindliche pharmakologische Substanzen zur Modulierung der Wnt-Signaltransduktion für eine Krebstherapie.

Inwieweit die SFRPs als natürliche Modulatoren als therapeutische Ziele in Frage kommen, ist nicht ausreichend geklärt und wird für verschiedene Tumorentitäten untersucht (Rubin *et al.*, 2006). Im Pankreaskarzinom ist bisher eine stark verringerte Genexpression von SFRP2 in Tumorzellen beschrieben, was auf eine Rolle des Proteins im Tumor hindeuten könnte (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001). Dies könnte mit einer epigenetischen Regulierung durch die Hypermethylierung der Promotorregion zusammenhängen, die in Gesamttumorgewebe nachgewiesen werden konnte (Bu *et al.*, 2008). Die in der quantitativen Genexpressionsanalyse gemessene Überexpression wurde anhand von immunhistochemischen Analysen zur Gewebeexpression und -lokalisierung von SFRP2 in Pankreasnormal-, CP- und -tumorgewebe verifiziert und der Grad der Promotormethylierung korrespondierender Gewebeproben, die auch in der mRNA-Expressionsanalyse eingesetzt wurden, untersucht. Zudem wurde der Einfluss einer Überexpression auf Proliferation und Apoptose von Pankreastumorzellen funktionell analysiert.

### 3.6.1 Proteinexpression von SFRP2 in Pankreastumor-, Pankreasnormalgewebe und chronischer Pankreatitis

Auf Grund der identifizierten Überexpression von SFRP2 auf mRNA-Ebene in Tumorgewebe (PaCa) und chronischer Pankreatitis (CP) wurden immunohistochemische Gewebefärbungen durchgeführt, um die Messungen auf Proteinebene zu verifizieren und die Lokalisierung der Expression zu identifizieren. Hierzu standen zum einen „Arrays“ mit 199 Tumor-, 47 CP- und 17 Normalgewebeprobe aus der NCT-Gewebebank als auch 48 zu den gemessenen Seren und RNA-Proben korrespondierende Tumor- und 23 CP-Gewebe aus dem Europäischen Pankreaszentrum zur Verfügung (siehe Kapitel 2.1.9.3).

Die Tumor-„Arrays“ beinhalteten jeweils aus dem zentralen und dem peripheren Tumorgewebe stammende Stenzen. Auch diese Proben waren mit Patientendaten dokumentiert.

Die histologischen Schnittpräparate werden auf den verwendeten Objektträgern durch adhäsive Kräfte gebunden. Somit sind sie prinzipiell anfällig gegen stärker wirkende Scherkräfte. Daher führte das angewendete Färbe- und Waschprotokoll bei einigen Proben zu einem Verlust des Gewebes durch „Abschwimmen“, die daher nicht auswertbar und als nicht vorhanden markiert wurden. Je nach Gewebezusammensetzung kam es ebenfalls zu einer Überfärbung, die eine Auswertung verhinderte. Diese Probleme betrafen je 11 Proben aus den Stenzen des zentralen und peripheren Tumorgewebes, sodass statt 398 noch 376 auswertbare Proben zur Verfügung standen (siehe Tab. 3.6.1). Die Anzahl der Proben des Metastasierungsstadiums N1M1 war sehr gering, wodurch bei der Analyse und dem Vergleich Unterschiede in wenigen Proben prozentual einen großen Einfluss haben könnten.

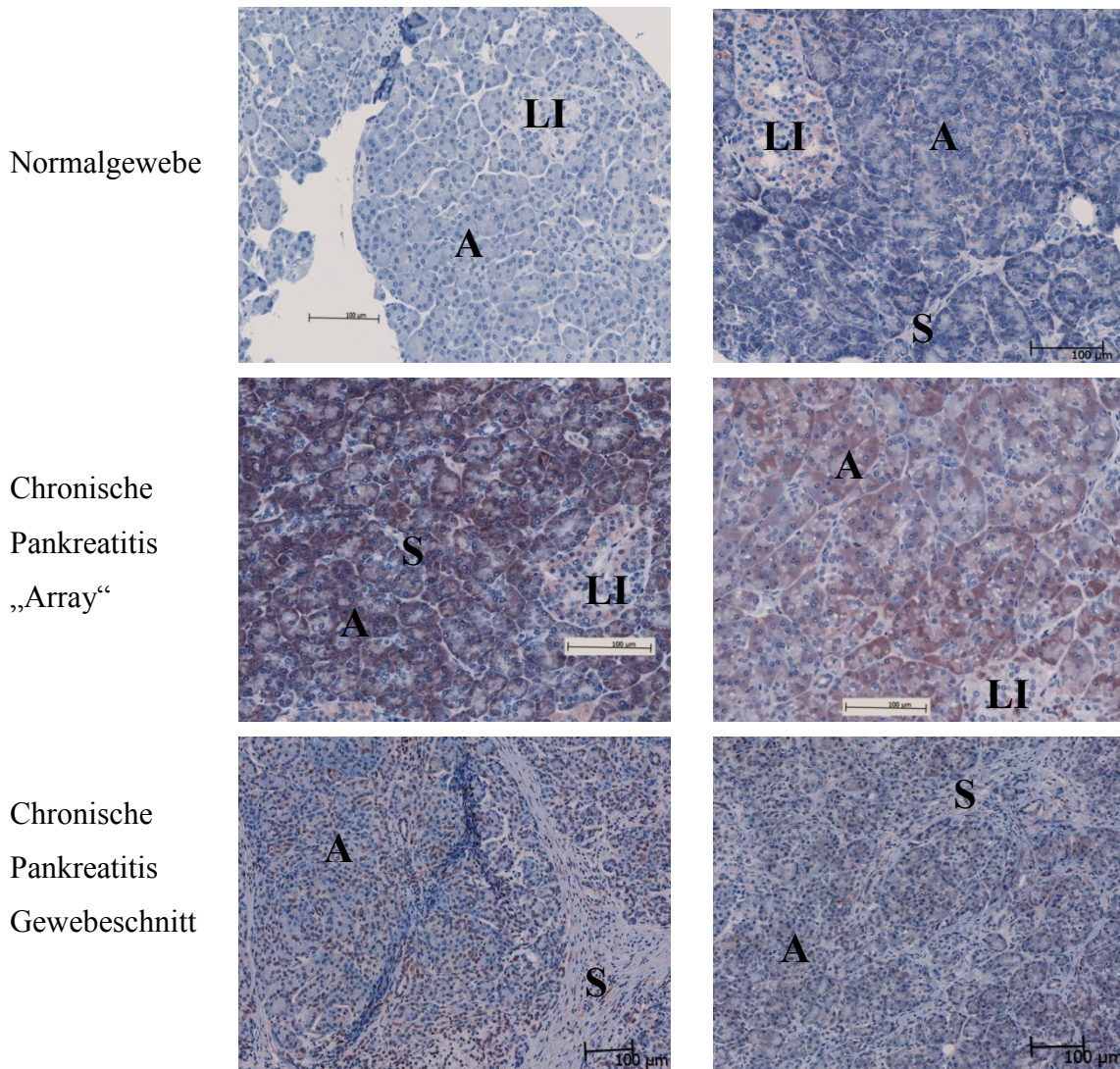
**Tab. 3.6.1: Aufteilung und für die Auswertung verwertbare Gewebefärbungen zur SFRP2-Expression der Tumorgewebe-„Arrays“.** Von initial 199 Gewebeprobe je Lokalisierung (N0M0: 28; N1M0: 161; N1M1: 10) waren nach der Färbeprozedur jeweils 188 noch vorhanden.

	Metastasierungsgrad	Zentrales Tumorgewebe	Peripheres Tumorgewebe
Pankreaskarzinom-„Arrays“	N0M0	27	26
	N1M0	151	154
	N1M1	10	8
	Summe	188	188
	Gesamt alle Proben	376	

#### 3.6.1.1 Proteinexpression von SFRP2 in Pankreasnormalgewebe und chronischer Pankreatitis

Gesundes Pankreasgewebe kann grob in die Azini, den exokrinen Funktionsteil des Pankreas, die Langerhansschen Inseln, die den endokrinen Teil bilden, und Stroma, das Bindegewebe, sekretleitende Duktien, pankreatische Sternzellen sowie Arterien und Nerven enthält, eingeteilt werden. Der Stromaanteil kann je nach Erkrankungsstadium in chronischem Pankreatitisgewebe durch Fibrose erhöht sein. Nicht alle als chronische Pankreatitis eingeordnete Proben enthielten entsprechend erkranktes Gewebe und wurden nach Beurteilung durch den Pathologen als Normalgewebe eingestuft.

Eine SFRP2-Expression konnte in Normalgewebe nicht oder nur schwach nachgewiesen werden. Exemplarische Färbungen sind in Abbildung 3.6.3 dargestellt. Schwache Signale waren sowohl in den Azini als auch vereinzelt in den Langerhansschen Inseln detektierbar. In Proben der chronischen Pankreatitis sowohl auf den Gewebe-„Arrays“ als auch den Gesamtgewebeschnitten konnte dagegen eine erhöhte Expression von SFRP2 im Gewebe beobachtet werden, die primär in den Azini vorlag. Eine leicht positive Färbung konnte teilweise in den Langerhansschen Inseln und dem Stroma gemessen werden.



**Abb. 3.6.3: Immunhistochemische Analyse der SFRP2-Expression in Normalpankreas- (obere Zeile), chronischem Pankreatitisgewebe (mittlere Zeile) in Proben auf Gewebe-„Arrays“ und chronischem Pankreatitisgewebe aus histologischen Schnittpräparaten (untere Zeilen).** Exemplarisch sind repräsentative Färbungen dargestellt, die die unterschiedliche Expressionsintensität und -lokalisierung von SFRP2 in den Proben dokumentieren. Gekennzeichnet sind Azini (A), Langerhanssche Inseln (LI) und Stroma (S). Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen anti-SFRP2-Antikörper (1:20) und einer Alkalischen Phosphatase-Detektion, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Das Material stammte aus der NCT-Gewebebank und dem Europäischen Pankreaszentrum, die Färbungen wurden am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt. („Arrays“: 20x Vergrößerung; Gewebeschnitte: 5x Vergrößerung)

Eine vollständige Analyse der SFRP2-Expression zwischen Normal- und CP-Gewebe anhand der Farbintensität in den untersuchten drei anatomischen Strukturen des Pankreas, Azini, Langerhanssche Inseln und Stroma, für einen Vergleich erfolgte bisher nur für die „Array“-Proben (siehe Tab. 3.6.2). Die Farbintensitäten wurde unter Betrachtung der gesamten Stanze bewertet (siehe Kapitel 2.4.7).

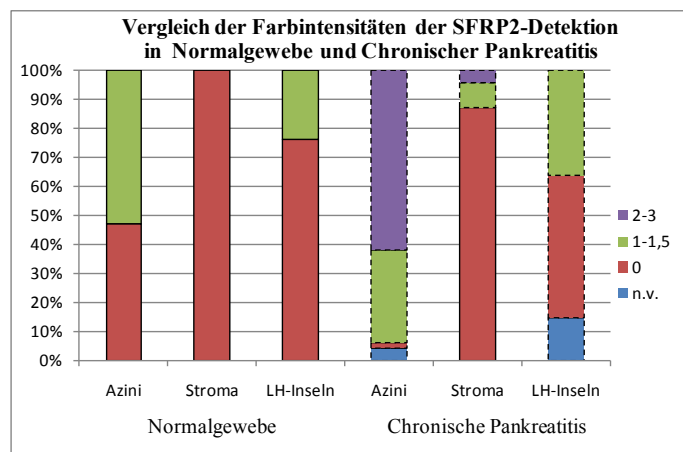
Die Färbintensitäten im Pankreasnormalgewebe waren sehr gering und meist negativ. Im Gewebe mit chronischer Pankreatitis konnten in den Azini häufiger deutliche bis starke Intensitäten beobachtet werden. Die anderen Gewebekomponenten waren auch hier meist schwach positiv oder negativ.

**Tab. 3.6.2: Analyse der Farbintensitäten zur Detektion der SFRP2-Expression in den einzelnen Komponenten des Pankreasgewebes in den „Array“-Proben von Normal- und chronischem Pankreatitis-Gewebe.** (n.v.: nicht vorhanden)

	Probengesamtzahl	Anatomische Struktur	n.v.	Davon mit Farbintensität					
				0	1	1,5	2	2,5	3
Pankreasnormalgewebe	17	Azini	0	8	9	0	0	0	0
		Langerhans Inseln	0	13	4	0	0	0	0
		Stroma	0	17	0	0	0	0	0
Chronische Pankreatitis	47	Azini	2	1	11	4	9	0	20
		Langerhans Inseln	7	23	17	0	0	0	0
		Stroma	0	41	4	0	2	0	0

Nachfolgend sind zur Vereinfachung die Intensitäten in drei Gruppen eingeteilt: 0 entspricht einer negativen Färbung, 1-1,5 einer schwachen Färbung in Einzelzellen und Gewebe, 2-3 einer deutlichen bis starken Färbung im Größteil des Gewebes.

In den Normalgeweben waren in ca. 50 % der Proben die Azini leicht positiv für SFRP2 und in den anderen 50 % negativ für das Protein (siehe Abb. 3.6.4). Die Langerhansschen Inseln konnten in ca. 25 % der Proben als leicht positiv detektiert werden. Das Stroma war in allen Proben negativ.



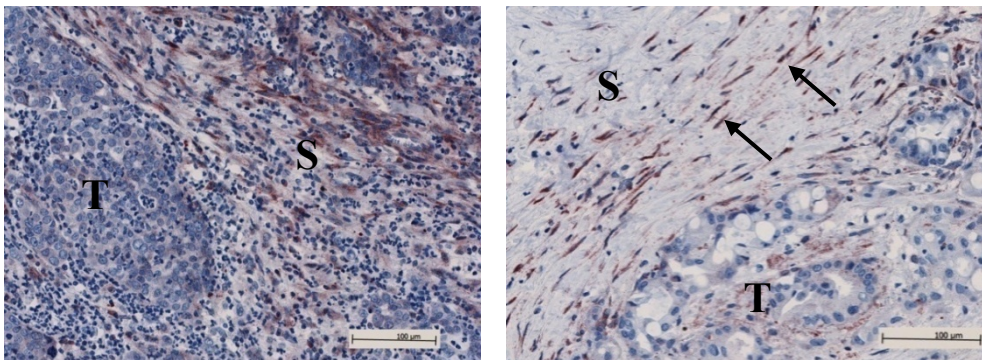
**Abb. 3.6.4: Prozentuale Verteilung der Farbintensitäten der SFRP2-Detektion in den anatomischen Strukturen des Pankreasgewebes (Azini, Stroma/Bindegewebe, Langerhanssche Inseln) in Normal- und chronischem Pankreatitisgewebe auf Gewebe-"Arrays".** Die Analyse umfasste 17 Normalgewebs- und 47 Chronische Pankreatitisproben, deren Farbintensitäten der Gewebekomponenten auf einer Skala von 0 (ungefärbt, rot im Diagramm), 1-1,5 (leichte Farbintensität, grün im Diagramm), 2-3 (mittlere bis starke Farbintensität, violett im Diagramm) bewertet und tabellarisch erfasst wurden. (n.v.: nicht vorhanden, blau im Diagramm; LH-Inseln: Langerhanssche Inseln)

Der Großteil von über 60 % der CP-Proben zeigte für SFRP2 stark positive Azini. Dies stimmte mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalyse überein, in der für CP-Gewebe eine signifikante Überexpression für SFRP2 nachgewiesen werden konnte (siehe Tab. 3.5.1). In ca. 35 % der Proben wurde eine leicht Expression von SFRP2 in den Langerhansschen Inseln nachgewiesen. Das Stroma war in ca. 15 % der Proben positiv.

### *3.6.1.2 Proteinexpression von SFRP2 in Pankreastumorgewebe*

Das pankreatische duktales Adenokarzinom ist durch einen hohen Grad an Desmoplasie des Tumors gekennzeichnet, die durch konstitutiv aktivierte pankreatische Sternzellen („pancreatic stellate cells“, PSC) gefördert wird (Apte *et al.*, 2004). Tumorzellen sind in unterschiedlichen Anteilen meist irregulär, zum Teil als duktales Strukturen vorhanden. Eine funktionelle Trennung in die drei Komponenten wie bei Normal- und CP-Gewebe war nicht mehr gegeben. Daher wurde nun zwischen Tumor und Stroma unterschieden.

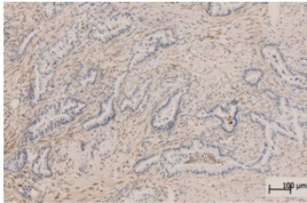
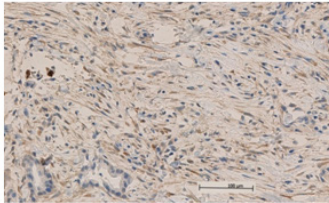
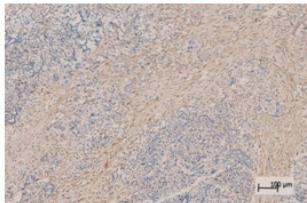
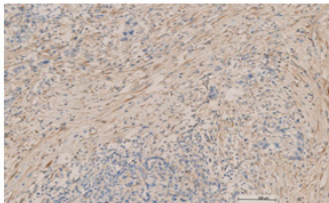
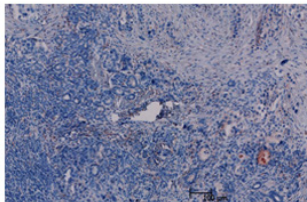
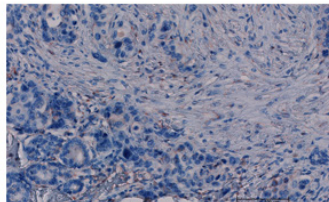
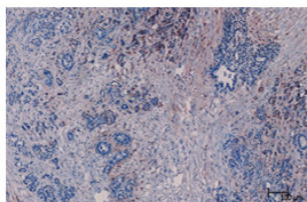
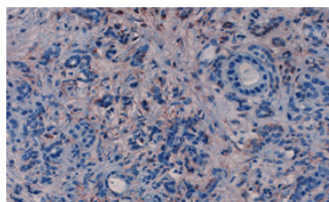
SFRP2 wurde hauptsächlich im Stroma anhand einer starken Färbung identifiziert. Als positiv stellten sich vielfach (myo-)fibroblastenähnliche Zellen heraus, die mit teils sehr intensiven Farbsignalen detektiert wurden. Die Tumorzellen waren meist negativ oder leicht gefärbt, was auf eine geringe SFRP2-Expression hindeutete. Exemplarische Färbungen von Tumor-„Arrays“ sind in Abbildung 3.6.5 dargestellt.



**Abb. 3.6.5: Immunhistochemische Analyse der SFRP2-Expression im Pankreaskarzinomgewebe in Proben auf Tumor-„Arrays“.** Exemplarisch sind repräsentative Färbungen dargestellt, die die unterschiedliche Expressionslokalisierung von SFRP2 im Tumor dokumentieren (20x Vergrößerung). Gekennzeichnet sind Tumorgewebe (T) und Stroma (S). Pfeile markieren (myo-)fibroblastenähnliche Zellen, bei denen es sich um Sternzellen (PSC) handeln könnte. In der linken Abbildung des PaCa-Gewebes ist eine hohe Anzahl an infiltrierenden Immunzellen zu erkennen. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen anti-SFRP2-Antikörper (1:20) und einer Alkalischen Phosphatase-Detektion, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Das Material stammte aus der NCT-Gewebebank, die Färbungen wurden am Pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt.

Da die Gewebestanzten auf den Gewebe-„Arrays“ nur einen kleinen Ausschnitt des Originalgewebes wiedergeben, wurde die SFRP2-Detektion auf Gesamtgewebeschnitten wiederholt. Auch hier zeigte

sich, dass die Tumorzellen im Gewebe häufig keine oder nur eine geringe Färbung für SFRP2 aufwiesen, während das Stroma größtenteils leicht bis stark angefärbt war. Exemplarisch sind in Abbildung 3.6.6 auf SFRP2-Expression gefärbte Kryo- und FFPE-Gewebeschnitte dargestellt, deren Transkripte zum Teil auch in der mRNA-Expressionsanalyse untersucht wurden. Die dort gemessenen Werte der hohen Expression konnten auf Proteinebene bestätigt werden.

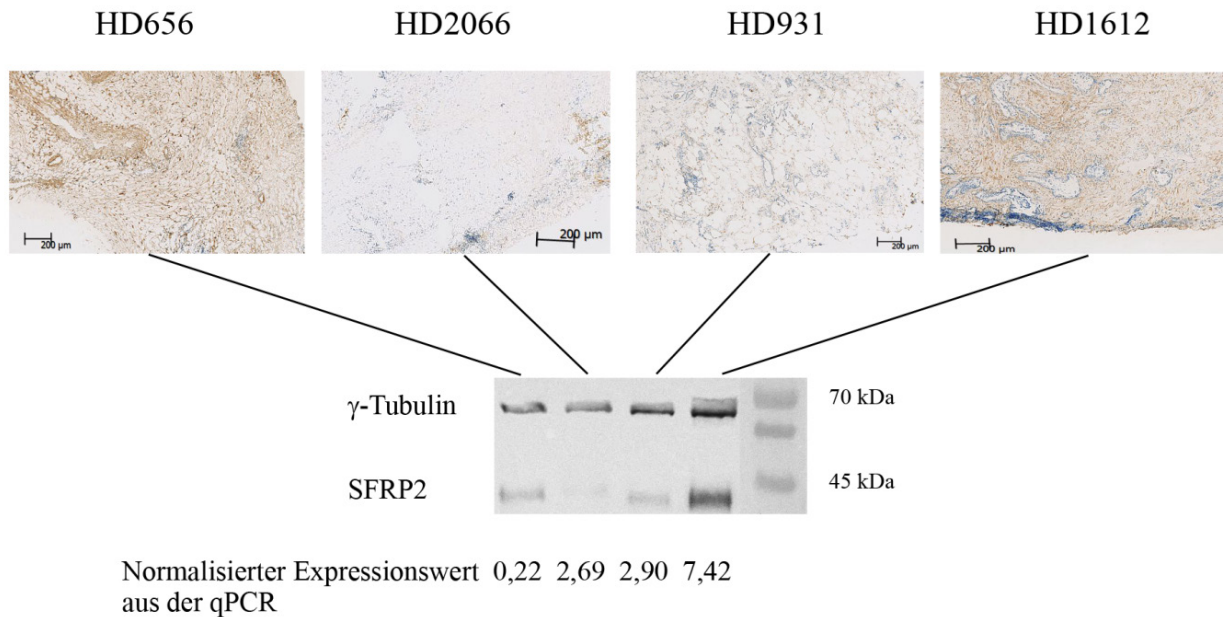
	5x vergrößert	20x vergrößert	norm. Expression aus der qPCR
HD946 (N0M0, Kryo)			4,04
HD987 (N1M0, Kryo)			3,88
HD333 (N0M0, FFPE)			1,77
HD476 (N1M0, FFPE)			---

**Abb. 3.6.6: Immunhistochemischer Nachweis der SFRP2-Expression in Pankreskarzinomgewebeschnitten aus Kryo- und Formalin fixiertem Paraffin eingebettetem Gewebe.** Exemplarisch sind Färbungen jeweils zweier Kryoproben (HD946 N0M0-Tumor, HD987 N1M0-Tumor) und zweier FFPE-Proben (HD333 N0M0-Tumor, HD476 N1M0-Tumor) in der Übersicht (links, 5x Vergrößerung) und vergrößert (rechts, 20x Vergrößerung) dargestellt. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen anti-SFRP2-Antikörper (Cryo: 1:5000; FFPE: 1:20) und einer Peroxidase- beziehungsweise Alkalischen Phosphatase-Detektion, Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Von vier Kryogewebeproben, den N0M0-Proben HD656 und HD2066, der N1M0-Probe HD931 und der N1M1-Probe HD1612, wurden serielle Schnitte hergestellt, von denen einige für immunhistochemische Färbungen und ein weiterer Teil zur Gewinnung von Gewebelysaten für Immunblots verwendet wurde (siehe Kapitel 2.3.2).

Die Immunblots konnten SFRP2 in den Gewebelysaten in unterschiedlichen Mengen nachweisen (siehe Abb 3.6.7). Die Intensität der Detektionsbande spiegelte die Farbtintensität der immunhistochemischen

Analysen wider. Die in der qPCR gemessene Expression war zwischen den Proben nur zum Teil vergleichbar.



**Abb. 3.6.7: Immunhistochemischer und Immunblot-Nachweis der SFRP2-Expression in Pankreskarzinomgewebeschnitten aus Cryogewebe und Vergleich mit den jeweiligen normalisierten Expressionswerten der qPCR.** Färbungen von vier Proben (N0M0-Proben HD656 und HD2066, N1M0-Probe HD931 und N1M1-Probe HD1612, 5x Vergrößerung) sind im Vergleich zum dazugehörigen Immunblot mit Gewebelysaten aus seriellen Schnitten dargestellt. Die Färbung erfolgte mit einem monoklonalen anti-SFRP2-Antikörper (1:5000) und einer Peroxidase-Detektion, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Die Immunblotdetektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-SFRP2-Antikörper (1:200) und einem monoklonalen anti-gamma-Tubulin-Antikörper als Ladekontrolle (1:1000).

Die Auswertung der Tumor-„Arrays“ erfolgte analog dem Verfahren der Gewebe-„Arrays“ hinsichtlich der Bewertung der Farbtintensitäten (siehe Kapitel 2.4.7 und 3.6.1.1). Die Beurteilung der Arrays wurde als Gesamtwert aller Proben und aufgetrennt in zentrales und peripheres Tumorgewebe für Tumorzellen und das Stroma durchgeführt (siehe Tab. 3.6.3).

Tumorzellen im Pankreasgewebe der „Arrays“ lagen von ihren Färbeintensitäten meist in den Kategorien 0, demnach negativ, oder 1, schwach positiv. Die Zahl stärkerer Intensitäten nahm mit höherer Kategorie ab, sodass keine Probe Tumorzellen mit sehr starker Färbung enthielt. Das Stroma hingegen war hauptsächlich positiv, wobei tendentiell stärkere Intensitäten überwogen.

Auch hier sind zur Vereinfachung die Intensitäten in drei Gruppen zusammengefasst: 0 entspricht einer negativen Färbung, 1-1,5 einer schwachen Färbung in Einzelzellen und Gewebe, 2-3 einer deutlichen bis starken Färbung im Großteil des Gewebes.

Im Durchschnitt waren ca. 30 % der Tumorgewebe negativ für SFRP2 und ca. 50 % leicht positiv anhand der beobachteten Farbtintensität (siehe Abb. 3.6.8). Weniger als 10 % der Proben zeigten eine starke Färbung im Tumorgewebe. Im Stroma konnte jedoch für 60 - 70 % der Proben eine starke Farbtintensität detektiert werden, was auf eine hohe SFRP2-Expression deutete. Weitere ca. 30 % der

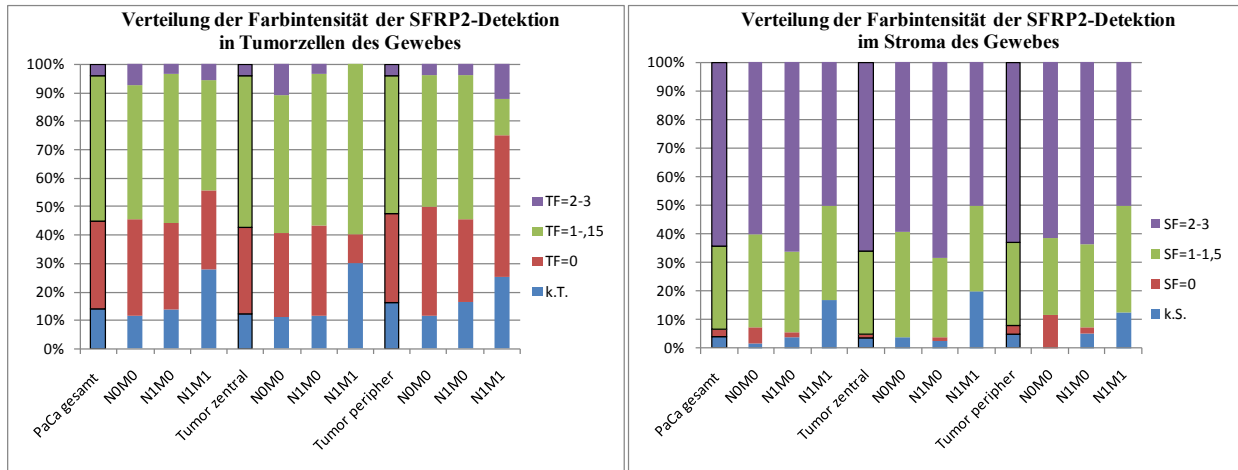


Proben waren noch leicht positiv, sodass mehr als 90 % der Proben positiv für SFRP2 im Stroma der Tumorproben waren.

**Tab. 3.6.3: Analyse der Farbintensitäten zur Detektion der SFRP2-Expression in Tumorzellen und dem Stroma in den Tumor-„Arrays“.** (PaCa: Pankreaskarzinom; n.v.: nicht vorhanden)

	Probengesamtzahl	Anatomische Struktur	n.v.	Davon mit Farbintensität					
				0	1	1,5	2	2,5	3
PaCa gesamt	376	Tumorzellen	53	116	147	44	13	3	0
		Stroma	16	9	51	58	70	92	80
PaCa gesamt N0M0	53	Tumorzellen	6	18	20	5	3	1	0
		Stroma	1	3	5	12	4	10	18
PaCa gesamt N1M0	305	Tumorzellen	42	93	127	39	10	2	0
		Stroma	12	5	43	43	63	80	58
PaCa gesamt N1M1	18	Tumorzellen	5	5	7	0	1	0	0
		Stroma	3	0	3	3	3	2	4
PaCa zentral	188	Tumorzellen	23	57	80	20	6	2	0
		Stroma	7	2	24	31	38	47	39
PaCa zentral N0M0	27	Tumorzellen	3	8	10	3	2	1	0
		Stroma	1	2	1	9	1	5	10
PaCa zentral N1M0	151	Tumorzellen	17	48	70	17	4	1	0
		Stroma	4	2	23	20	36	41	26
PaCa zentral N1M1	10	Tumorzellen	3	1	6	0	0	0	0
		Stroma	2	0	1	2	1	1	3
PaCa peripher	188	Tumorzellen	30	59	67	24	7	1	20
		Stroma	9	6	27	27	32	45	41
PaCa peripher N0M0	26	Tumorzellen	3	10	10	2	1	0	0
		Stroma	0	3	4	3	3	5	8
PaCa peripher N1M0	154	Tumorzellen	25	45	57	22	6	1	0
		Stroma	8	3	21	23	27	39	32
PaCa peripher N1M1	9	Tumorzellen	2	4	1	0	1	0	0
		Stroma	1	0	2	1	2	1	1

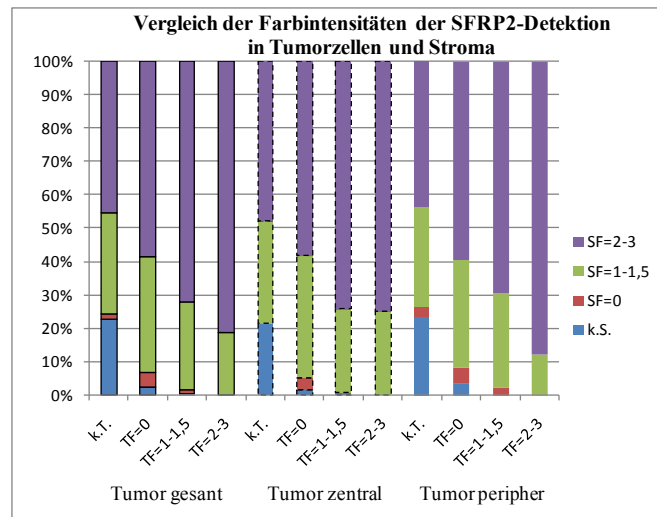
Die SFRP2-Expression war zwischen den Lokalisationen und den Metastasierungsgraden jeweils für das Tumorgewebe und das Stroma nahezu identisch. Da die Anzahl der N1M1-Proben sehr gering war, konnten die Ergebnisse nicht als repräsentativ eingeordnet werden. Zwischen Tumor und Stroma unterschied sich die SFRP2-Expression jedoch deutlich, wie anhand der Farbintensitäten zu beobachten war. Die in Abbildung 3.6.8 dargestellten Expressionsverteilungen ließen eine Beurteilung der SFRP2-Expression im Tumor und Stroma je nach Lokalisierung der Probe und des Metastasierungsstadiums zu. Eine Zusammenstellung über die SFRP2-Expressionsgrade von Tumorzellen zum Stroma jeweils derselben Proben ist in Abbildung 3.6.9 aufgezeigt.



**Abb. 3.6.8: Prozentuale Verteilung der Farbintensitäten der SFRP2-Detektion in Tumorzellen (links) und im Stroma (rechts) von Pankreaskarzinomgewebe auf Tumorgewebe-"Arrays".** Die Analyse umfasste 376 Tumorgewebeproben, aufgeteilt in je 188 Proben von zentralem sowie peripherem Tumorgewebe meist desselben Resektates, deren Farbintensitäten der beiden Gewebekomponenten auf einer Skala von 0 (ungefärbt, rot im Diagramm), 1-1,5 (leichte Farbintensität, grün im Diagramm), 2-3 (mittlere bis starke Farbintensität, violett im Diagramm) bewertet und tabellarisch erfasst wurden. Gesamtergebnisse sind durch schwarz umrandete Säulen gekennzeichnet, Daten der drei einzelnen Metastasierungsgrade rechts folgend. (k.T.: kein Tumorgewebe/keine Tumorzellen vorhanden, blau im Diagramm; k.S.: kein Stroma vorhanden, blau im Diagramm)

Lagen lokal in der Gewebestanze keine Tumorzellen vor, so war das Stroma derselben Probe in ca. 45 - 50 % der Fälle stark und in weiteren 30 % schwach gefärbt. Bei 20 % der Proben war beim Fehlen von Tumorzellen ebenfalls kein Stroma vorhanden, was auf Fettgewebe oder Fehlstanzen zurückzuführen war. Konnten Tumorzellen im Gewebeausschnitt der Stanze identifiziert werden, so stieg mit deren SFRP2-Intensität auch der Anteil an stark positivem Stroma in derselben Probe. Bei ungefärbten Tumorzellen lag der Anteil an stark positivem Stroma bei ca. 60 %, erhöhte sich auf ca. 70 % bei leicht positiv gefärbten Tumorzellen und war mit 80 % bei ebenfalls stark positiv gefärbten Tumorzellen am höchsten. Je nach Existenz und dem Grad der SFRP2-Expression der Tumorzellen erhöhte sich somit der Anteil des stark SFRP2-positiven Stroma. Die Lokalisation des ausgestanzten Gewebes hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis.

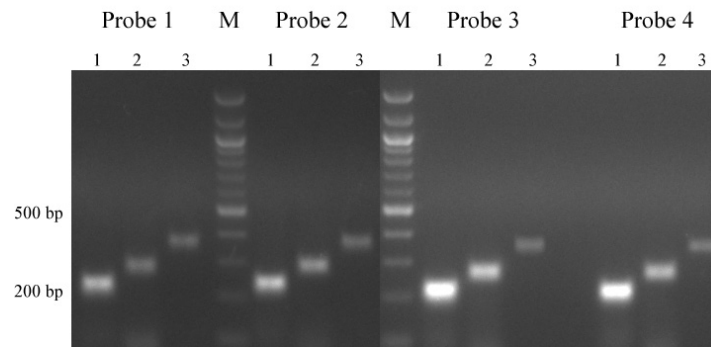
Die Überexpression von SFRP2 in CP- und Tumorgewebe konnte auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie auf Gewebe-„Arrays“ und in Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Während in CP-Gewebe primär die Azini positiv für SFRP2 waren, konnte im Tumorgewebe das Stroma mit einer starken Farbintensität beobachtet werden. Die erhaltenen Expressionsdaten der „Array“-Analysen wurden mit klinischen Daten in Kapitel 3.7 analysiert.



**Abb. 3.6.9: SFRP2-Expression in Tumorzellen und im Stroma derselben Probe in Pankreaskarzinomgewebe auf Tumorgewebe-"Arrays".** Die korrespondierenden Farbintensitätsdaten aus Tumor und Stroma der untersuchten Proben sind als Gesamtdaten und entsprechend der Gewebeprobeherkunft nach der Intensität der SFRP2-Färbung in den Tumorzellen aufgetragen. Die Skala reichte von 0 (ungefärbt, rot im Diagramm) über 1-1,5 (leichte Farbintensität, grün im Diagramm) bis 2-3 (mittlere bis starke Farbintensität, violett im Diagramm). Gesamtergebnisse sind durch schwarz umrandete Säulen, zentrale Tumorproben durch unterbrochene Umrandung und periphere Tumorproben durch keine Umrandung gekennzeichnet.. (k.T.: kein Tumorgewebe/keine Tumorzellen vorhanden; k.S.: kein Stroma vorhanden, blau im Diagramm)

### 3.6.2 Pankreatische Sternzellen ("*pancreatic stellate cells*") als mögliche Quelle der SFRP2-Expression im Tumorstroma

Die Analyse der Gewebeschnitte auf die SFRP2-Expression identifizierte das Stroma des Tumors als primäre Quelle des Proteins. Die Hauptpopulation der das Stroma bildenden Zellen stellen Fibroblasten und pankreatische Sternzellen dar ("*pancreatic stellate cells*", PSC), die im Tumor aktiviert sind, mit den Tumorzellen interagieren und ein spezifisches Mikromillieu generieren (Apte *et al.*, 2004; Erkan *et al.*, 2012). PSC können als ruhende Zellen aus Pankreasgewebe isoliert werden, aktivieren sich nach kurzer Dauer der Kultivierung jedoch eigenständig. Aktivierte Sternzellen wurden aus dem Europäischen Pankreaszentrum der Universitätsklinik Heidelberg für die Analysen zur Verfügung gestellt. Auf Transkriptebene ließ sich eine SFRP2-Expression in aus vier unterschiedlichen Spendergeweben isolierten PSC nachweisen (siehe Abb. 3.6.10). Die Expression war in allen vier Proben ähnlich und im Vergleich zu der Expression der Kontrollgene geringer.



**Abb. 3.6.10: Nachweis der *SFRP2*-Expression auf Transkriptebene in pankreatischen Sternzellen mittels PCR und anschließender gelelektrophoretischer Trennung.** Das *SFRP2*-Amplifikat (jeweils Spur 3, ca. 370 bp) ist gegen Amplifikate zweier Kontrollgene,  $\beta$ -Aktin (jeweils Spur 1, ca. 220 bp) und *Cyclophilin B* (jeweils Spur 2, ca. 270 bp), derselben Probe aufgetragen. Die Amplifizierung erfolgte mit cDNA von Sternzellen, die aus vier unterschiedlichen Pankreasgewebeproben (Proben 1-4) isoliert und kultiviert wurden, als Vorlage. Die elektrophoretische Trennung fand in einem 1,5 %-igen Agarosegel bei 5 V/cm statt. Das Material stellte die AG Giese (EPZ, Heidelberg) zur Verfügung. M: 100 bp DNA-Marker

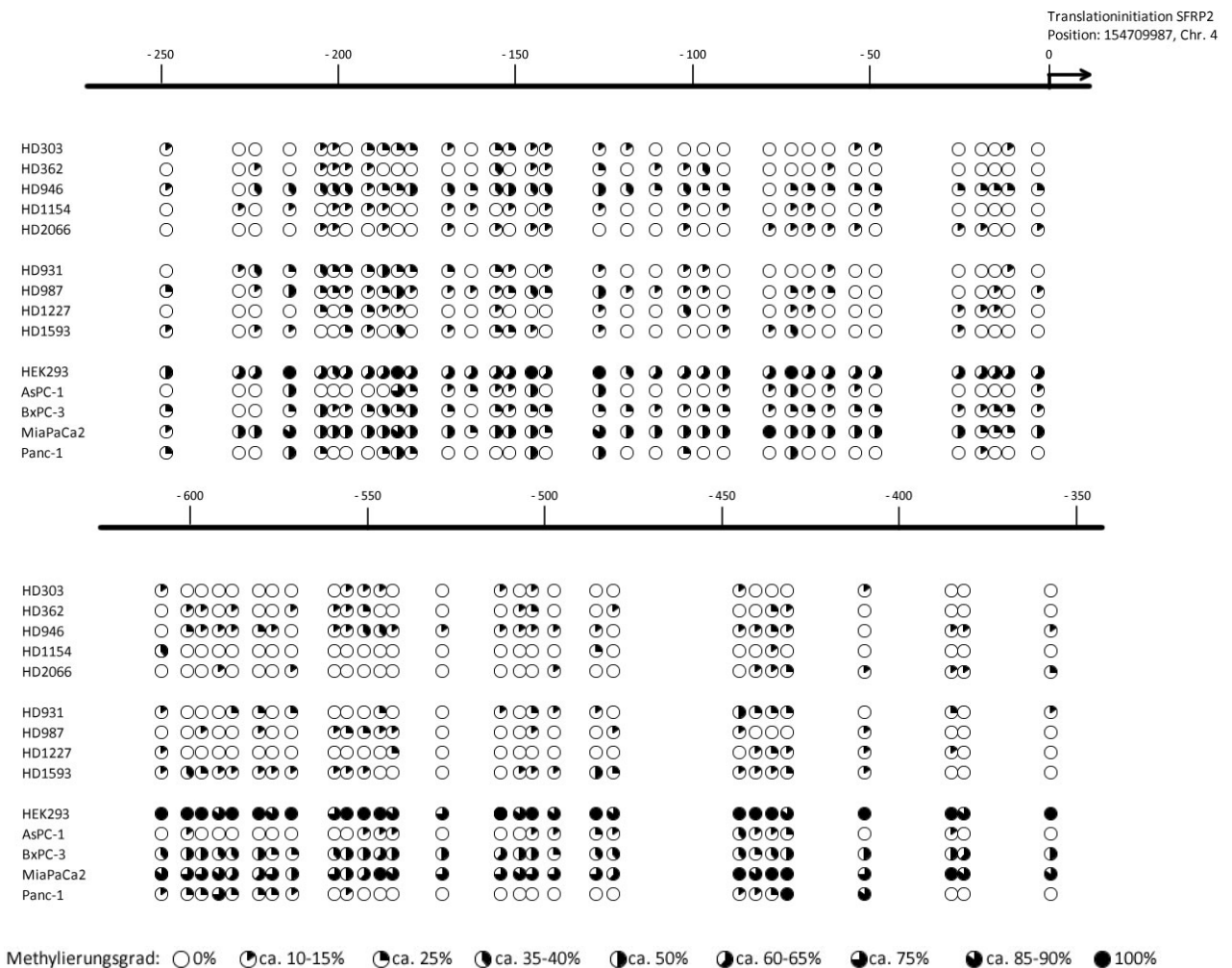
### 3.6.3 Analyse der epigenetischen Regulierung der Expression von *SFRP2*

Das Secreted Frizzled-related Protein 2 ist hinsichtlich seiner Expression und des Einflusses epigenetischer Regulationsmechanismen, primär der Promotormethylierung in CpG-Inseln, in Geweben beziehungsweise Zelllinien unterschiedlicher Tumorentitäten gut untersucht (u.a. Liu *et al*, 2006; Takagi *et al*, 2008; Suzuki *et al*, 2008). Die Studien stellten hauptsächlich eine Hypermethylierung des Promotors und damit eine stark verringerte Expression von *SFRP2* fest.

Die beobachtete Überexpression auf Transkriptebene und die stark positive Färbung des Stromas in den Pankreaskarzinomproben warfen die Frage auf, ob dies mit einer epigenetischen Regulierung der *SFRP2*-Expression korreliert. Die Analyse umfasste die Sequenzierung des *SFRP2*-Promotorbereiches von Natriumbisulfit behandelte genomischer DNA aus neun Pankreaskarzinomgewebeproben, vier Pankreaskarzinomzelllinien (AsPC-1, BxPC-3, MiaPaCa-2 und Panc1) und als Vergleichszelllinie HEK293 zur Identifizierung methylierter Cytosine. Mindestens acht Klone jeder Probe wurden sequenziert, um eine ausreichende Abdeckung je Position zu erreichen.

Die Methylierung beider untersuchter CpG-Inseln in den Pankreaskarzinomproben war gering (siehe Abb. 3.6.11). Viele Cytosine lagen vollständig unmethyliert, dargestellt durch weiße Kreise, oder nur minimal methyliert vor, was sich in maximal 25 % methylierter Cytosine an einer Position widerspiegelte. Dies galt vor allem für den Promotorbereich -600 bp bis -350 bp strangaufwärts vom Startcodon. Der Grad der Methylierung einzelner Klone bestätigte dies, da der Großteil von ihnen zwischen 0 bis zu 30 % methylierter Cytosine aufwies (siehe Tab. 3.6.4). Kein Klon der Proben war zu 100 % methyliert, die maximale Methylierung aller Cytosine eines Klons lag bei ca. 90 % der Positionen. Die durchschnittliche Methylierung der Proben im Promotorbereich lag bei 2,6 bis 13,8 % mit einem Median von 7,2 % und im Translationsinitiationsbereich bei 5,7 bis 29 % mit einem Median von 7,9 %, also äußerst niedrigen Werten.

## ERGEBNISSE: CHARAKTERISIERUNG VON SFRP2



**Abb. 3.6.11: Methylierungsmuster der Cytosine in zwei CpG-Inseln (-600 bp bis -350 bp [Promotor, unten] und -250 bp bis 0 bp [Translationsinitiation, oben] 5' Strang aufwärts vom Startcodon) der Promotorregion von *SFRP2* in neun Pankreaskarzinomproben, vier Pankreaskarzinomzelllinien und HEK293 als Kontrollzelllinie.** In der Promotorregion lagen 28 CpG-Nukleotide und in der Translationsinitiationsregion 34 CpG-Nukleotide vor, dargestellt durch entsprechende Kreise, deren Methylierungsgrad durch Sequenzierung von mindestens acht klonierten Amplifikaten aus Bisulfit modifizierter genomischer DNA bestimmt wurde. Der Grad der schwarzen Kreisfüllung kennzeichnet die Häufigkeit methylierter Cytosine an der jeweiligen Position. Die DNA des Patientenmaterials wurde aus Kryogewebe isoliert. Die Oligomere zur Amplifizierung beider Bereiche entstammen von Kawamoto *et al.* (2008).

Zwischen der Methylierung einer Probe und der in der qPCR gemessenen *SFRP2*-Expression konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. So lag z.B. der normalisierte Expressionswert der durchschnittlich am stärksten methylierten Probe HD946 ähnlich dem der Probe HD362, die eine deutlich geringere durchschnittliche Methylierung aufwies, und war um den Faktor 3 im Vergleich zur Probe HD303 erhöht, die eine vergleichbare Methylierung wie Probe HD362 besaß.

Die Tumorzelllinien variierten in der Methylierung der Cytosine in beiden CpG-Inseln (siehe Abb. 3.6.11). Die Tumorzelllinie MiaPaCa-2 besaß den höchsten Methylierungsgrad mit bis zu 50 - 100 % methylierten Positionen in allen Klonen. BxPC-3-Zellen wiesen ebenfalls eine hohe Methylierung auf, die zwischen 25 - 66 % je Position lag, jedoch in keinem Fall an einer Position vollständig war. Für die

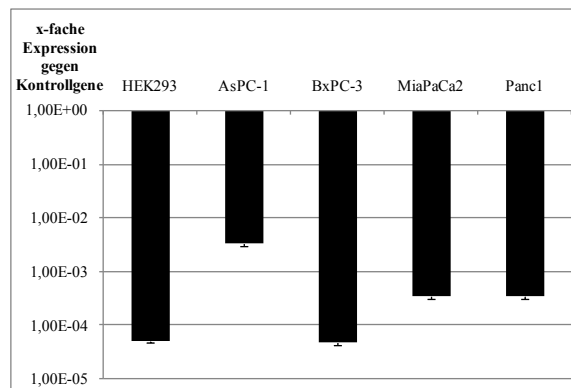
Zelllinien AsPC-1 und Panc-1 konnten etwa die Hälfte der Cytosinpositionen als unmethyliert identifiziert werden. Die Cytosine der beiden Inseln in HEK293-Zellen waren in mindestens der Hälfte der Klone methyliert, im Promotorbereich teilweise in mehr als 80 % der Klone.

**Tab. 3.6.4: Vergleich des Methylierungsgrades der zwei CpG-Inseln als Durchschnitt und als Streuung der Einzelklone je Probe in den neun untersuchten Pankreaskarzinomproben.** Die prozentualen Verhältnisse wurden anhand der Zahl vorhandener methylierter Positionen gegen die maximal mögliche Anzahl der Methylierungsstellen bestimmt. Im Vergleich sind die gegen die Kontrollgene normalisierten Messwerte zur *SFRP2*-Expression aus der quantitativen PCR eingetragen.

Probe	Grad der Methylierung einzelner Proben	Durchschnittliche Methylierung aller Proben	Expressionswert aus qPCR
HD303 Translationinitiation	0 - 29%	8,5%	1,257
HD303 Promotor	0 - 14%	3,5%	
HD362 Translationinitiation	0 - 24%	6,0%	3,357
HD362 Promotor	0 - 21%	6,2%	
HD931 Translationinitiation	3 - 29%	12,9%	2,897
HD931 Promotor	0 - 36%	12,1%	
HD946 Translationinitiation	0 - 88%	29,0%	4,036
HD946 Promotor	0 - 82%	13,8%	
HD987 Translationinitiation	0 - 65%	16,8%	3,882
HD987 Promotor	0 - 18%	5,0%	
HD1154 Translationinitiation	0 - 12%	5,7%	1,274
HD1154 Promotor	0 - 7%	2,6%	
HD1227 Translationinitiation	0 - 18%	7,1%	8,301
HD1227 Promotor	0 - 11%	3,6%	
HD1593 Translationinitiation	0 - 21%	7,9%	---
HD1593 Promotor	0 - 61%	12,9%	
HD2066 Translationinitiation	0 - 21%	4,9%	2,690
HD2066 Promotor	0 - 14%	4,7%	

Die Expression von *SFRP2* auf Transkriptebene in den Zelllinien wurde mittels quantitativer PCR untersucht. Nach der Normalisierung lagen die Expressionsniveaus bei ca.  $5 \times 10^{-3}$  für AsPC-1-Zellen und ca.  $3 \times 10^{-5}$  bis  $5 \times 10^{-4}$  in allen anderen Zelllinien, was einer sehr geringen Expression entsprach (siehe Abb. 3.6.12).

Die gering methylierte AsPC-1-Zelllinie wies somit den höchsten Expressionswert auf, während die Expressionsunterschiede bei den anderen Zelllinien trotz unterschiedlicher Methylierungsmuster auf einem ähnlichen Niveau lagen. Eine leichte Tendenz war somit hinsichtlich des Methylierungsgrades und dem Expressionswert einer Zelllinie zu beobachten, wobei der Effekt gering war.



**Abb. 3.6.12: Expression von *SFRP2* auf Transkriptionsebene in den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, BxPC-3, MiaPaCa-2 und Panc1 sowie der Kontrollzelllinie HEK293.** Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Gene *β-Aktin*, *HPRT* und *Cyclophilin B* dienten zur Normalisierung in der Expressionsanalyse. Die Expression ist logarithmisch aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte aus drei unabhängigen Experimenten an.

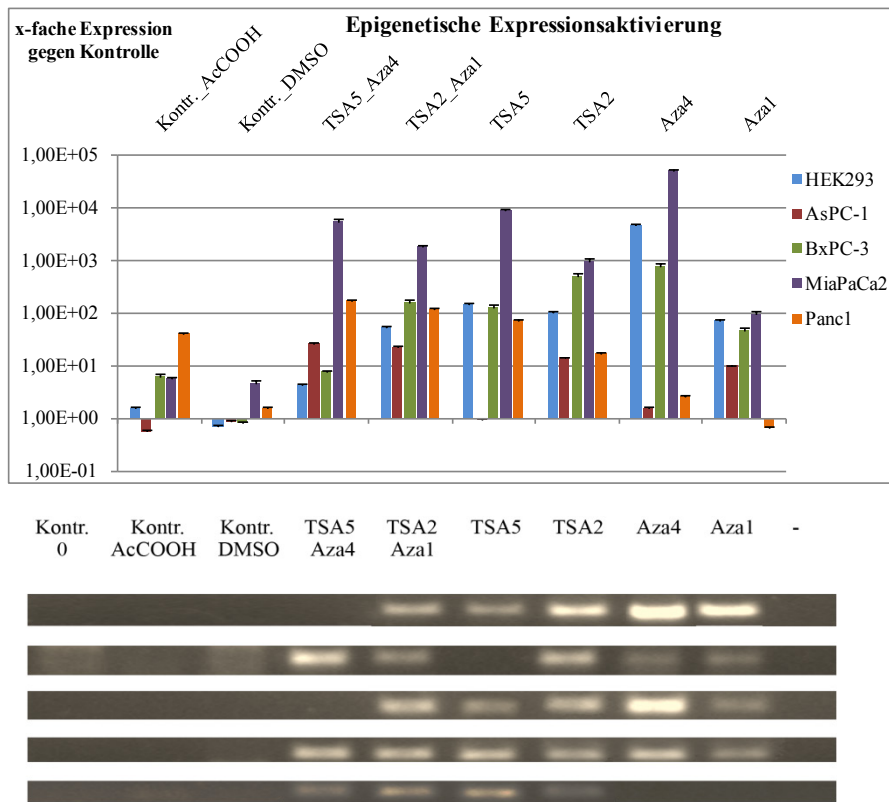
### 3.6.3.1 Reaktivierung der *SFRP2*-Expression in Pankreaskarzinomzellen mittels 5-Azacytidin und Trichostatin A

Um den Einfluss der Methylierung auf die Expressionsregulierung des *SFRP2* zu überprüfen, wurden die Zellen mit dem Demethylierungsmittel 5-Azacytidin (Aza) mit einer Konzentration von 4 beziehungsweise 1  $\mu\text{M}$  im Medium kultiviert (siehe Kapitel 2.4.3). Aza wird als Cytidinanalogon während der Replikation und Transkription in die Nukleinsäure eingebaut. Durch den Austausch des Kohlenstoffatoms gegen ein Stickstoffatom an der fünften Position des Pyrimidinringes werden DNA-Methyltransferasen (DNMT) im aktiven Zentrum gehemmt und es kommt zu keiner enzymatischen Reaktion. Dies führt zu einer Verringerung des Methylierungsgrades in CpG-Inseln (Creusot *et al.*, 1982). Zusätzlich wurde separat oder in Kombination das Antibiotikum Trichostatin A (TSA), das Histondeacetylasen (HDAC) der Klassen I und II hemmt, dem Medium in einer Konzentration von 0,5 beziehungsweise 0,2  $\mu\text{M}$  beigefügt. Die Hemmung bewirkt den Verbleib der Histone in einer acetylierten Form, wodurch elektrostatische Kräfte zur DNA minimiert werden und damit auf Grund einer offeneren Konformation zu einer leichteren Zugänglichkeit für interagierende Proteine und Komplexe führen (Yoshida *et al.*, 1990).

Beide Substanzen, einzeln oder in Kombination, wirkten unterschiedlich bei der Reaktivierung der Expression auf Transkriptionsebene in den untersuchten Zelllinien (siehe Abb. 3.6.13).

Die Zelllinie AsPC-1 zeigte mit beiden Konzentrationen der Substanzkombination die höchste Aktivierung um einen Faktor von ca. 30 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. 1  $\mu\text{M}$  Aza sowie 0,2  $\mu\text{M}$  TSA aktivierten die Expression jeweils um den Faktor 10 beziehungsweise 13. Hohe Konzentrationen der Einzelsubstanzen blieben dagegen ohne Wirkung.

BxPC-3-Zellen ließen sich in ihrer *SFRP2*-Expression mit den geringeren Konzentrationen von Aza beziehungsweise TSA mit Faktoren von  $5 \times 10^1$  beziehungsweise  $5 \times 10^2$  aktivieren. Eine Kultivierung mit 4  $\mu\text{M}$  Aza führte zur stärksten Aktivierung mit einem Faktor von  $1 \times 10^3$ .



**Abb. 3.6.13: Expressionsänderung von *SFRP2* auf Transkriptebene durch epigenetische Reaktivierung mittels 5-Azacytidin (Aza) und/oder Trichostatin A (TSA) in den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 (rot), BxPC-3 (grün), MiaPaCa-2 (violett) und Panc1 (orange) sowie der Kontrollzelllinie HEK293 (blau) im Vergleich (oben) und korrespondierende PCR-Amplifikate nach gelelektrophoretischer Trennung (unten).** Die eingesetzten Konzentrationen lagen bei Aza, gelöst in Wasser:Essigsäure (AcCOOH) (1:1), bei 4  $\mu\text{M}$  (Aza4) und 1  $\mu\text{M}$  (Aza1) und bei TSA, gelöst in DMSO, bei 0,5  $\mu\text{M}$  (TSA5) und 0,2  $\mu\text{M}$  (TSA2). Die Substanzen wurden dem Medium einzeln oder als Kombination der hohen und niedrigen Konzentrationen hinzugesetzt, ebenso die jeweiligen Lösungsmittel als Kontrolle. Die Zellen erhielten 24 h (Aza) beziehungsweise 48 h (TSA) (0-Zeitpunkt) nach Aussaat neues mit den Substanzen versetztes Medium, das jede 24 h erneuert wurde. Zelllinien wurden insgesamt 72 h (Aza) beziehungsweise 48 h (TSA) mit den Substanzen inkubiert. In der Kombination erfolgte zuerst eine 48-stündige Inkubation mit Aza, anschließend weitere 24 h mit TSA. Die Gene  $\beta$ -Aktin, *HPRT* und *Cyclophilin B* dienten zur Normalisierung. Die Expressionsänderung zur unbehandelten Kontrolle ist logarithmisch aufgetragen. (Kontr.: Kontrolle)

Die *SFRP2*-Expression konnte in der Zelllinie MiaPaCa-2 mit beiden Substanzen, einzeln und in Kombination, in beiden Konzentration am stärksten gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit Faktoren von  $10^2$  (Aza 1  $\mu\text{M}$ ) bis ca.  $5 \times 10^4$  (Aza 4  $\mu\text{M}$ ) aktiviert werden. Höhere Konzentrationen der Substanzen führten zu einer stärkeren Aktivierung. Die Kombination von Aza und TSA brachte nur in der geringeren Konzentration einen minimal synergistischen Effekt gegenüber den Einzelsubstanzen mit einem Faktor von  $2 \times 10^3$  im Vergleich zu  $1 \times 10^2$  beziehungsweise  $1 \times 10^3$ .

Panc1-Zellen konnten mit der Aza/TSA-Kombination in beiden Konzentrationen vergleichbar um ca. den Faktor 120-130 in der *SFRP2*-Expression aktiviert werden. TSA mit 0,5  $\mu\text{M}$  beziehungsweise 0,2  $\mu\text{M}$  zeigte einen geringeren Effekt mit einer Expressionserhöhung um den Faktor 70 beziehungsweise



20. Aza hatte keinen Effekt auf die *SFRP2*-Expression. Auffällig war die bereits im Kontrollansatz mit dem Lösemittel Essigsäure um den Faktor 40 zu beobachtende Expressionserhöhung, die damit höher lag als bei Aza, das in diesem Essigsäuregemisch gelöst war.

HEK293 als Nichttumorzelllinie, die einen ähnlichen Methylierungsgrad wie die MiaPaCa-2-Zellen aufwies, ließ sich wie diese durch 4  $\mu\text{M}$  Aza in der *SFRP2*-Expression um den Faktor  $5 \times 10^3$  am stärksten aktivieren. Bei geringer Konzentration lag die Aktivierung nur noch um den Faktor 50. Beide TSA-Konzentrationen führten zu einer ähnlichen Aktivierung um den Faktor 100. Die Kombination brachte keinen synergistischen Effekt und war im Falle der höheren Konzentration nahezu wirkungslos mit dem niedrigsten Faktor aller untersuchten Zelllinien.

Die Zelllinien mit den höheren Methylierungsgraden, BxPC-3, MiaPaCa-2 und HEK293, reagierten nach der Inkubation mit den Substanzen mit den höchsten Expressionsanstiegen gegenüber der unbehandelten Kontrolle am Endpunkt des Experiments, während die geringer methylierten Zelllinien, AsPC-1 und Panc1, keine oder geringe Änderungen zeigten.

Der Promotorbereich von *SFRP2* war in Tumorgewebeproben hypomethyliert. Eine Korrelation zwischen der Methylierung und des Expressionswerts des Gens konnte nicht festgestellt werden. Pankreastumorzelllinien zeigten unterschiedliche Methylierungsmuster, die jedoch nur einen geringen Effekt auf die *SFRP2*-Expression hatten, da diese insgesamt sehr niedrig war. Die Expression ließ sich in allen Zelllinien durch DNMT- beziehungsweise HDAC-Inhibitoren erhöhen.

### ***3.6.4 Einfluss der Überexpression von SFRP2-GFP auf die Proliferation und die Apoptose von etablierten Pankreaskarzinomzelllinien***

Die Beteiligung von *SFRP2* als Interaktionspartner der Wnt-Proteine zur Regulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs ist eindeutig belegt und hat einen Effekt auf die Apoptose (Melkonyan *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004; Yamamura *et al.*, 2010). Von Zellen autokrin oder parakrin sekretiertes *SFRP2* kann in einer Desensibilisierung für apoptotische Stimuli der Empfängerzelle resultieren. Im durchgeführten Hefe-„Screening“ wurde das Protein durch einen anti-apoptotischen Effekt identifiziert.

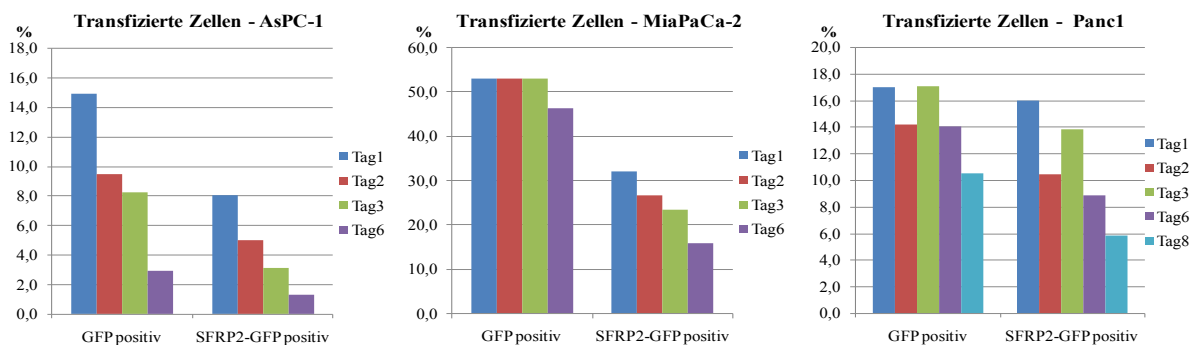
Wie in Kapitel 3.6.3 gezeigt werden konnte, war die Expression von *SFRP2* in den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien stark vermindert. Daher wurde der Einfluss der Überexpression des Proteins, die durch transiente Transfektion eines *SFRP2*-GFP-Expressionskonstrukts in die Zellen erreicht werden sollte, auf die Proliferation und Apoptoserate analysiert. Das C-terminal gelegene GFP ermöglichte die Bestimmung der Transfektionseffizienz und sollte idealerweise nicht mit der natürlichen Sekretion des *SFRP2* interferieren. Die Proliferations- und Apoptosemessung wurde durchflusszytometrisch an Tag 1, 2, 3, 6 und evtl. 8 nach der Transfektion durchgeführt. Es wurden 10 000 Zellen eingelesen. Die Proliferation wurde anhand der PKH26-Intensität, die bei proliferierenden Zellen durch Verteilung auf die Tochterzellen mit der Zeit abnimmt, bestimmt.

Annexin-V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) dienen der Unterscheidung zwischen lebenden (doppelt negativ), frühapoptotischen (Annexin-V positiv), spätapoptotischen (doppelt positiv) und nekrotischen Zellen (7-AAD positiv) (siehe Kapitel 2.4.5).

### 3.6.4.1 Transfektionseffizienzen des SFRP2-GFP-Konstruktes in etablierte Pankreaskarzinomzellen

Die Überexpression des SFRP2-GFP-Fusionsproteins erfolgte durch transiente Transfektion der Zelllinien mit der Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.4.2). Ein GFP-Konstrukt diente als Kontrolle.

Die Transfektionsraten lagen am Tag 1 im Durchschnitt aus drei Experimenten für das SFRP2-GFP-Konstrukt bei ca. 30 - 35 % für MiaPaCa-2-, bei ca. 16 % für Panc1- und nur bei ca. 8 % für AsPC-1-Zellen (siehe Abb. 3.6.14). Die Zahl der positiven Zellen nahm bei jeder Zelllinie mit jedem Messtag kontinuierlich ab. Der Rückgang transfizierter Zellen war bei der MiaPaCa-2-Zelllinie von ca. 33 % an Tag 1 auf ca. 20 % an Tag 6 am geringsten, was einer Abnahme um etwa 40 % entsprach. Die Anzahl positiver Zellen ging bei der Panc1-Zelllinie auf 6 % und bei den AsPC-1-Zellen auf unter 2 % zurück.



**Abb. 3.6.14: Durchflusszytometrische Analyse zu den Transfektionseffizienzen von GFP- und SFRP2-GFP-Konstrukten in die Zelllinien AsPC-1 (links), MiaPaCa-2 (Mitte) und Panc1 (rechts).** Die Analyse zur Transfektionseffizienz erfolgte anhand der Intensität der GFP-Fluoreszenz gegenüber nicht transfizierten Zellen im Durchflusszytometer im Verlaufsexperiment. Die Messtage für die Zelllinien AsPC-1 und MiaPaCa-2 lagen bei Tag 1, 2, 3 und 6, für Panc1 bei Tag 1, 2, 3, 6 und 8. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind aufgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte an.

Mit dem Kontroll-GFP-Konstrukt konnten an Tag 1 Effizienzen von ca. 50 % bei MiaPaCa-2-Zellen, ca. 17 % bei Panc1-Zellen und ca. 15 % bei AsPC-1-Zellen erreicht werden.

Die Transfektion des SFRP2-GFP-Konstruktes in die Zelllinie BxPC-3 war nicht möglich. Daher konnte sie für die weiteren Experimente nicht genutzt werden.

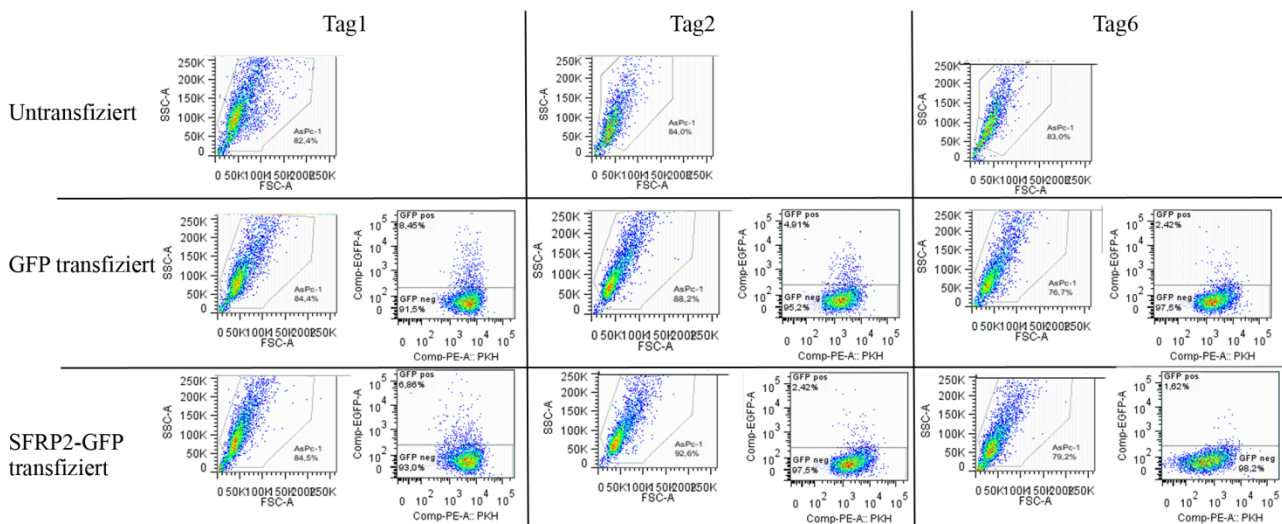
Im Nachfolgenden sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zum Proliferations- und Apoptoseverhalten der drei Zelllinien einzeln dargestellt. Exemplarisch ist jeweils eine Messung von mindestens drei unabhängigen Experimenten detailliert aufgeführt.

3.6.4.2 Proliferations- und Apoptoseverhalten von AsPC-1-Zellen

Die Proliferation und Apoptose der AsPC-1-Zellen wurde an vier Messtagen, Tag 1, 2, 3 und 6 nach Transfektion, durchflusszytometrisch bestimmt. Im exemplarischen Experiment sind die Messtage 1, 2 und 6 aufgeführt (siehe Abb. 3.6.15 und 3.6.16).

Die transfizierten Zellen wurden in GFP-positive und -negative Zellen für die Analyse separiert, wobei die Anzahl GFP-positiver Zellen sehr gering war, was die Analyse der Transfektionseffizienzen bereits zeigte (siehe auch Abb. 3.6.14).

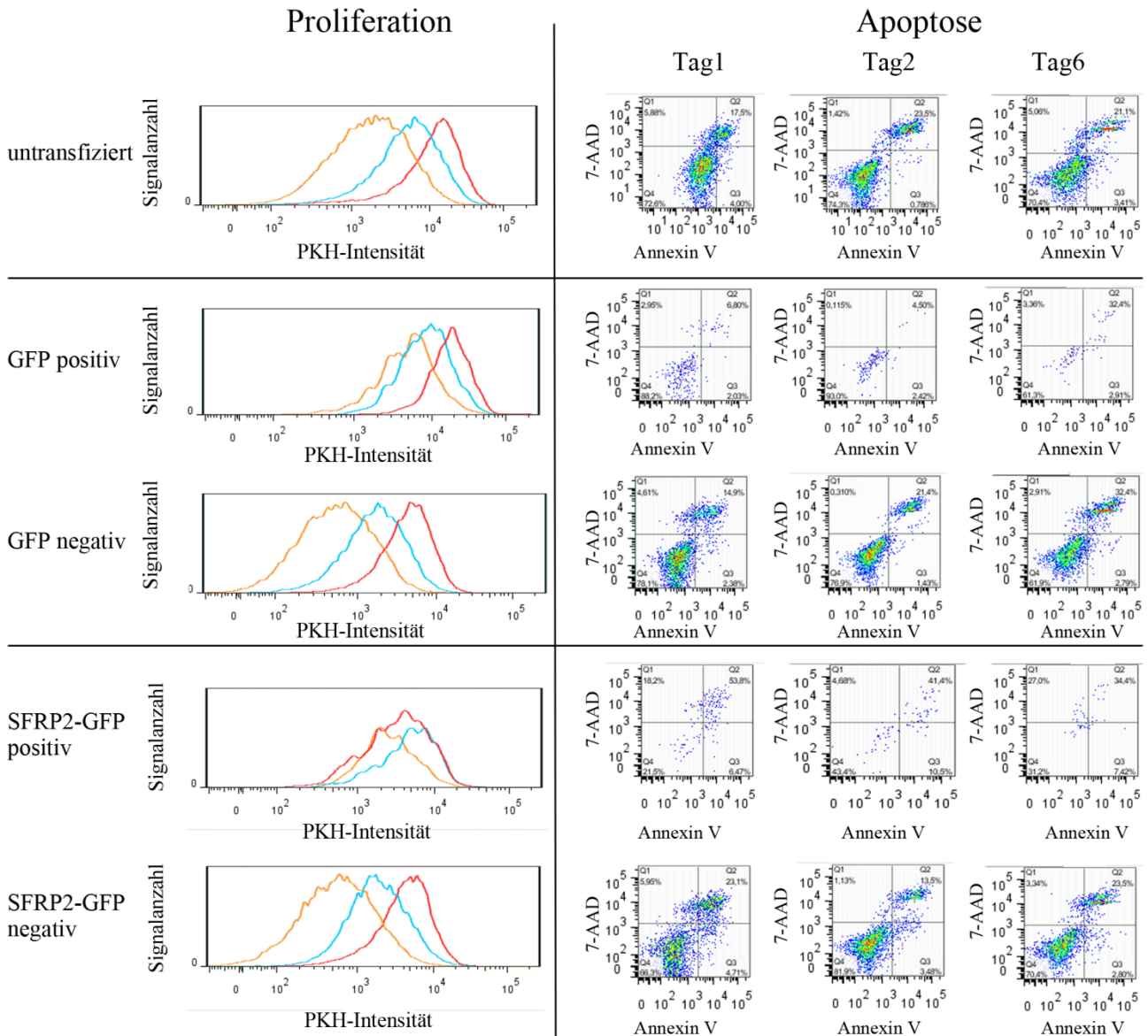
Die PKH26-Intensität untransfizierter AsPC-1-Zellen nahm bezogen auf das Verteilungsmaximum der Zellen um ca. 90 % in den Messtagen kontinuierlich ab, was auf eine Proliferation hindeutete (siehe Abb. 3.6.16). Auch die negativen Zellen der GFP- und SFRP2-GFP transfizierten Population zeigten eine Abnahme der PKH26-Intensität um ca. 90 % vom 1. auf den 6. Messtag. Für die positiv GFP-transfizierten Zellen hingegen konnte nur eine Abnahme um ca. 70 % bis zum letzten Messtag beobachtet werden, was somit einer reduzierten Proliferation entsprach. Bei den mit dem SFRP2-GFP-Konstrukt positiv transfizierten Zellen belief sich die Abnahme vom ersten auf den letzten Messtag auf ca. 50 %.



**Abb. 3.6.15: Durchflusszytometrische Analyse mit Eingrenzungsparametern der Grundpopulationen der Kontroll- und Transfektionsansätze der AsPC-1-Zellen für die Messtage.** Die FSC-SSC-Punktdiagramme repräsentieren alle eingelesenen Messwerte mit „Gating“ (jeweils links pro Tag), deren Subpopulation in GFP-positive und -negative Zellen eingeteilt wurde (Punktdiagramme jeweils rechts pro Tag).

In der Apoptosemessung wurden die Zellen gemäß ihrer Intensität für Annexin V und 7-AAD im Punktdiagramm aufgetragen, das in Quadranten eingeteilt war und eine Bestimmung des Vitalitätsstatus ermöglichte (siehe Abb. 3.6.16). Tendenziell war anhand der Punktdiagramme für alle Populationen außer der SFRP2-GFP-positiven Zellen zu beobachten, dass der Hauptteil der Zellen im doppel-negativen Quadranten vorhanden war. SFRP2-GFP-positive Zellen befanden sich in höherer Zahl in den Annexin V-positiven Quadranten.

Eine Abnahme GFP- und SFRP2-GFP-positiver Zellen über die Messtage konnte auch hier durch die verringerte Punktdichte festgestellt werden.



**Abb. 3.6.16: Durchflusszytometrische Analyse zum Einfluss der SFRP2-GFP-Überexpression auf die Proliferation (Histogramme links) und Apoptose (Punktdiagramme rechts) von AsPC-1-Zellen.** Die Analyse zur Proliferation erfolgte anhand der PKH26-Intensität. Die Histogramme zeigen die Verläufe der detektierten Populationen über die Messtage von drei unabhängigen Experimenten (Tag 1: rot; Tag 2: blau; Tag 6: orange). Die Apoptoserate wurde mittels einer Annexin V/7-AAD-Doppelfärbung im Durchflusszytometer im Verlaufsexperiment bestimmt. Annexin-V positive Zellen zeigten apoptotische Zellen an, davon markierte die 7-AAD negative Subpopulation früh-apoptotische Zellen und die 7-AAD positive Subpopulation spät-apoptotische Zellen. Die Punktdiagramme von drei Messtagen der einzelnen Populationen sind aufgeführt.

Die Auswertung der Ergebnisse aller drei Experimente zeigte ein übereinstimmendes Bild, bei dem untransfizierte als auch jeweils GFP- beziehungsweise SFRP2-GFP-negative Zellen der Transfektionsansätze eine gleiche ungehinderte Proliferation aufwiesen (siehe Tab. 3.6.5). GFP-

positive Zellen waren in ihrer Proliferation leicht inhibiert, SFRP2-GFP-Zellen dagegen fast vollständig.

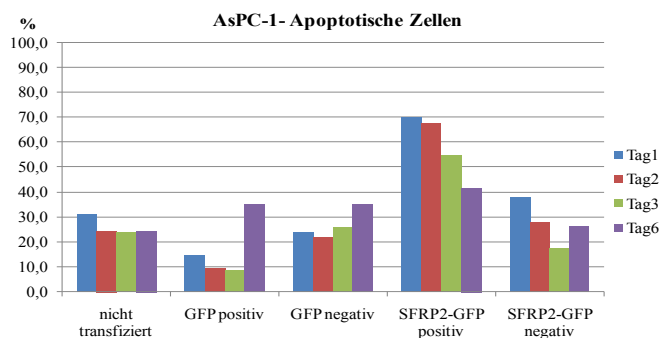
**Tab. 3.6.5: Durchflusszytometrische Analyse des Proliferationsverhaltens von AsPC-1-Zellen nach Transfektion mit GFP- beziehungsweise SFRP2-GFP-Plasmiden aus drei unabhängigen Experimenten.** Die Analyse erfolgte anhand der Intensität der PKH 26-Fluoreszenz. Die Messtage lagen bei Tag 1, 2, 3 und 6. (+): deutliche, uneingeschränkte Proliferation, (+-): verringerte Proliferation, (-): keine Proliferation

Zelllinie	Untransfiziert	Transfiziert mit GFP-Plasmid		Transfiziert mit SFRP2-GFP-Plasmid	
		GFP-positiv	GFP-negativ	SFRP2-GFP positiv	SFRP2-GFP negativ
AsPC-1	+	+/-	+	-	+

Für die Bestimmung der Apoptoseraten der drei Experimente wurden die gemessenen prozentualen Werte der beiden Annexin V positiven Populationen addiert.

Die gemittelten Apoptoseraten lagen bei den nicht transfizierten Zellen über alle Messtage konstant zwischen 20-30 % (siehe Abb. 3.6.17). Bei den GFP-transfizierten Zellen konnte in der positiven Population eine Apoptoserate von 10 - 15 % in den ersten drei Tagen gemessen werden, die im Durchschnitt auf 35 % am letzten Tag anstieg. Die GFP-negative Population zeigte Raten von 20 - 25 % in den ersten drei Tagen mit ebenfalls einem Anstieg auf 35 % am letzten Messtag.

Die Apoptoserate der SFRP2-GFP-negativen Zellpopulation fiel von ca. 40 % am ersten Tag auf ca. 20 - 30 % in den darauffolgenden Messtagen. Dagegen konnte für die positive Population eine durchschnittliche Apoptoserate von ca. 70 % am ersten Tag gemessen werden, die im Verlauf auf 40 % abfiel.



**Abb. 3.6.17: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate bei SFRP2-GFP-Überexpression im Vergleich zu Kontrollen in AsPC-1-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.** Die Apoptoserate wurde mittels einer Annexin V/7-AAD-Doppelfärbung bestimmt. Die Messtage lagen bei Tag 1, 2, 3 und 6. Annexin-V positive Zellen zeigten apoptotische Zellen an, davon markierte die 7-AAD negative Subpopulation früh-apoptotische Zellen und die 7-AAD positive Subpopulation spät-apoptotische Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte an.

Die Apoptoserate in SFRP2-GFP-positiven Zellen war demnach in den ersten drei Messtagen deutlich erhöht.

### *3.6.4.3 Proliferations- und Apoptoseverhalten von Panc1-Zellen*

Für die Bestimmung der Proliferation und Apoptose der Panc1-Zellen wurden Messungen an fünf Tagen, Tag 1, 2, 3, 6 und 8 nach Transfektion, durchgeführt, da sich ein insgesamt geringeres Proliferationsverhalten bestimmen ließ (siehe Abb. 3.6.19). Im exemplarischen Experiment sind die Messtage 1, 2, 6 und 8 aufgeführt (siehe Abb. 3.6.18 und 3.6.19).

Die Anzahl GFP-positiver Zellen gegenüber den GFP-negativen Zellen war in beiden transfizierten Ansätzen (GFP beziehungsweise SFRP2-GFP) geringer und bestätigte die zuvor ermittelten Transfektionseffizienzen (siehe auch Abb. 3.6.14).

Die Proliferation der untransfizierten Panc1-Zellen verringerte die PKH26-Intensität über die Messtage um ca. 85 % für das Verteilungsmaximum der Zellen. Für die mit dem Leervektor transfizierten Zellen lagen die Werte vom ersten zum letzten Messtag um ca. 80 % niedriger. Auch die GFP-negativen Zellen der GFP- und SFRP2-GFP transfizierten Populationen zeigten eine Abnahme der PKH26-Intensität um ca. 80 % vom 1. auf den 8. Messtag. Die positiv GFP-transfizierten Zellen proliferierten in geringerem Maße, was anhand einer geringeren Abnahme der PKH26-Intensität um ca. 50 % beobachtet werden konnte. Für die mit dem SFRP2-GFP-Konstrukt positiv transfizierten Zellen veränderte sich die PKH26-Intensität über die Messtage nicht. Die Zellen proliferierten daher nicht.

Die Zellen wurden auch hier entsprechend der gemessenen Fluoreszenzemission von Annexin V und 7-AAD im Quadranten-Punktdiagramm der Apoptosemessung aufgetragen (siehe Abb. 3.6.20). An allen Messtagen konnten Zellen auf Grund ihres Vitalitätsstatus in allen Quadranten bestimmt werden. Hauptsächlich waren jedoch lebende sowie apoptotische Zellen vorhanden und weniger nekrotische.

Die Anzahl von GFP- und SFRP2-GFP-positiven Zellen nahm auch hier über die Messtage durch die verringerte Punktdichte ab.

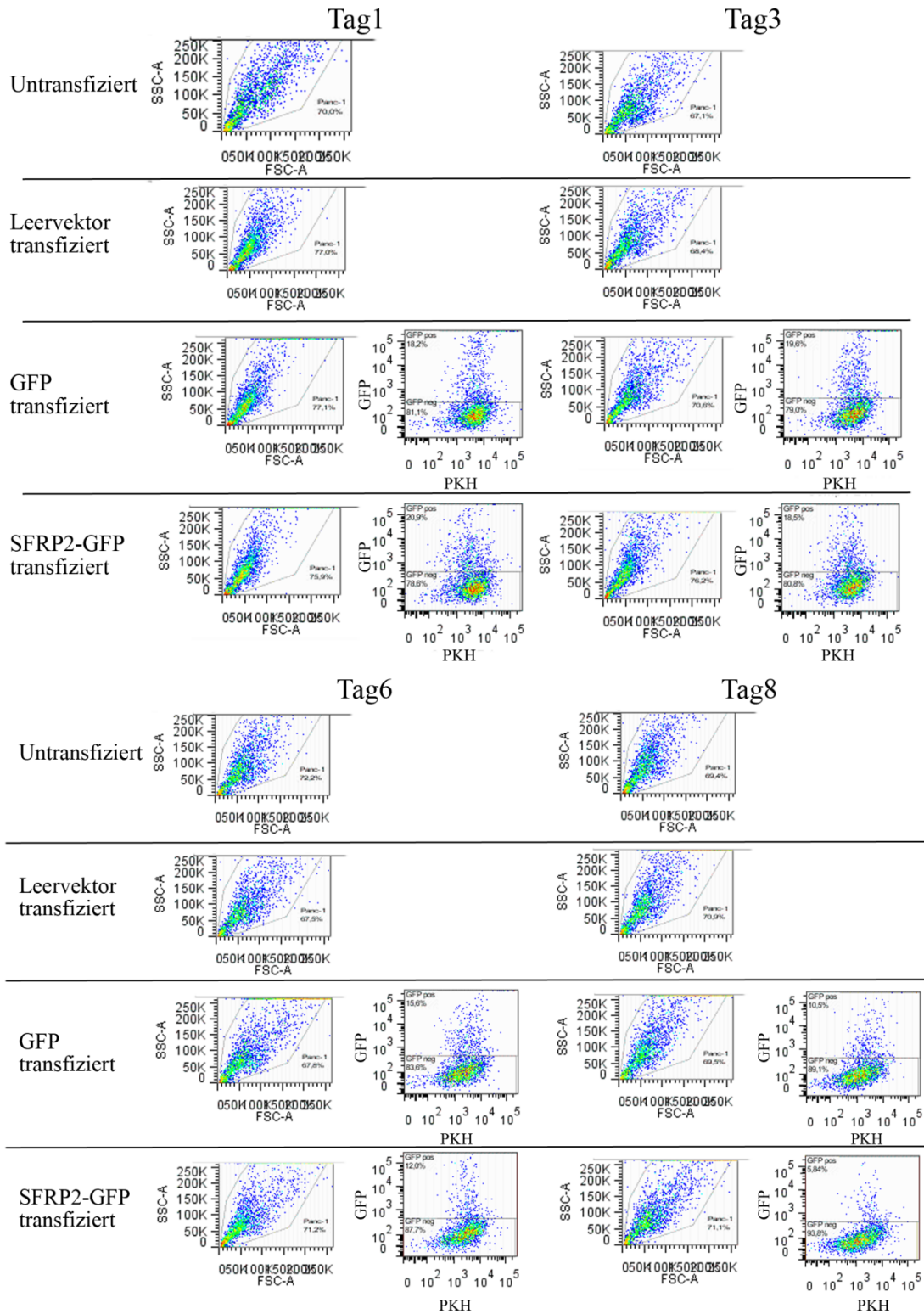
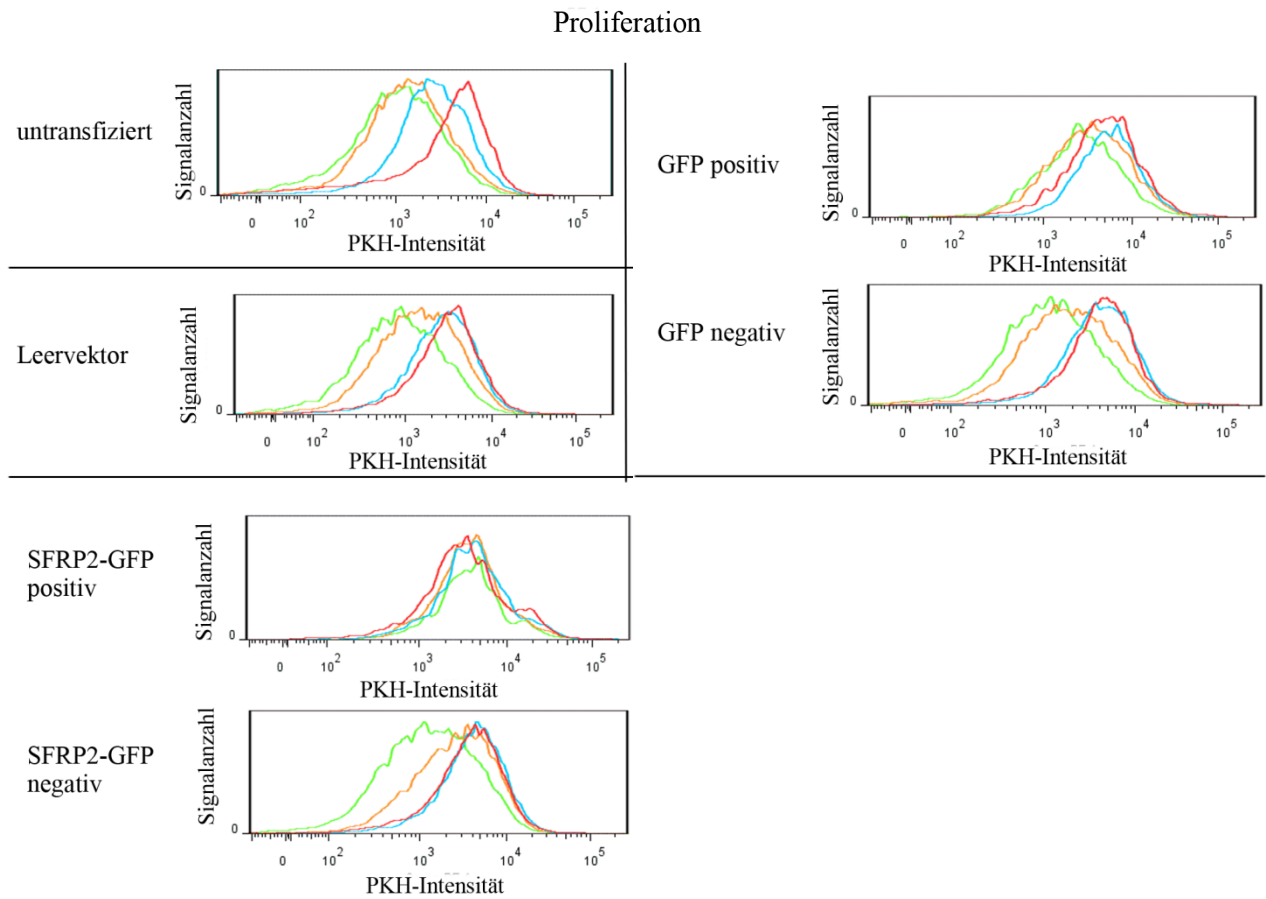


Abb. 3.6.18: Durchflusszytometrische Analyse mit Eingrenzungsparametern der Grundpopulationen der Kontroll- und Transfektionsansätze der Panc1-Zellen für die Messtage. Die FSC-SSC-Punktdiagramme repräsentieren alle eingelesenen Messwerte mit „Gating“ (jeweils links pro Tag), deren Subpopulation in GFP-positive und -negative Zellen eingeteilt wurde (Punktdiagramme jeweils rechts pro Tag).



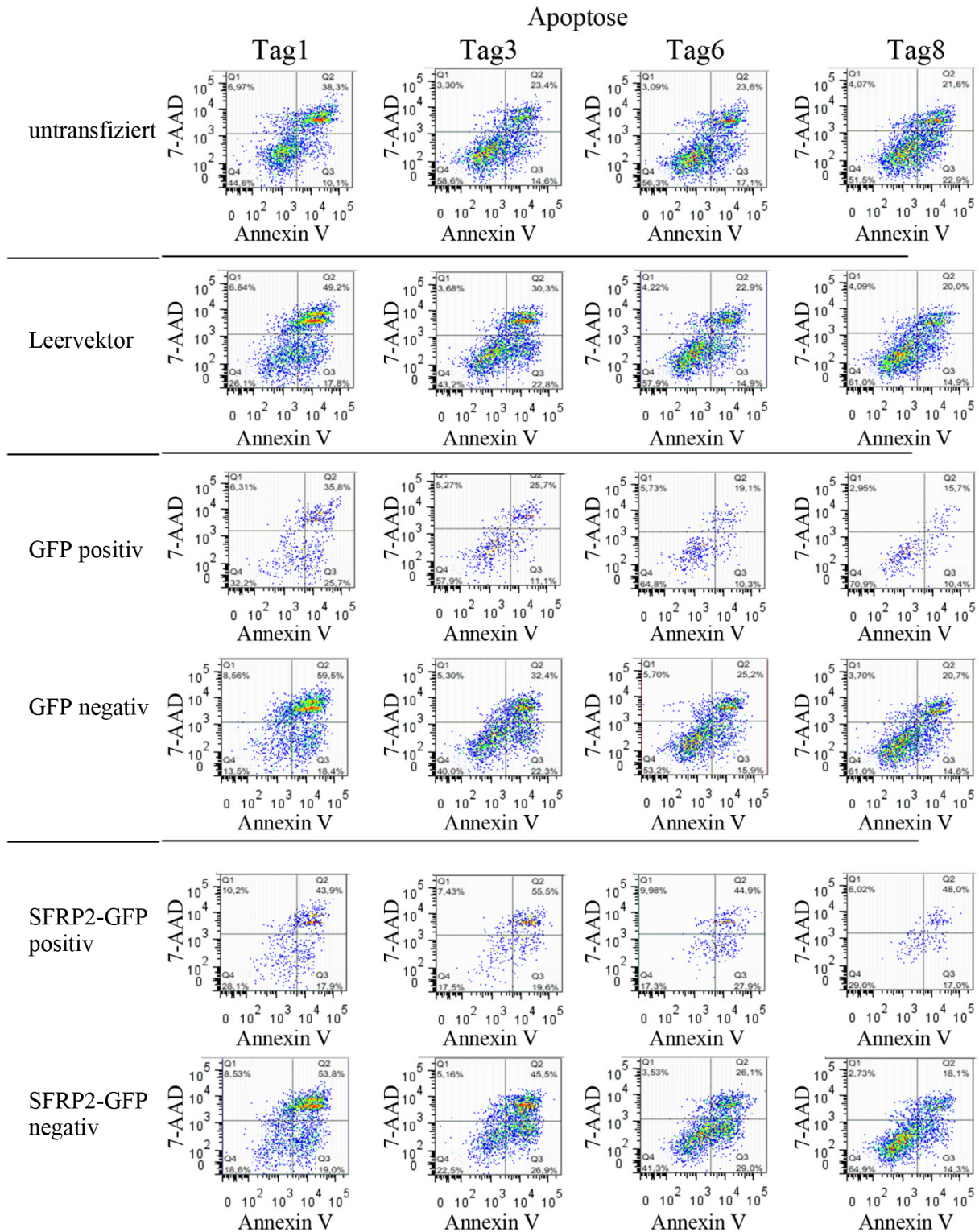
**Abb. 3.6.19: Durchflusszytometrische Analyse zum Einfluss der SFRP2-GFP-Überexpression auf die Proliferation von Panc1-Zellen.** Die Analyse zur Proliferation erfolgte anhand der PKH26-Intensität. Die Histogramme zeigen die Verläufe der detektierten Populationen über die Messtage von drei unabhängigen Experimenten (Tag 1: rot; Tag 3: blau; Tag 6: orange; Tag 8: grün).

Bei der Auswertung der unabhängig durchgeführten Experimente konnte eine vergleichbar hohe Proliferation bei den untransfizierten sowie den mit dem Leervektor transfizierten Zellen beobachtet werden (siehe Tab. 3.6.6). Auch die jeweils GFP- bzw. SFRP2-GFP-negativen Zellen wiesen in allen Experimenten eine Proliferation auf gleichem Niveau wie die mit dem Leervektor transfizierten Zellen auf. Anhand der Verläufe der PKH26-Intensitäten proliferierten GFP-positive Zellen im Allgemeinen langsamer. SFRP2-GFP-positive Zellen zeigten in allen Experimenten keine Proliferation.

**Tab. 3.6.6: Durchflusszytometrische Analyse des Proliferationsverhaltens von Panc1-Zellen nach Transfektion mit GFP- beziehungsweise SFRP2-GFP-Plasmiden aus drei unabhängigen Experimenten.** Die Analyse erfolgte anhand der Intensität der PKH 26-Fluoreszenz. Die Messtage lagen bei Tag 1, 2, 3, 6 und 8. (+): deutliche, uneingeschränkte Proliferation, (+-): verringerte Proliferation, (-): keine Proliferation

Zelllinie	Untransfiziert	Transfiziert mit pCDNA3-Leervektor	Transfiziert mit GFP-Plasmid		Transfiziert mit SFRP2-GFP-Plasmid	
			GFP-positiv	GFP-negativ	SFRP2-GFP positiv	SFRP2-GFP negativ
Panc1	+	+	+/-	+	-	+

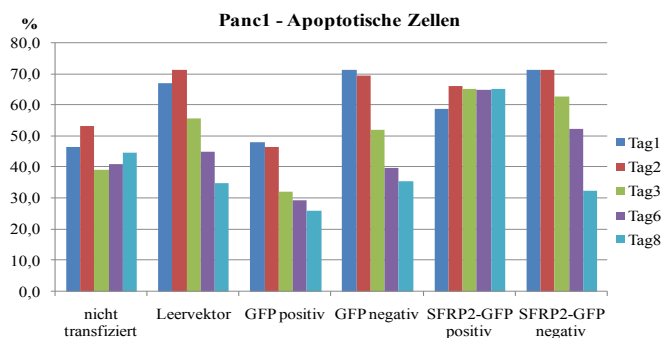




**Abb. 3.6.20: Durchflusszytometrische Analyse zum Einfluss der SFRP2-GFP-Überexpression auf die Apoptose von Panc1-Zellen.** Die Apoptoserate wurde mittels einer Annexin V/7-AAD-Doppelfärbung im Durchflusszytometer im Verlaufsexperiment bestimmt. Annexin-V positive Zellen zeigten apoptotische Zellen an, davon markierte die 7-AAD negative Subpopulation früh-apoptotische Zellen und die 7-AAD positive Subpopulation spät-apoptotische Zellen. Die Punktdiagramme von allen Messtagen der einzelnen Populationen sind aufgeführt.

Wie bereits die Punktdiagramme in Abbildung 3.6.20 verdeutlichten, war die Anzahl Annexin V positiver Zellen in allen Ansätzen insgesamt hoch.

Die gemittelten Apoptoseraten der Experimente bestätigten dies mit durchschnittlichen Werten von 40 - 50 % in den nicht transfizierten Zellen (siehe Abb. 3.6.21). Die mit dem Leervektor transfizierten Zellen als auch die GFP- und SFRP2-GFP-negativen Zellen lagen bei einer Rate von ca. 70 % apoptotischer Zellen, die bis Tag 8 auf jeweils ca. 35 % sank. Bei den GFP-positiven Zellen konnte eine Apoptoserate von zunächst ca. 50 % gemessen werden, die bis Tag 8 auf ca. 25 % abnahm. Die gemittelten Apoptoseraten der SFRP2-GFP-positiven Zellen bewegten sich an allen Messtagen im Bereich von 60 - 65 %.



**Abb. 3.6.21: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate bei SFRP2-GFP-Überexpression im Vergleich zu Kontrollen in Panc1-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.** Die Apoptoserate wurde mittels einer Annexin V/7-AAD-Doppelfärbung bestimmt. Die Messtage lagen bei Tag 1, 2, 3, 6 und 8. Annexin-V positive Zellen zeigten apoptotische Zellen an, davon markierte die 7-AAD negative Subpopulation früh-apoptotische Zellen und die 7-AAD positive Subpopulation spät-apoptotische Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte an.

Die SFRP2-GFP-positiven Zellen lagen als einzige über alle Messtage konstant bei einer Apoptoserate von ca. 60 - 65 %, während sie bei den anderen untersuchten Populationen auf 25 - 35 % an Tag 8 sank.

#### 3.6.4.4 Proliferations- und Apoptoseverhalten von MiaPaCa-2-Zellen

Die Messungen der Proliferations- und Apoptoseraten der MiaPaCa-2-Zellen wurden an vier Tagen, Tag 1, 2, 3 und 6 nach Transfektion, durchgeführt (siehe Abb. 3.6.22 & 3.6.23). Es sind alle Messtage sowie deren Histogramme und Punktdiagramme eines exemplarischen Experiments und zusätzlich von SFRP2-GFP-positiven und -negativen Zellen eines weiteren Experiments gezeigt.

Die Anzahl GFP-positiver Zellen schien im Punktdiagramm diejenige der GFP-negativen Zellen zu übertreffen, SFRP2-GFP-positiv Zellen lagen jedoch in geringerer Zahl als die -negativen Zellen vor. Dies entsprach somit auch den zuvor ermittelten Transfektionseffizienzen (siehe auch Abb. 3.6.14).

Untransfizierte MiaPaCa-2-Zellen proliferieren über die Messtage, was anhand einer Abnahme der PKH26-Intensität um ca. 80 % bezogen auf das Verteilungsmaximum der Zellen sichtbar war. Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert waren, als auch die beiden Populationen der GFP transfizierten Zellen zeigten eine Verringerung der PKH-Intensität um ca. 75 % vom ersten zum letzten Messtag. Die

mit dem SFRP2-GFP-Konstrukt positiv transfizierten Zellen proliferierten nicht, da sich die PKH26-Intensität über die Messtage nicht änderte. Bei der SFRP2-GFP-negativen konnte in verschiedenen unabhängigen Experimenten entweder keine Veränderung der PKH26-Messung beobachtet werden, womit die Zellen nicht proliferierten, oder die Intensität nahm um ca. 65 % über die Messtage ab.

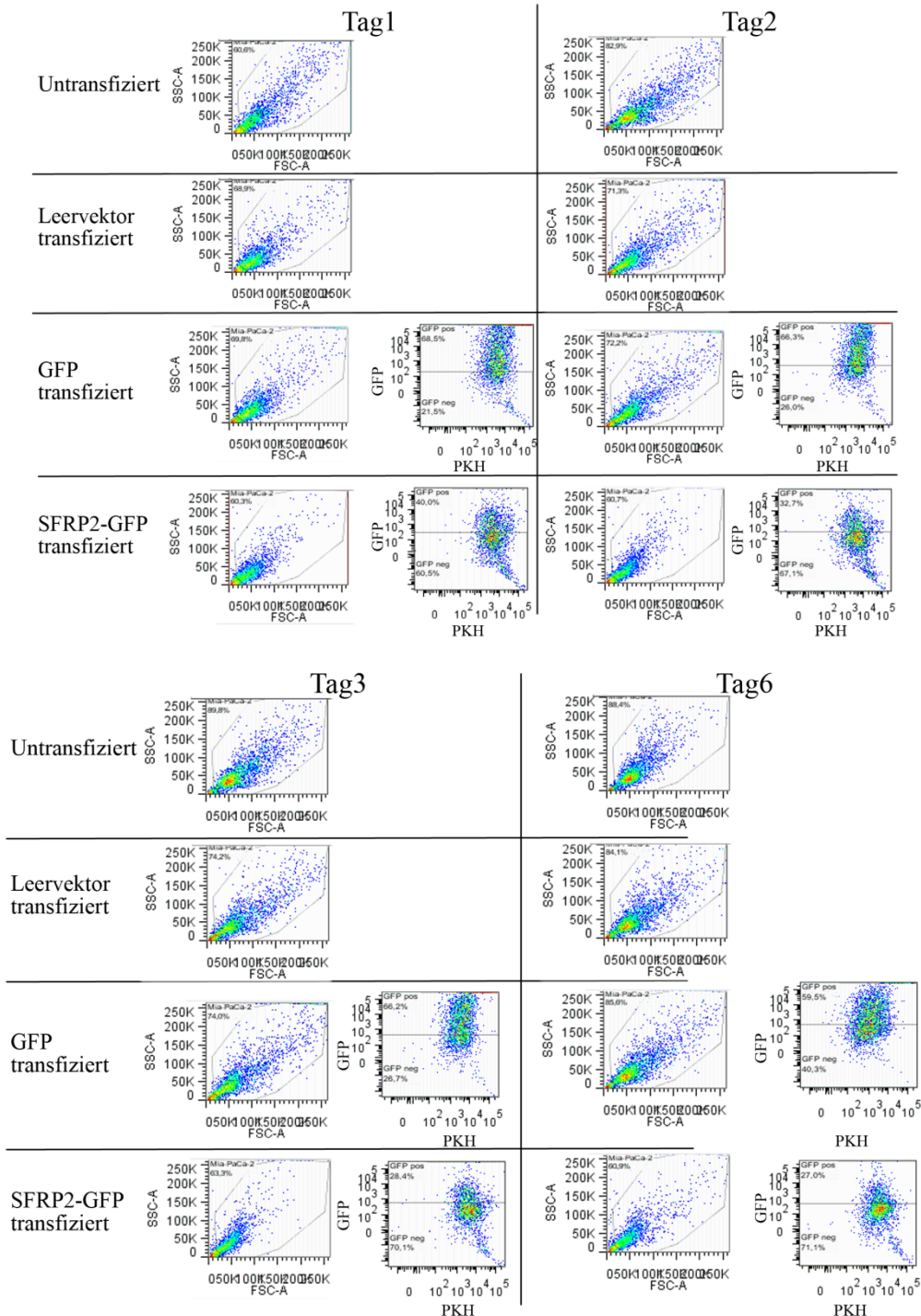
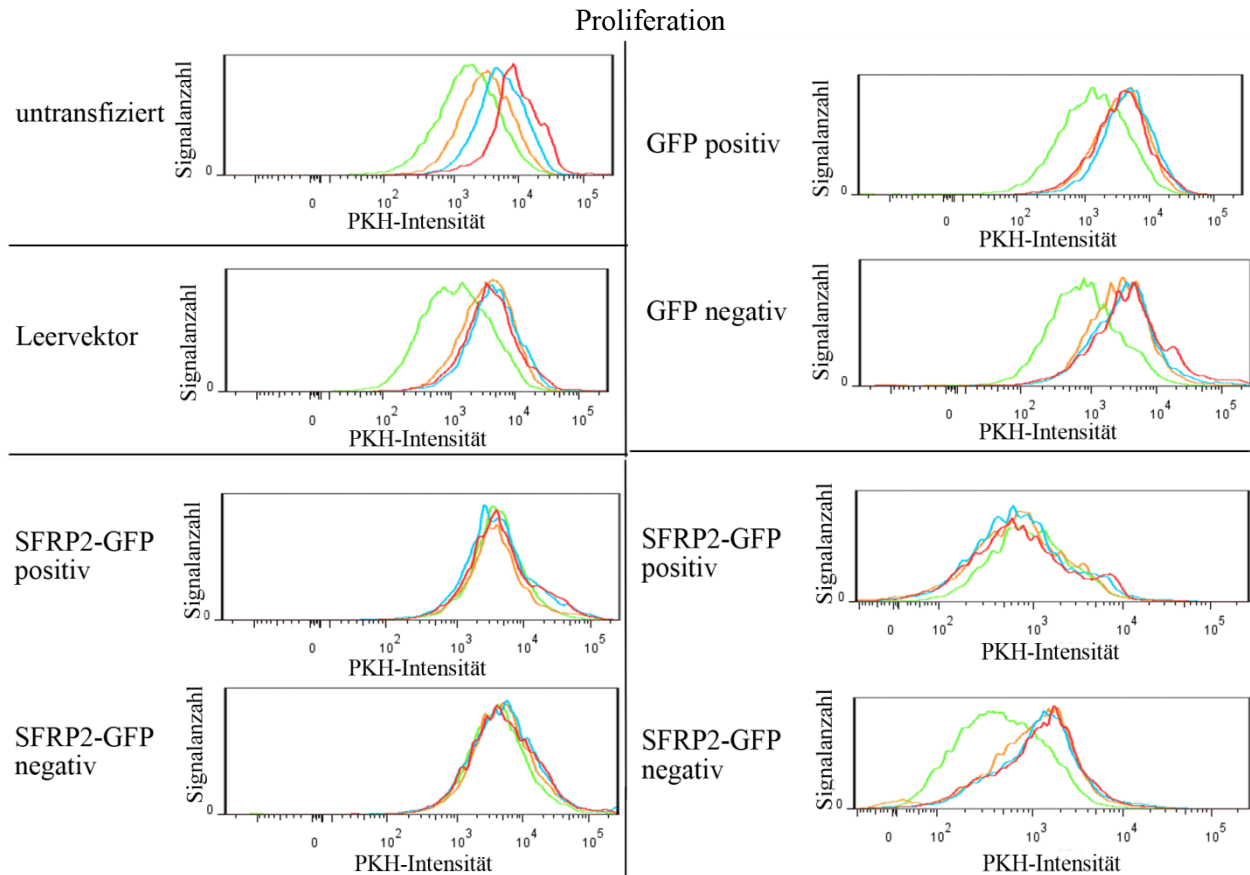


Abb. 3.6.22: Durchflusszytometrische Analyse mit Eingrenzungsparametern der Grundpopulationen der Kontroll- und Transfektionsansätze der Panc1-Zellen für die Messtage. Die FSC-SSC-Punktdiagramme repräsentieren alle eingelesenen Messwerte mit „Gating“ (jeweils links pro Tag), deren Subpopulation in GFP-positive und -negative Zellen eingeteilt wurde (Punktdiagramme jeweils rechts pro Tag).

Die Zellen wurden auch hier entsprechend der gemessenen Fluoreszenzemission von Annexin V und 7-AAD im Quadranten-Punktdiagramm der Apoptosemessung aufgetragen (siehe Abb. 3.6.24). An allen Messtagen konnten Zellen auf Grund ihres Vitalitätsstatus in allen Quadranten bestimmt werden. In den ersten Tagen wurden primär apoptotische Zellen gemessen. Im Verlauf des Experiments überwiegen vitale Zellen ausgenommen den SFRP2-GFP transfizierten Populationen.



**Abb. 3.6.23: Durchflusszytometrische Analyse mit zum Einfluss der SFRP2-GFP-Überexpression auf die Proliferation von MiaPaCa-2-Zellen.** Die Analyse zur Proliferation erfolgte anhand der PKH26-Intensität. Die Histogramme zeigen die Verläufe der detektierten Populationen über die Messtage von zwei unabhängigen Experimenten (Tag 1: rot; Tag 2: blau; Tag 3: orange; Tag 6: grün). Für die mit dem SFRP2-GFP-Plasmid transfizierten Zellen sind die beiden beobachteten unterschiedlichen Proliferationsverläufe aufgetragen.

Eine hohe Proliferation bei den untransfizierten Zellen konnte bei der Auswertung der unabhängig durchgeführten Experimente festgestellt werden (siehe Tab. 3.6.7). Mit dem Leervektor transfizierte Zellen als auch GFP-positive und-negative Zellen zeigten eine zunächst verringerte Proliferation, die an Tag 6 gleich der unbehandelten Zellen war. SFRP2-GFP-positive Zellen proliferierten in keinem der Experimente. Für die SFRP2-GFP-negative Zellpopulation konnte sowohl eine verringerte als auch eine vollständig blockierte Proliferation je nach Experiment gemessen werden.

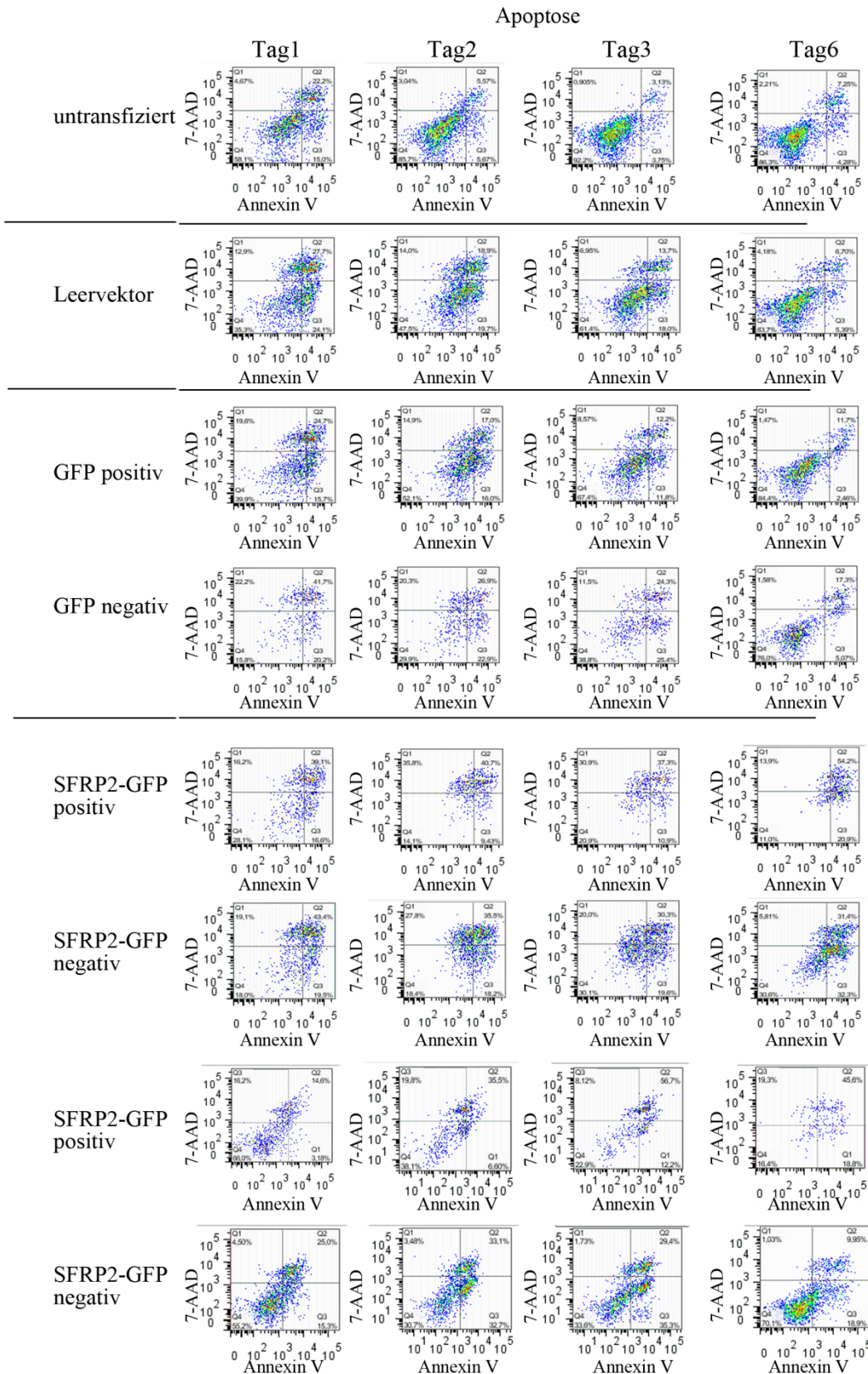
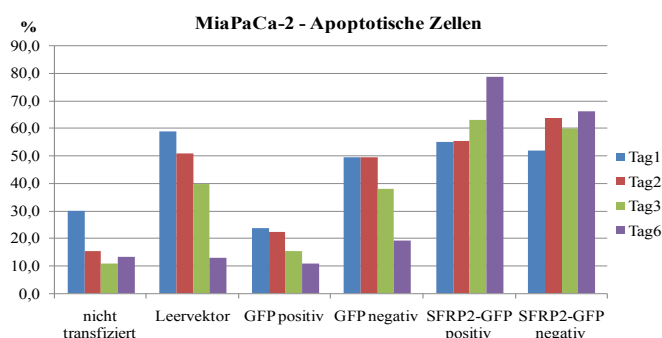


Abb. 3.6.24: Durchflusszytometrische Analyse zum Einfluss der SFRP2-GFP-Überexpression auf die und Apoptose von MiaPaCa-2-Zellen. Die Apoptoserate wurde mittels einer Annexin V/7-AAD-Doppelfärbung im Durchflusszytometer im Verlaufsexperiment bestimmt. Annexin-V positive Zellen zeigten apoptotische Zellen an, davon markierte die 7-AAD negative Subpopulation früh-apoptotische Zellen und die 7-AAD positive Subpopulation spät-apoptotische Zellen. Die Punktdiagramme von allen Messtagen der einzelnen Populationen sind aufgeführt.

**Tab. 3.6.7: Durchflusszytometrische Analyse des Proliferationsverhaltens von MiaPaCa-2-Zellen nach Transfektion mit GFP- beziehungsweise SFRP2-GFP-Plasmiden aus drei unabhängigen Experimenten.** Die Analyse erfolgte anhand der Intensität der PKH 26-Fluoreszenz. Die Messtage lagen bei Tag 1, 2, 3 und 6. (+): deutliche, uneingeschränkte Proliferation, (+-): verringerte Proliferation, (-): keine Proliferation

Zelllinie	Untransfiziert	Transfiziert mit pCDNA3-Leervektor	Transfiziert mit GFP-Plasmid		Transfiziert mit SFRP2-GFP-Plasmid	
			GFP-positiv	GFP-negativ	SFRP2-GFP positiv	SFRP2-GFP negativ
MiaPaCa-2	+	+/-	+/-	+/-	-	+/-

Untransfizierte Zellen zeigten im Durchschnitt Apoptoseraten von 30 % an Tag 1, die auf 10 - 15 % in den weiteren Messtagen fiel (siehe Abb. 3.6.25). Bei den GFP-positiven Zellen konnten vergleichbare Apoptoseraten von zunächst ca. 25 % und im weiteren Verlauf ca. 10 - 20 % gemessen werden. Mit dem Leervektor transfizierte Zellen als auch die GFP-negativen Zellen lagen bei einer Rate von ca. 50 % apoptotischer Zellen an Tag 1, die bis Tag 6 auf jeweils ca. 10 - 20 % sank. SFRP2-GFP-positive und negative Zellen hatten gemittelte Apoptoseraten von ca. 50 % am ersten Messtag, die auf 65 - 80 % bis zum letzten Messtag anstiegen.



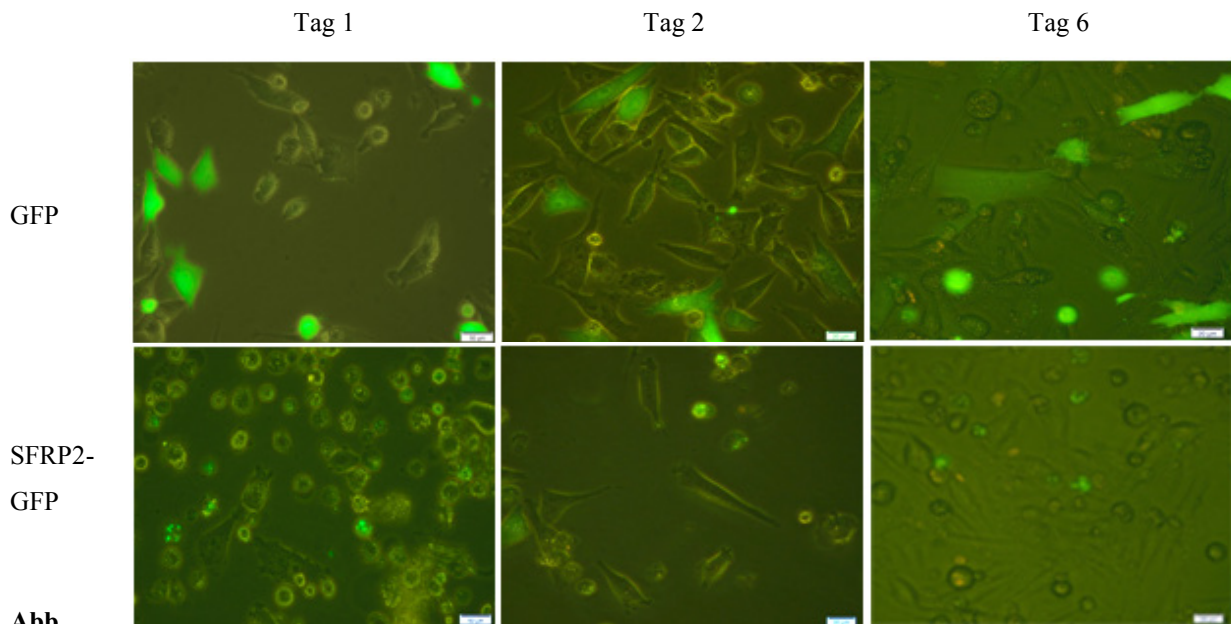
**Abb. 3.6.25: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate bei SFRP2-GFP-Überexpression im Vergleich zu Kontrollen in MiaPaCa-2-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.** Die Apoptoserate wurde mittels einer Annexin V/7-AAD-Doppelfärbung bestimmt. Die Messtage lagen bei Tag 1, 2, 3 und 6. Annexin-V positive Zellen zeigten apoptotische Zellen an, davon markierte die 7-AAD negative Subpopulation früh-apoptotische Zellen und die 7-AAD positive Subpopulation spät-apoptotische Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Messwerte an.

Bei den MiaPaCa-2-Zellen lagen die Apoptoseraten bei SFRP2-GFP-positiven als auch -negativen Zellen auf gleichem hohem Niveau über 50 % und sanken im Mittel nicht wie bei den anderen Populationen. Das Proliferationsverhalten SFRP2-GFP-negativer Zellen war entweder gleich dem der SFRP2-GFP-positiver Zellen oder dem der anderen untersuchten Populationen.

### 3.6.5 Sekretion des SFRP2-GFP-Fusionsproteins von MiaPaCa-2-Zellen

Da SFRP2-GFP-negative MiaPaCa-2-Zellen im gleichen Kulturansatz in Experimenten wiederholt ein identisches Proliferations- und Apoptoseverhalten wie die positiv transfizierten zeigten (siehe Kapitel

3.6.4.4), wurde untersucht, ob sich das Protein im Zellkulturüberstand nachweisen ließ. Dies wäre ein Hinweis auf einen parakrinen Effekt des sekretierten Proteins.



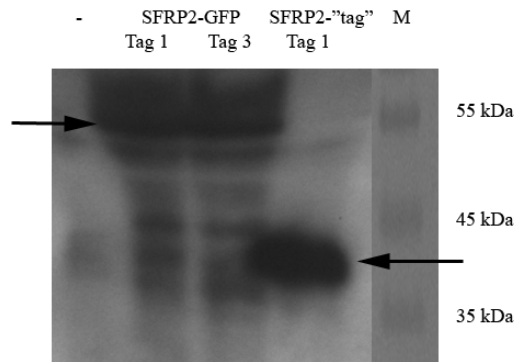
**Abb.**

**3.6.26: Lokalisation von exprimiertem GFP (oben) und SFRP2-GFP (unten) in MiaPaCa-2-Zellen nach der transienten Transfektion mit entsprechenden Plasmiden an den Messtagen 1, 2 und 6 (von links nach rechts).** Die Analyse erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 20x.

Die erfolgreiche Transfektion wurde anhand der Fluoreszenz des GFP im Mikroskop überprüft. Eine intrazelluläre GFP-Fluoreszenz konnte in GFP- und SFRP2-GFP-transfizierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.6.26). Fluoreszierende Zellen nach SFRP2-GFP-Transfektion lagen zu einem hohen Anteil in Suspension vor. Dagegen waren nur GFP transfizierte positive Zellen sowohl adhären als auch im Überstand zu finden.

Neben dem Plasmid mit der kodierenden Sequenz für das SFRP2-GFP-Fusionsprotein stand ein Plasmid auf Basis des pCDNA3.1-Vektors zur Verfügung, mit dem SFRP2 mit dem C-terminalen „tag“ exprimiert werden konnte (siehe Kapitel 2.1.3). Dieses entsprach damit nahezu dem nativen Protein. MiaPaCa-2-Zellen wurden transient transfiziert und die Überstände in mehreren Tagen gesammelt. Die Isolierung und Anreicherung der Proteine im Zellkulturmedium erfolgte mit der StrataClean-Matrix (siehe Kapitel 2.3.3).

Im Zellkulturüberstand ließen sich mittels Immunblot sowohl das SFRP2-GFP-Fusionsprotein als auch das SFRP2-„tag“-Protein nachweisen (siehe Abb. 3.6.27). Das Fusionsprotein war bei knapp über 55 kDa zu detektieren, was dem berechneten Molekulargewicht von ca. 59 kDa entsprach.



**Abb. 3.6.27: Identifizierung von sekretiertem SFRP2-GFP- und SFRP2-"tag"-Protein im Zellkulturüberstand von MiaPaCa-2-Zellen mittels Immunblot.** Die Pfeile zeigen das detektierte Protein an. Der Überstand wurde mit der StrataClean-Matrix eingeeengt und 15  $\mu$ L des Eluats in einem 15 % SDS-Gel elektrophoretisch getrennt. Die Detektion erfolgte mit einem monoklonalen anti-SFRP2-Antikörper (1:200). (-: untransfizierte Kontrolle; M: Marker)

Ein parakriner Effekt des sekretierten SFRP2 Proteins auf nicht transfizierte Zellen ist demnach möglich.

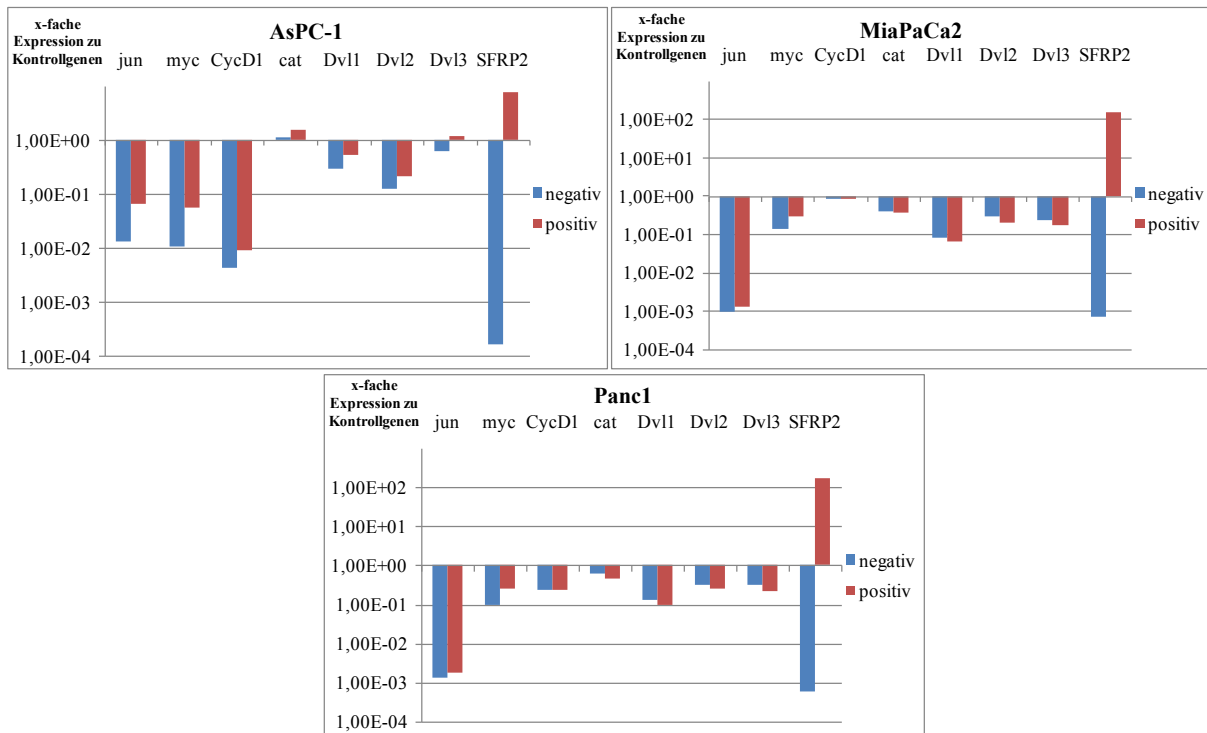
### ***3.6.6 Einfluss der Überexpression von SFRP2 auf die Genexpression von intrazellulären Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges in etablierten Pankreaskarzinomzellen***

Der für die Proliferation und Apoptose relevante Signalweg, an dem Wnt-Proteine und Frizzled-Rezeptoren beteiligt sind, ist der kanonische Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg, über den SFRP2 einen entsprechenden Effekt bewirken könnte (Anastas & Moon, 2013). Da die Proliferation in allen untersuchten Zelllinien verringert bis blockiert und die Apoptoserate erhöht war, wurde die Genexpression der intrazellulären Komponenten der Signalkaskade auf eine Änderung hin untersucht. Daher wurde die Expression auf Transkriptebene der Gene *Dishevelled1, 2* und *3*,  *$\beta$ -Catenin*, *CyclinD1*, *MYC* und *JUN* in allen Zelllinien nach 24-stündiger Überexpression von SFRP2-GFP gemessen und gegen nicht transfizierte Zellen verglichen. Die Normalisierung erfolgte gegen die Gene  *$\beta$ -Aktin*, *HPRT* und *Cyclophilin B*.

Eine Änderung der Genexpression der Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges durch die Überexpression von SFRP2-GFP konnte nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.6.28). Die Expressionswerte der untersuchten Gene lagen nach Normalisierung in der Zelllinie AsPC-1 zwischen  $1 \times 10^{-2}$  und 1. Eine niedrige Expression wurde für *JUN*, *MYC* und *CyclinD1* gemessen. *JUN* und *MYC* zeigten in transfizierten Zellen eine leichte Erhöhung der Expressionswerte auf ca.  $1 \times 10^{-1}$ . Die Expressionswerte für MiaPaCa-2- und Panc1-Zellen lagen jeweils zwischen  $1 \times 10^{-3}$  bis ca. 1. *JUN* war in beiden Zelllinien am geringsten exprimiert.

Die Expressionswerte für SFRP2 betragen  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-3}$  in den nicht transfizierten Zellen aller Zelllinien. In den transfizierten Zellen aller Linien lagen die Werte bei 10-100.





**Abb. 3.6.28:** Vergleich der Expression von am kanonischen Wnt-/β-Catenin-Signalweg beteiligten Genen in Zelllinien, die mit dem *SFRP2-GFP*-Konstrukt transfiziert wurden (rot) gegen nicht transfizierte Zellen (blau), nach 24 stündiger Inkubation mittels quantitativer PCR. Die Expression auf Transkriptebene von zentralen Proteinen des Signalweges war sowohl in den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, MiaPaCa-2 und Panc1 nach Transfektion unverändert. Das PCR-Programm enthielt 42 Zyklen, die Gene *β-Aktin*, *HPRT* und *Cyclophilin B* dienen zur Normalisierung. Die Expressionsänderung ist logarithmisch aufgetragen.

Eine messbare Änderung der Genexpression in den Pankreaskarzinomzelllinien durch die SFRP2-GFP-Überexpression trat nicht auf.

Die Überexpression von SFRP2-GFP führte zu einem Proliferationsstopp und einer erhöhten Apoptose in den drei untersuchten Zelllinien AsPC-1, Panc1 und MiaPaCa-2. Bei letzterer Zelllinie, die die höchsten Transfektionseffizienzen zeigt, konnte zum Teil eine Inhibierung der Proliferation und eine insgesamt höhere Apoptoserate auch bei nicht transfizierten Zellen im gleichen Ansatz beobachtet werden. Eine Sekretion des Proteins und ein potentieller parakriner Effekt bei MiaPaCa-2-Zellen wäre möglich. Die Überexpression änderte die Genexpression von intrazellulären Komponenten des kanonischen Wnt-Signalweges jedoch nicht.

### **3.7 Prognostische Relevanz spontaner Antikörperantworten und von Genexpressionsmustern im PDAC**

Die eingesetzten Proben von PDAC-Patienten wurden auf Grund der Verfügbarkeit von Patientendaten und korrespondierender Seren, RNA-Proben und Gewebe ausgewählt (siehe Kapitel 2.1.9). Die klinischen Daten erlaubten es mit den experimentell gewonnenen Daten aus der Multiplex-Serologie und der Genexpressionsanalyse uni- und multivariate Überlebensanalysen durchzuführen.

Die klinischen Parameter Alter, Geschlecht, Resektionsstatus des Tumors, erhaltene neoadjuvante Therapie und Tumormetastasierung flossen als Variablen in die multivariate Überlebensanalyse ein.

Zu allen in der Multiplex-Serologie eingesetzten 236 Patientenseren lagen klinische Daten vor, jedoch nur zu 64 Proben der Genexpressionsanalyse. Die Altersverteilung lag zwischen 31,8 bis 84,3 Jahren mit einem Median von 64,7 Jahren bei den Patienten aus dem EPZ und zwischen 33,4 bis 77 Jahren mit einem Median von 63,8 im CapRI-Kollektiv. Das Kontrollkollektiv besaß eine Verteilung von 46 bis 66 Jahren mit einem Median von 54,5 Jahren. Die Geschlechterverteilung lag bei 59 % Männern zu 41 % Frauen für die EPZ-Proben beziehungsweise 56 % zu 44 % im CapRI-Kollektiv. Bei den EPZ-Patienten war der Tumor bei 48 % vollständig resektiert und in jeweils 23 % entweder noch mikroskopisch oder makroskopisch nachweisbar. Im CapRI-Kollektiv waren 57 % der Proben vollständig resektierte Tumoren und 43 % noch mikroskopisch nachweisbar. Eine neoadjuvante Therapie erhielten 14 % der Patienten aus dem EPZ- und keiner im CapRI-Kollektiv.

Für die in der Genexpressionsanalyse untersuchten RNA-Proben umfasste die Altersverteilung 31,8 bis 81,3 Jahre mit einem Median von 65,3 Jahren. Die Geschlechterverteilung lag bei 53 % Männern zu 47 % Frauen. Die Resektion war bei 70 % der Patienten vollständig, bei 16 % mikroskopisch und bei 11 % makroskopisch nachweisbar. 19 % der Patienten waren neoadjuvant behandelt worden.

Die vollständige Auflistung aller Parameter und dazugehöriger Werte befindet sich in Kapitel 2.1.9.

#### ***3.7.1 Multivariate Überlebensanalyse zur Relevanz der induzierten Antikörperantworten im Pankreaskarzinom***

Die multivariate Analyse zum Einfluss von Antikörperantworten gegen ein Protein auf das Überleben der Patienten wurde nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox in der Arbeitsgruppe Biostatistik am DKFZ durchgeführt (siehe Kapitel 2.6). Von 236 Datensätzen mussten jedoch 12 verworfen werden, da hier eindeutige Daten zu Folgeuntersuchungen oder zum Todeszeitpunkt fehlten. Dies betraf ausschließlich Seren des EPZ-Kollektivs, davon primär Seren des N1M1-Metastasierungsgrades. Der verbliebene Datensatz, bestehend aus 133 Seren des EPZ- und 91 des CapRI-Kollektivs, wurde zuerst auf die Relevanz der klinischen Parameter auf das Überleben der Patienten mittels univariater Regressionsanalyse überprüft. Die Existenz von Metastasen, sowohl nur in

Lymphknoten als auch Fernmetastasen, war signifikant für das Überleben der Patienten im untersuchten Kollektiv und hatte einen negativen Effekt auf das Überleben mit einer „Hazard Ratio“ (HR) von 1,89 beziehungsweise 3,95 (siehe Tab. 3.7.1).

**Tab. 3.7.1: Univariate Regressionsanalyse zum Einfluss eines klinischen Parameters auf das Überleben von PDAC-Patienten.** Statistisch signifikante Werte eines Parameters sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt des Parameters auf das Überleben. Werte >1 entsprechen einem negativen Effekt, <1 einem positiven Effekt. Dieser Wert sollte im Konfidenzintervall liegen, das mit der unteren und oberen Schranke angegeben ist.

<b>Klinischer Parameter</b>	<b>coef</b>	<b>exp(coef)</b>	<b>Konfidenzintervall</b>	<b>p-Wert</b>
Alter	0,01	1,01	0,99-1,03	0,178
Resektionsstatus	0,17	1,20	0,84 - 1,70	0,317
Geschlecht	-0,00	1,00	0,71 - 1,40	0,999
Neoadjuvante Chemotherapie	- 0,28	0,75	0,35 - 1,36	0,475
Patient mit N1M0-Grad	0,63	1,89	1,15 - 3,08	<b>0,011</b>
Patient mit N1M1-Grad	1,37	3,95	2,15 - 7,27	<b>&lt; 0,001</b>

Die Anzahl an Seren, in denen Antikörper gegen die jeweiligen Proteine nachgewiesen werden konnten, war mit 105 von 236 gering. Gegen acht Proteine (ACSL4v2, CNIH, LUM, NDUFB5, SPP1v1 & v2, TGFBR2v2 und UBE2V1v4) konnten keine Serumantikörper detektiert und gegen weitere acht Proteine konnten maximal zwei positive Seren (ANXA1, CYR61, GADD45a, HIGD1Av1, SFRP2, SGK1v1, SNAP25v2 und der N-terminale Teil von TGFBR2v2) identifiziert werden.

Die multivariate Analyse zeigte, dass nur im Fall der spezifischen Antikörperantworten gegen das Protein RGS5 ein statistisch signifikanter Einfluss mit einem stark negativen Effekt (HR=3,14) auf das Überleben von Patienten gegeben war (siehe Tab. 3.7.2). Für RGS5 konnten acht positive Seren identifiziert werden.

**Tab. 3.7.2: Multivariate Überlebensanalyse für proteinspezifische Antikörperantworten nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox.** Statistisch signifikante Werte der Antikörperantworten gegen ein Protein sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. In das Modell eingeflossene Variablen waren neben der Antikörperantwort das Alter, der Tumorsektionsrand, das Geschlecht, erhaltene Therapien und der Metastasierungsgrad. Die Spalte exp(coef) gibt das "Hazard Ratio" an, den Effekt der induzierten Antikörperantwort auf das Überleben. Werte >1 entsprechen einem negativen Effekt, <1 einem positiven Effekt. Dieser Wert sollte im Konfidenzintervall liegen, das mit der unteren und oberen Schranke angegeben ist.

<b>Protein</b>	<b>coef</b>	<b>exp(coef)</b>	<b>Konfidenzintervall</b>	<b>p-Wert</b>
ACSL4v2	---	---	---	---
ANXA1	0,25	1,28	0,16 - 10,07	0,8118
BMI1	0,14	1,15	0,34 - 3,85	0,8175
CALUv1	- 0,01	0,99	0,48 - 2,04	0,9722
CNIH	---	---	---	---
CYR61	1,09	2,96	0,40 - 21,82	0,2868
C8orf4	- 0,80	0,45	0,18 - 1,11	0,0824
GADD45a	- 0,02	0,98	0,30 - 3,18	0,9680
HIGD1Av1	1,04	2,83	0,38 - 20,99	0,3101
HIGD1Av2	0,44	1,55	0,48 - 5,05	0,4657
HMG3v1	0,15	1,17	0,70 - 1,94	0,5512
LUM	---	---	---	---
MPHOSPH6	0,26	1,30	0,65 - 2,58	0,4594
NAP1L1	- 0,90	0,40	0,06 - 2,94	0,3709
NDUFB5	---	---	---	---
PAICSv1	0,40	1,49	0,63 - 3,51	0,3626
PAICSv2	- 0,34	0,72	0,09 - 5,48	0,7470
PSAT1v1	0,30	1,35	0,42 - 4,33	0,6121
RGS5	1,14	3,14	1,44 - 6,86	<b>0,0041</b>
RPL23a	- 0,33	0,72	0,41 - 1,26	0,2495
SCYE1v1	0,34	1,40	0,84 - 2,35	0,1999
SCYE1v3	0,44	1,55	0,84 - 2,84	0,1606
SFRP2	- 15,30	0,00	0,00 - 0,00	0,9925
SGK1v1	- 0,37	0,69	0,09 - 5,15	0,7200
SNAP25v2	1,55	4,72	0,62 - 36,1	0,1353
SPP1v1	---	---	---	---
SPP1v2	---	---	---	---
TGFBR2v2 Volllänge	---	---	---	---
TGFBR2v2 N-Terminus	0,68	1,98	0,48 - 8,2	0,3485
UBE2B	- 0,02	0,98	0,30 - 3,18	0,9681
UBE2D1	0,09	1,09	0,52 - 2,26	0,8185
UBE2V1v4	---	---	---	---
UBQLN1	- 0,27	0,76	0,24 - 2,47	0,6541

### ***3.7.2 Uni- und multivariate Überlebensanalyse zur Relevanz der Genexpression im Pankreaskarzinom***

Analog der Analyse der Serologiedaten wurde mit Hilfe der Patientendaten eine multivariate Analyse des Einflusses der Expression des jeweiligen Gens auf das Überleben der Patienten nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox durchgeführt (siehe Kapitel 2.6). Darüber hinaus wurde eine univariate Regressionsanalyse der Expression aufgeteilt auf die Daten der einzelnen Metastasierungsgrade eingeschlossen, um Unterschiede zwischen den Graden zu identifizieren. Von 64 Patientendatensätzen konnten 63 für die Analyse verwendet werden.

Eine vorherige univariate Regressionsanalyse der klinischen Parameter aus den Patientendaten zeigte eine Signifikanz für den N1M0-Metastasierungsgrad mit einem negativen Effekt auf das Überleben (HR=2,20) (siehe Tab. 3.7.3). Für den Einfluss einer neoadjuvanten Chemotherapie (p= 0,089; HR=0,46) und den N1M1-Metastasierungsgrad (p=0,078; HR=2,45) auf das Überleben konnte eine Tendenz beobachtet werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

**Tab. 3.7.3: Univariate Regressionsanalyse zum Einfluss eines klinischen Parameters auf das Überleben von PDAC-Patienten.** Statistisch signifikante Werte eines Gens sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt des Parameters auf das Überleben. Werte >1 entsprechen einem negativen Effekt, <1 einem positiven Effekt. Dieser Wert sollte im Konfidenzintervall liegen, das mit der unteren und oberen Schranke angegeben ist.

Klinischer Parameter	coef	exp(coef)	Konfidenzintervall	p-Wert
Alter	0,01	1,01	0,98-1,03	0,512
Resektionsstatus	0,25	1,28	0,81 - 2,02	0,288
Geschlecht	-0,34	0,71	0,40 - 1,27	0,246
Neoadjuvante Chemotherapie	- 0,78	0,46	0,19 - 1,12	0,089
Patient mit N1M0-Grad	0,79	2,20	1,02 - 4,77	<b>0,045</b>
Patient mit N1M1-Grad	0,90	2,45	0,91 - 6,62	0,078

Die univariate Überlebensanalyse identifizierte fünf Gene (*ANXA1*, *BMII*, *CNIH*, *SGK1v1*, *UQLN1*), deren Expression abhängig vom Metastasierungsgrad einen signifikanten Einfluss auf das Überleben von PDAC-Patienten hatte (siehe Tab. 3.7.4). Dabei handelte es sich ausnahmslos um das N0M0-Stadium. Die Expression der Gene hatte hier einen unterschiedlichen Effekt auf das Überleben und war entweder positiv für *ANXA1* (HR=0,41) und *CNIH* (HR=0,18) oder negativ für *BMII* (HR=2,92), *SGK1v1* (HR=2,00) und *UBQLN1* (HR=1,71).

**Tab. 3.7.4: Univariate Regressionsanalyse zum Einfluss eines Gens auf das Überleben je Metastasierungsstadium für statistisch signifikante Gene.** Statistisch signifikante Werte eines Gens im jeweiligen Metastasierungsstadium sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt der Expression auf das Überleben. Werte >1 entsprechen einem negativen Effekt, <1 einem positiven Effekt. Das Konfidenzintervall ist im den Spalten "untere/obere Schranke" angegeben.

Gen	coef	exp(coef)	Konfidenzintervall	Standardfehler	z	p (> z )
<i>ANXA1</i> N0M0	- 0,90	0,41	0,17 - 0,99	0,46	- 1,98	<b>0,0482</b>
<i>ANXA1</i> N1M0	- 0,03	0,97	0,82 - 1,15	0,09	- 0,35	0,7282
<i>ANXA1</i> N1M1	- 0,41	0,66	0,23 - 1,91	0,54	- 0,77	0,4440
<i>BMII</i> N0M0	2,00	7,42	1,85 - 29,72	0,71	2,83	<b>0,0047</b>
<i>BMII</i> N1M0	0,33	1,40	0,82 - 2,37	0,27	1,24	0,2145
<i>BMII</i> N1M1	1,07	2,92	0,46 - 18,57	0,94	1,13	0,2566
<i>CNIH</i> N0M0	- 1,70	0,18	0,04 - 0,92	0,82	- 2,06	<b>0,0393</b>
<i>CNIH</i> N1M0	- 0,04	0,96	0,68 - 1,36	0,18	- 0,24	0,8107
<i>CNIH</i> N1M1	- 0,64	0,53	0,11 - 2,61	0,82	- 0,78	0,4329
<i>SGK1v1</i> N0M0	0,69	2,00	1,09 - 3,65	0,31	2,24	<b>0,0249</b>
<i>SGK1v1</i> N1M0	0,08	1,08	0,85 - 1,37	0,12	0,64	0,5254
<i>SGK1v1</i> N1M1	0,32	1,38	0,54 - 3,54	0,48	0,67	0,5007
<i>UBQLN1</i> N0M0	0,53	1,71	1,00 - 2,90	0,27	1,97	<b>0,0485</b>
<i>UBQLN1</i> N1M0	0,08	1,08	0,90 - 1,30	0,09	0,84	0,4028
<i>UBQLN1</i> N1M1	- 2,54	0,08	0,01 - 1,13	1,36	- 1,87	0,0615

In der robusteren und die klinischen Parameter einbeziehenden multivariaten Überlebensanalyse war die Expression von fünf Genen (*BMII*, *CALUv1*, *GPM6A*, *RGS5* und *SNAP25v2*) signifikant, von denen nur die Expression von *CALUv1* (HR=0,68) einen positiven Effekt auf das Überleben besaß (siehe Tab. 3.7.5).

**Tab. 3.7.5: Multivariate Überlebensanalyse für alle Gene nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox für alle PDAC-Patienten mit klinischen Daten.** Statistisch signifikante Werte eines Gens sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. In das Modell eingeflossene Variablen waren neben der Genexpression das Alter, der Tumorsektionsrand, das Geschlecht, erhaltene Therapien und der Metastasierungsgrad. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt der Expression auf das Überleben. Werte >1 entsprechen einem negativen Effekt, <1 einem positiven Effekt. Das Konfidenzintervall ist in den Spalten "untere/obere Schranke" angegeben.

Gen	coef	exp(coef)	Konfidenzintervall	Standardfehler	z	p (> z )
<i>ACSL4v2</i>	0,29	1,34	0,98 - 1,83	0,16	1,84	0,0661
<i>ANXA1</i>	- 0,10	0,90	0,73 - 1,11	0,10	- 1,00	0,3165
<i>BMII</i>	0,89	2,43	1,39 - 4,26	0,29	3,11	<b>0,0019</b>
<i>CALUv1</i>	- 0,38	0,68	0,48 - 0,98	0,18	- 2,09	<b>0,0368</b>
<i>CNIH</i>	- 0,21	0,81	0,54 - 1,21	0,20	- 1,01	0,3120
<i>CYR61</i>	0,25	1,29	0,99 - 1,67	0,13	1,89	0,0590
<i>C8orf4</i>	0,04	1,04	0,88 - 1,21	0,08	0,44	0,6625
<i>GADD45a</i>	- 0,07	0,93	0,64 - 1,35	0,19	- 0,38	0,7003
<i>GPM6A</i>	0,25	1,28	1,03 - 1,59	0,11	2,25	<b>0,0242</b>
<i>HIGD1Av1</i>	- 0,29	0,75	0,49 - 1,14	0,21	- 1,35	0,1754
<i>HIGD1Av2</i>	0,15	1,16	0,90 - 1,49	0,13	1,15	0,2490
<i>HMGN3v1</i>	0,37	1,44	0,96 - 2,18	0,21	1,75	0,0795
<i>LUM</i>	- 0,13	0,88	0,72 - 1,08	0,10	- 1,23	0,2183
<i>MPHOSPH6</i>	0,49	1,62	0,83 - 3,20	0,35	1,41	0,1600
<i>NAPIL1</i>	0,02	1,02	0,70 - 1,48	0,19	0,11	0,9147
<i>NDUFB5</i>	- 0,01	0,99	0,51 - 1,94	0,34	- 0,03	0,9785
<i>PAICSv2</i>	- 0,49	0,61	0,34 - 1,11	0,30	- 1,62	0,1046
<i>PPAP2B</i>	0,16	1,17	0,85 - 1,62	0,16	0,97	0,3318
<i>PSAT1v1</i>	0,12	1,12	0,92 - 1,37	0,10	1,16	0,2443
<i>RGS5</i>	0,23	1,26	1,01 - 1,57	0,11	2,05	<b>0,0406</b>
<i>RPL23a</i>	0,04	1,04	0,73 - 1,47	0,18	0,20	0,8409
<i>SCYE1v1</i>	0,24	1,27	0,58 - 2,78	0,40	0,59	0,5526
<i>SCYE1v3</i>	0,05	1,05	0,63 - 1,74	0,26	0,19	0,8521
<i>SFRP2</i>	- 0,11	0,90	0,72 - 1,12	0,11	- 0,96	0,3365
<i>SGK1v1</i>	0,22	1,25	0,99 - 1,57	0,12	1,90	0,0574
<i>SNAP25v2</i>	0,23	1,26	1,03 - 1,54	0,10	2,20	<b>0,0275</b>
<i>SPP1v1</i>	0,07	1,08	0,90 - 1,28	0,09	0,82	0,4147
<i>STEAP1</i>	- 0,19	0,83	0,59 - 1,16	0,17	- 1,11	0,2665
<i>TGFBR2v2</i>	- 0,05	0,95	0,67 - 1,35	0,18	- 0,31	0,7603
<i>UBE2B</i>	0,48	1,62	0,86 - 3,07	0,32	1,49	0,1367
<i>UBE2D1</i>	0,09	1,09	0,84 - 1,41	0,13	0,67	0,5052
<i>UBE2V1v4</i>	0,14	1,15	0,83 - 1,60	0,17	0,87	0,3860
<i>UBQLN1</i>	0,12	1,13	0,95 - 1,34	0,09	1,36	0,1741

Eine auf die Patienten mit N1M0 klassifizierten Tumoren beschränkte multivariate Überlebensanalyse berechnete die Expression der Gene *CYR61* (HR=1,67) und *UBE2B* (HR=2,35) als signifikant für das Überleben in dieser Patientengruppe (siehe Tab. 3.7.6).

**Tab. 3.7.6: Multivariate Überlebensanalyse für alle Gene nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox für Patienten mit einem Metastasierungsgrad N1M0 des Tumors.** Statistisch signifikante Werte eines Gens sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. In das Modell eingeflossene Variablen waren neben der Genexpression das Alter, der Tumorresektionsrand, das Geschlecht und erhaltene Therapien. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt der Expression auf das Überleben. Werte >1 entsprechen einem negativen Effekt, <1 einem positiven Effekt. Das Konfidenzintervall ist in den Spalten "untere/obere Schranke" angegeben.

Gen	coef	exp(coef)	Konfidenzintervall	Standardfehler	z	p (> z )
<i>ACSL4v2</i>	0,07	1,07	0,73 - 1,56	0,19	0,35	0,7295
<i>ANXA1</i>	- 0,03	0,97	0,80 - 1,18	0,10	- 0,32	0,7473
<i>BMI1</i>	0,44	1,56	0,75 - 3,24	0,37	1,19	0,2358
<i>CALUv1</i>	- 0,31	0,73	0,46 - 1,15	0,23	- 1,36	0,1743
<i>CNIH</i>	- 0,02	0,98	0,70 - 1,39	0,17	- 0,09	0,9243
<i>CYR61</i>	0,51	1,67	1,11 - 2,52	0,21	2,45	<b>0,0144</b>
<i>C8orf4</i>	0,00	1,00	0,82 - 1,21	0,10	0,00	0,9983
<i>GADD45a</i>	0,02	1,02	0,64 - 1,62	0,24	0,09	0,9320
<i>GPM6A</i>	0,07	1,07	0,81 - 1,42	0,14	0,50	0,6201
<i>HIGD1Av1</i>	0,01	1,01	0,74 - 1,37	0,16	0,03	0,9737
<i>HIGD1Av2</i>	0,08	1,09	0,61 - 1,95	0,30	0,28	0,7808
<i>HMGN3v1</i>	0,28	1,32	0,79 - 2,21	0,26	1,05	0,2949
<i>LUM</i>	- 0,12	0,89	0,67 - 1,18	0,14	- 0,82	0,4125
<i>MPHOSPH6</i>	0,13	1,14	0,52 - 2,52	0,40	0,33	0,7402
<i>NAPIL1</i>	-0,02	0,98	0,60 - 1,61	0,25	-0,06	0,9507
<i>NDUFB5</i>	- 0,22	0,80	0,36 - 1,81	0,41	- 0,53	0,5986
<i>PAICSv2</i>	- 0,24	0,79	0,36 - 1,70	0,39	- 0,61	0,5430
<i>PPAP2B</i>	-0,06	0,94	0,61 - 1,45	0,22	-0,29	0,7711
<i>PSAT1v1</i>	-0,03	0,97	0,75 - 1,27	0,14	-0,20	0,8412
<i>RGS5</i>	0,18	1,20	0,90 - 1,60	0,15	1,21	0,2248
<i>RPL23a</i>	0,23	1,26	0,75 - 2,11	0,26	0,87	0,3824
<i>SCYE1v1</i>	-0,16	0,85	0,27 - 2,66	0,58	-0,28	0,7830
<i>SCYE1v3</i>	0,31	1,36	0,64 - 2,88	0,38	0,80	0,4248
<i>SFRP2</i>	- 0,15	0,56	0,66 - 1,14	0,14	- 1,04	0,2971
<i>SGK1v1</i>	0,13	1,14	0,87 - 1,49	0,14	0,95	0,3443
<i>SNAP25v2</i>	0,16	1,17	0,89 - 1,54	0,14	1,15	0,2493
<i>SPP1v1</i>	-0,11	0,90	0,71 - 1,14	0,12	-0,87	0,3862
<i>STEAP1</i>	0,12	1,13	0,75 - 1,70	0,21	0,56	0,5738
<i>TGFBR2v2</i>	- 0,13	0,88	0,56 - 1,37	0,23	- 0,57	0,5700
<i>UBE2B</i>	0,86	2,35	1,05 - 5,27	0,41	2,08	<b>0,0372</b>
<i>UBE2D1</i>	0,01	1,01	0,72 - 1,40	0,17	0,03	0,9733
<i>UBE2V1v4</i>	0,25	1,28	0,79 - 2,08	0,25	1,01	0,3137
<i>UBQLN1</i>	0,08	1,08	0,88 - 1,33	0,11	0,72	0,4723

Nur Antikörperantworten gegen RGS5 waren in der multivariaten Analyse prognostisch signifikant.

Dagegen war die Expression von *ANXA1*, *BMI1*, *CNIH*, *SGK1v1* und *UBQLN1* in der univariaten und von *BMI1*, *CALUv1*, *GPM6A*, *RGS5* und *SNAP25v2* in der multivariaten Überlebensanalyse signifikant und deutete auf diese Gene als prognostische Marker hin.

### 3.7.3 Überlebensanalyse zur Relevanz der Gewebeexpression von SFRP2 im Pankreaskarzinom

Die immunhistochemischen Färbungen der Tumor-„Arrays“ auf eine SFRP2-Expression im Pankreasgewebe (siehe Kapitel 3.6.1) verdeutlichten, dass in ca. 30 % der Proben die Tumorzellen negativ, dagegen in ca. 60 % der Proben positiv für SFRP2 waren. Das Stroma war hingegen in über 90 % der Proben positiv gefärbt. Daher wurde in einer multivariaten Überlebensanalyse ein möglicher Einfluss der SFRP2-Expression in den Tumorzellen untersucht.

Für diese Analyse konnten die klinischen Parameter Alter, Geschlecht und Tumormetastasierung als Variablen berücksichtigt werden. Die Altersverteilung betrug 37,3 bis 84,6 Jahre mit einem Median von 65,3 Jahren. Die Geschlechterverteilung lag bei 52 % Männern zu 48 % Frauen. Die vorherige univariate Regressionsanalyse dieser klinischen Parameter aus den Patientendaten zeigte eine Signifikanz des Alters auf das Überleben (siehe Tab. 3.7.7). Tendentiell hatte der N1M1-Metastasierungsgrad ( $p=0,085$ ;  $HR=2,21$ ) einen negativen Einfluss auf das Überleben, der nicht statistisch signifikant war.

**Tab. 3.7.7: Univariate Regressionsanalyse zum Einfluss eines klinischen Parameters auf das Überleben von PDAC-Patienten.** Statistisch signifikante Werte eines Parameters sind in der Spalte des p-Wertes fett gekennzeichnet. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt des Parameters auf das Überleben. Werte  $>1$  entsprechen einem negativen Effekt,  $<1$  einem positiven Effekt. Dieser Wert sollte im Konfidenzintervall liegen, das mit der unteren und oberen Schranke angegeben ist.

Klinischer Parameter	coef	exp(coef)	Konfidenzintervall	p-Wert
Alter	0,02	1,02	1,00-1,04	<b>0,043</b>
Geschlecht	-0,21	0,81	0,56 - 1,18	0,272
Patient mit N1M0-Grad	-0,01	0,99	0,60 - 1,64	0,962
Patient mit N1M1-Grad	0,79	2,21	0,90 - 5,45	0,085

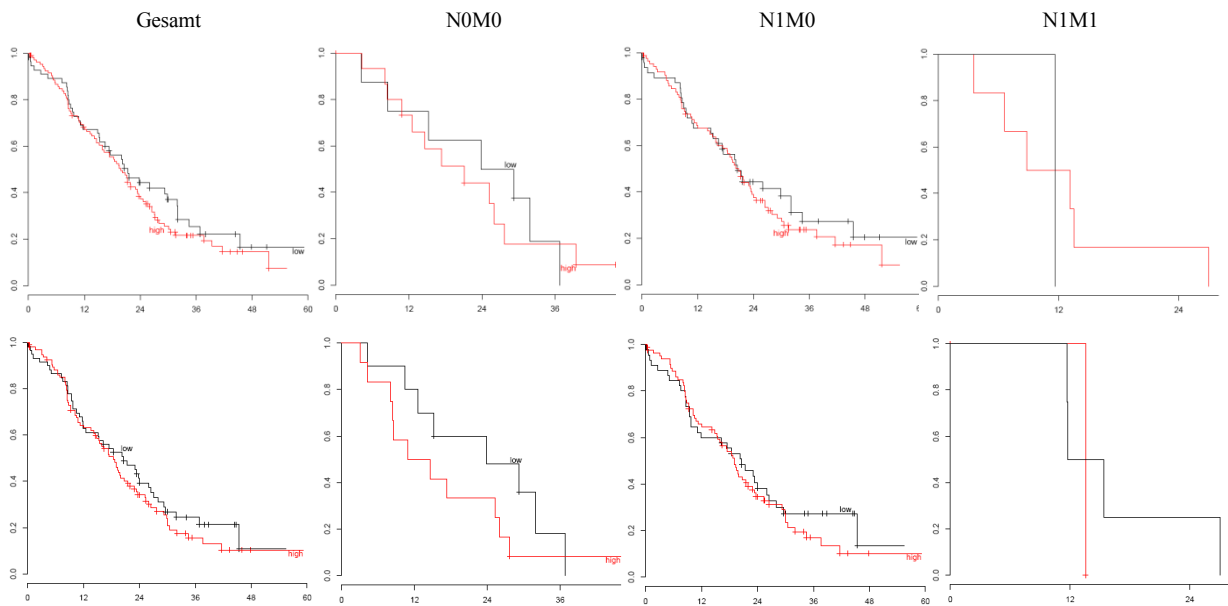
Die SFRP2-Expression in Tumorzellen war in keinem Fall signifikant für das Überleben, unabhängig von der Betrachtung des Metastasierungsgrades als auch der Herkunft der Gewebeprobe (siehe Tab. 3.7.8).

**Tab. 3.7.8: Multivariate Überlebensanalyse für die Gewebeexpression von SFRP2 der Tumorgewebe-„Arrays“ nach der proportionalen "Hazard"-Methode nach Cox.** In das Modell eingeflossene Variablen waren neben der Proteinexpression das Alter, das Geschlecht und das Metastasierungsstadium. Die Spalte exp(coef) gibt die "Hazard Ratio" an, den Effekt der Expression auf das Überleben. Werte  $>1$  entsprechen einem negativen Effekt,  $<1$  einem positiven Effekt. Das Konfidenzintervall ist in den Spalten "untere/obere Schranke" angegeben.

Lokalisation/Klassifikation	coef	exp(coef)	Konfidenzintervall	p-Wert
Zentral / Gesamt	0,11	1,11	0,76 - 1,64	0,5877
Zentral / N0M0	- 0,36	0,70	0,22 - 2,23	0,5436
Zentral / N1M0	0,13	1,14	0,74 - 1,75	0,5635
Zentral / N1M1	0,18	1,20	0,05 - 30,09	0,9110
Peripher / Gesamt	0,23	1,26	0,86 - 1,85	0,2346
Peripher / N0M0	0,40	1,50	0,48 - 4,72	0,4891
Peripher / N1M0	0,21	1,24	0,80 - 1,90	0,3379
Peripher / N1M1	17,90	$5,9 \times 10^7$	$0,00 - 10^4$	0,7941



Die Überlebensverläufe der PDAC-Patienten mit und ohne SFRP2-Expression in den Tumorzellen in zentralem und peripherem Tumorgewebe unterschieden sich nicht signifikant (siehe Abb. 3.7.1).



**Abb. 3.7.1: Überlebensverläufe als Kaplan-Meier-Diagramme von PDAC-Patienten mit (high, rote Linie) und ohne (low, schwarze Linie) SFRP2-Expression in Tumorzellen von zentralem (oben) und peripherem (unten) Tumorgewebe.** Die Diagramme enthalten alle Patienten, N0M0, N1M0 beziehungsweise N1M1 klassifizierte (von links nach rechts). Die Abszisse zeigt die Monate an.

Die SFRP2-Expression in Tumorzellen hatte demnach keine prognostische Aussage für das Überleben.

## 4 Diskussion

Sowohl die Optionen zur Diagnose als auch zur Therapie des pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC) sind derzeit unzureichend, sodass die Überlebensprognosen für Patienten sehr gering sind. Das Ziel dieser Arbeit war, potentielle diagnostisch und/oder prognostisch relevante Biomarker und tumorrelevante Proteine im PDAC zu identifizieren. Die Expressionsdaten selektierter Gene und Serumantikörperantworten gegen exprimierte Proteine wurden mit Patientendaten korreliert, um jeweils ihr diagnostisches, prädiktives oder prognostisches Potential zu evaluieren. Das in CP-Gewebe und im Tumorstroma überexprimierte Protein SFRP2 wurde hinsichtlich der Expressionsregulation und der zellulären Funktion näher charakterisiert.

### 4.1 Selektion von Genen mittels *in silico*-Analysen und semi-quantitativer PCR

Als Ausgangsdaten für das Projekt stand eine Genliste zur Verfügung, deren exprimierte Proteine in einem „Yeast Survival Screening“ einen anti-apoptotischen Effekt auf die verwendeten Hefezellen besaßen. Das „Screening“ ist eine geeignete Methode zur Identifizierung potentiell anti-apoptotischer Proteine, von denen einige hinsichtlich dieser Funktion und ihrer tumorbiologischen Rolle evaluiert wurden (Brezniceanu *et al.*, 2003; Rabenhorst *et al.*, 2009; Eißmann *et al.*, 2012). Diese potentielle Funktion stand für diese Arbeit jedoch nicht im Vordergrund, da für einen Biomarker alleinig dessen Nachweis und Relevanz für die Krebserkrankung ausschlaggebend sind und tumorrelevante Proteine mit einem Therapiepotenzial neben der Apoptose auch in einem weiteren Merkmal der Karzinogenese wie z.B. der Angiogenese beteiligt sein können (Sawyers, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011). Als Selektionsparameter zur Reduzierung der Anzahl der vorliegenden Gene wurden daher eine differentielle Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe, die Proteinlokalisierung als auch die -funktion und unter Berücksichtigung des Interaktionskontextes gewählt.

Es lagen 246 zu analysierende Gene vor, für die eine Selektionsstrategie basierend auf *in silico*-Analysen mit frei verfügbaren Datenbanken als auch kommerziellen Programmen unter bestimmten Selektionsparametern als erster Schritt präferiert wurde. Die methodischen Ansätze von Harsha *et al.* sowie Li *et al.* demonstrieren, dass *in silico*-Analysen mit Datenbanken und Interaktionsprogrammen eine Option zur Identifizierung von Genen hinsichtlich einer bestimmten Fragestellung und zur Reduzierung der Anzahl von Analyten sind (Li *et al.*, 2008; Harsha *et al.*, 2009). Das für diese Arbeit aufgestellte Selektionsschema (siehe Abb. 3.1.1) ermöglichte, aus 246 Genen mit den Mitte 2009 veröffentlichten Daten 51 interessante Gene zu selektieren. Wie die Abbildungen 3.1.2, 3.1.3 und 3.2.3 verdeutlichen, konnte das Verhältnis der Funktionen und Lokalisationen der Proteine nach der Selektion mit nur geringen Veränderungen beibehalten werden. Eine Verzerrung der Verhältnisse durch methodisch bedingte Faktoren trat somit nicht auf.

Da alle Analysen auf zum Zeitpunkt veröffentlichten Daten basieren, sind die Ergebnisse nicht statisch und können sich mit der Zeit ändern. Die selektierten Gene stellten daher die im August 2009 als am geeignetsten für weitere Analysen angesehenen Gene dar. Einige von diesen waren zum damaligen Zeitpunkt bereits als tumorassoziierte Antigene (TAA) in unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben und somit eine relevante Gruppe. Hierzu gehörten *BMII*, das als TAA im hepatozellulären Karzinom identifiziert wurde, *RGS5* in der Akuten Myeloischen Leukämie und *UBQLN1* im Ovarialkarzinom (Stone *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2006; Boß *et al.*, 2007). Gene wie *β-Catenin*, als ein zentrales Glied in der Wnt-Signaltransduktion, und *FLT3* waren kausal mit der Tumorentstehung und dem -wachstum in Verbindung gebracht (Takahashi 2011); White *et al.*, 2012).

Einige der Biomarker und Therapiezielstrukturen nutzen gezielt die differentielle und gewebespezifische Expression eines Gens zwischen Normal- und Tumorgewebe als Ansatzpunkt aus (siehe Kapitel 1.2.1 & 1.3). Exklusiv im Tumorgewebe (über-)exprimiert vorliegende Proteine sind geeignete Ziele, da gewünschte pharmakologische Effekte hauptsächlich das Tumor- und in geringerem Maße das Normalgewebe treffen. Daher wurde eine semi-quantitative Genexpressionsanalyse der selektierten Gene in einem RNA-Normalkollektiv verschiedener Gewebe als Möglichkeit angesehen, spezifische Expressionsmuster zu identifizieren. Da das kommerzielle RNA-Normalkollektiv aus vereinigten Proben mehrerer Spendergewebe bestand, minimierte sich eine individuelle Expressionsschwankung (siehe Kapitel 2.1.9.2). RNA aus neun Tumorzelllinien, die u.a. aus dem Melanom und dem Kolorektalen Karzinom stammten, ergänzte die Analyse um den Aspekt möglicher Expressionsmuster im Tumorgewebe. Tumorzelllinien können sich zwar in ihren Expressionsmustern vom Ursprungsgewebe unterscheiden, stellen im Normalfall jedoch ein gutes Modellsystem des jeweiligen Tumors dar (Hughes *et al.*, 2007). Eine detaillierte Genexpressionsanalyse mit Tumormaterial von Patienten sollte in einem späteren Schritt nach abgeschlossener Selektion der Gene erfolgen. Auch wenn bereits Expressionsdaten in der *in-silico* Analyse anhand der ArrayExpress-Datenbank eingeflossen waren, konnten nun experimentelle Daten auf eine definierte und für alle Gene identische RNA-Vorlage bezogen werden.

## **4.2 Klonierung der selektierten Gene, heterologe Expression in *E. coli* und Proteinausbeuten**

Für die Multiplex-Serologie mussten die selektierten Gene in den prokaryotischen Vektor pGEX4T3tag zur Expression als GST-Fusionsproteine kloniert werden. Hierzu wurde die RNA des Normalgewebekollektivs verwendet, das in der semi-quantitativen PCR eingesetzt wurde. Die jeweilige cDNA, in der die höchste Expression in der semi-quantitativen PCR gemessen wurde, diente als Vorlage für die Vollängenamplifizierung des jeweiligen Gens. Trotz Optimierungen in den PCR-Bedingungen und der Wahl verschiedener cDNAs ließen sich die vier Gene *FLT3*, *HEG1*, *PMS1* und *SPRED2* nicht amplifizieren. Als Gründe konnten die zum Teil gemessenen geringen Expressionsraten der Gene in der

cDNA (siehe Tab. 3.2.1) und besonders für *FLT3*, *HEG1* und *PMS1* deren Größen des offenen Leserasters von 2,8 kb bis 4,4 kb vermutet werden. Auch die Amplifizierung von *PSATv2* sowie *SGK1v2*, *-v3* und *-v4* war bislang nicht möglich, wobei zur Expression dieser Spleißvarianten anhand der semi-quantitativen PCR keine Aussagen gemacht werden konnten. Trotz des Fehlens von neun Genen konnten 35 Gene erfolgreich in den prokaryotischen Expressionsvektor kloniert werden.

Das *E. coli*-Expressionssystem ist für die Gewinnung von GST-Fusionsproteinen für die Multiplex-Serologie etabliert (Waterboer *et al.*, 2005; Waterboer *et al.*, 2008; Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht). Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, stellt es jedoch kein optimales Expressionssystem für humane Proteine dar und wurde von vornherein mit dem angepassten *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3)pLysS modifiziert (siehe Kapitel 3.3.2). Dennoch konnten die drei Proteine GPM6A, PPAP2B und STEAP, die integrale Membranproteine sind, nicht in ausreichenden Mengen löslich erhalten werden. Dabei können Membranproteine und insbesondere veränderte Muster ihrer posttranslationalen Modifizierung, wie sie z.B. für die Mucine beobachtet wird, eine Quelle für die Identifizierung von Markern mit Autoantikörperantworten sein (Wandall *et al.*, 2010). Bestimmte Varianten der Mucine sind im Pankreaskarzinom und dessen Vorstufen überexprimiert (Singh *et al.*, 2007, Yonezawa *et al.*, 2008).

Zur Lösung dieser Problematik wird die eukaryotische Expression der GST-Fusionsproteine im Zellkultursystem in der Arbeitsgruppe Jäger etabliert. Die eukaryotische Expression böte generell den Vorteil, dass die Proteine in jedem Fall ein natives Faltungsmuster besäßen und posttranslational modifiziert wären. Letzterer Punkt ist im prokaryotischen System nicht der Fall. Die Bedeutung dieser Modifikationen in der potentiellen Entstehung einer Erkrankung wegen eines veränderten Zellmetabolismus sowie einer veränderten Signaltransduktion und der Induzierung einer spezifischen Immunantwort durch Generierung neuer Epitope ist möglicherweise relevant (Depontieu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Ein weiterer potentiell wichtiger Aspekt bei der Betrachtung der Gen-/Proteinsequenzen sind die im Prozess der Karzinogenese akkumulierten Mutationen im Genom der entarteten Zellen. Die Relevanz der Mutationen zeigt sich in der Existenz einer eigenen Klasse von Tumorantigenen wie z.B. für P53 und  $\beta$ -Catenin, die auf Grund der Mutationen eine Immunantwort induziert haben (van den Broek *et al.*, 2010). Mit der zunehmenden Verfügbarkeit von Sequenzierungsdaten u.a. aus dem Internationalen Krebsgenomkonsortium („International Cancer Genome Consortium“, ICGC) in Datenbanken wie COSMIC und Anwendungen zur Analyse der Relevanz von Mutationen und veränderten posttranslationalen Modifikationen können diese Punkte zukünftig mit einbezogen und mutationsspezifische Proteine in der Serologie eingesetzt werden (Forbes *et al.*, 2011; Ndegwa *et al.*, 2011; Iengar, 2012).

Die genannten Punkte können als Möglichkeiten der Verbesserung des diagnostischen Potentials der Multiplex-Serologie im Hinblick auf die „Personalisierte Onkologie“ angesehen werden. Da jedoch unbekannt ist, ob bestimmte Aminosäureaustausche und veränderte posttranslationale Modifikationen in jedem Fall eine Antikörperantwort in einem Patienten induzieren, kann das Potential dieser Punkte

auf die Detektierung von Antikörperantworten nicht vorausgesagt werden. Dies bedarf einer genauen Evaluierung mit entsprechenden Proteinen und Serenkollektiven.

Die Validierung der exprimierten Proteine hinsichtlich ihrer Vollängenexpression und ihrem Gehalt im Bakterienlysat verlief für alle Protein erfolgreich (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Die erhaltenen Gesamtproteinkonzentrationen von 3,5 bis 24,6 mg/mL spiegelten zum einen die unterschiedliche Expressionseffizienz je nach Art und Aminosäurezusammensetzung eines Proteins in *E. coli* wider, zum anderen war dies nur ein ungefährender Wert für das Gesamtbakterienlysat und bot eine eher geringe Aussagekraft zum Gehalt an GST-Fusionsprotein. Im Titrations-ELISA konnte jedoch eine ausreichende Konzentration an GST-Fusionsprotein in allen Lysaten detektiert werden und bei einer Gesamtproteinkonzentration von 1 mg/mL eine Absorption von 0,5 und höher erreicht werden.

Die Titrationskurven erlaubten Rückschlüsse auf den Gehalt an GST-Fusionsprotein im Bakterienlysat (siehe Abb. 3.3.3). Bakterienlysate mit einem hohen Gehalt an GST-Fusionsprotein waren hoch verdünnbar und zeigten zuerst eine Plateau bei maximaler Absorption bis zu einer Abnahme wie z.B. die MPHOSPH6- und RPL23a-Lysate, andere mit niedrigem Gehalt fielen vom ersten Verdünnungsschritt ab wie z.B. das NDUFB5-Lysat.

Die Titrationskurven der mit dem anti-Tag-Antikörper detektierten Proteine waren mit dem Immunblot (siehe Abb. 3.3.2) dahingehend vergleichbar, dass Proteine mit einer Absorptionabnahme bei niedrigen Verdünnungen ebenfalls ein schwaches Bandensignal zeigten (z.B. beide Varianten von HIGD1A, SFRP2), während Proteine mit einem hohen Absorptionsplateau als Bande stark visualisiert waren.

Die Titrationskurven, die anhand des anti-GST-Antikörpers erhalten wurden, bestätigten die Ergebnisse des anti-Tag-Antikörpers. Jedoch waren die Kurvenverläufe inkonsistenter, was zum einen durch die Lage des Epitops zum anderen durch die detektierten Proteine erklärbar war. So liegt das Epitop der Glutathiontransferase näher an der stationären Phase als die Erkennungssequenz am C-Terminus und wäre bei Sättigung der vorhandenen Bindungsstellen potentiell schwerer zugänglich, sowohl für den primären als auch den sekundären Antikörper. Mit steigender Verdünnung würden sich sterische Hinderungen minimieren und könnten zum Teil zu Anstiegen der Absorption führen, wie bei SCYE1v1 und SNAP25v2 zu beobachten war. Weiterhin werden mit dem anti-GST-Antikörper auch Fusionsproteine detektiert, die vom C-Terminus aus fragmentiert oder proteolysiert sind aber noch an die stationäre Phase binden können. Je höher daher die Diskrepanz zwischen den Titrationskurven beider Antikörper eines Proteins wäre, desto höher wäre der Anteil dieser Proteinfragmente. Dies war jedoch selten der Fall und wäre im Beispiel bei ANXA1 und SCYE1v1 zu vermuten.

Die Evaluierung der Proteinestabilität zeigte zumindest für die untersuchten Proteine, die das gesamte Spektrum der Molekulargewichtsskala der exprimierten GST-Fusionsproteine abbildeten, keine Änderung über einen Zeitraum von zwei Wochen bei unterschiedlicher Glycerinkonzentration und wiederholter Lagerung auf Eis (siehe Abb. 3.3.4). Somit konnte von einer stabilen Messung in der Multiplex-Serologie ausgegangen werden.

### 4.3 Analyse der Patientenkollektive für die Multiplex-Serologie, die Genexpressions- und immunhistologische Analyse

Die Probenkollektive für die Multiplex-Serologie und die Genexpressionsanalyse wurden anhand der dokumentierten Patientendaten zusammengestellt (siehe Kapitel 2.1.9). Darüber hinaus konnten aus dem Europäischen Pankreaszentrum (EPZ), korrespondierende Seren-, RNA- und Gewebeproben erhalten werden, deren analysierte Daten einen Vergleich zwischen dem Auftreten einer Antikörperantwort, der Gen- und Proteinexpression erlauben sollten. Zu den RNA- und Gewebeproben des Normalgewebes und chronischer Pankreatitis standen keine Informationen über die Alters- oder Geschlechtsverteilung zur Verfügung, weswegen keine Aussage zur Vergleichbarkeit mit dem Patientenkollektiv getroffen werden kann.

Die Seren des Melanom-, Kontroll- und des CapRI-Kollektivs waren bereits im Rahmen anderer Studien zusammengestellt worden und konnten retrospektiv nicht durch RNA- und Gewebeproben erweitert werden (Schmidt *et al.*, 2007; Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht).

Das Melanomkollektiv von 368 Seren war anhand der UICC-Stadien eingeteilt mit 99 Proben in Stadium I, 86 Proben in Stadium II, 92 Proben in Stadium III und 91 Proben in Stadium IV. Somit waren pro Stadium ausreichend Proben vorhanden, um statistische Berechnungen durchführen und eine Aussage eines stadienabhängigen Auftretens von Antikörperantworten gegen ein Protein treffen zu können. Das Kontrollkollektiv umfasste 50 Seren, deren Spender eine Altersspanne von 46–66 Jahren mit einem Median von 54,5 Jahre hatten.

Das im Allgemeinen späte Auftreten sowie die sehr späte Diagnose des Pankreaskarzinoms manifestierte sich deutlich in den Seren-, RNA- und Gewebekollektiven der EPZ-Proben (siehe Kapitel 1.5.2 & 1.5.3). Der Altersmedian der Patienten in den Kollektiven lag jeweils bei 65-66 Jahren und damit nahe dem statistischen Median von ca. 70 Jahren (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Auflage, 2012). Die Altersspanne war mit 32-84 Jahren sehr groß. Die Geschlechterverteilung lag in allen EPZ-Probenkollektiven ähnlich bei ca. 55 zu 45 % Männer zu Frauen.

Auf Grund der späten Diagnose eines PDAC war der Großteil der Patienten mit einer Tumorgröße T3 klassifiziert, wodurch sie direkt in mindestens das Stadium II eingeordnet wurden. Dies galt für 80 % der 145 Serenproben und für ca. 94 - 95 % der 64 RNA- beziehungsweise 48 Gewebeproben. Lediglich 2 - 3 % der Proben stammten von Patienten, die mit kleineren Tumoren (T1 oder T2) diagnostiziert worden waren und somit Stadium I entsprachen, falls keine Metastasen vorlagen. Weitere 2 % der Patienten besaßen eine T4-Klassifikation und somit mindestens Stadium III.

Der Metastasierungsstatus wurde als einzige Möglichkeit der Einordnung der Patientenproben nach einem definierten Parameter identifiziert. Hierzu lagen die zwei Klassifikationen N für regionale Lymphknotenmetastasen und M für Fernmetastasen vor. Beide Parameter konnten 0 für nicht vorhanden oder 1 für vorhanden annehmen. Jeweils etwa 25 % der Seren, RNA- und Gewebeproben stammte von Patienten ohne Metastasen, was der Klassifikation N0M0 entsprach und je nach Tumorgröße einem Stadium von I bis III entsprechen konnte. Da der Großteil der Proben mit einer

Tumorgröße T3 beschrieben war, wären die meisten der N0M0-Proben dem Stadium IIa zuzuordnen. Sowohl für die Seren als auch die Gewebeproben lag laut Dokumentation für ca. 45 % der Patienten eine Lymphknotenmetastasierung (N1M0) und für ca. 30 % eine Fernmetastasierung (N1M1) vor. Die RNA-Proben waren zu ca. 60 % auf den Metastasierungsgrad N1M0 und zu 14 % auf N1M1 verteilt. Eine Lymphknotenmetastasierung entspricht minimal einem Stadium IIb, das für Tumorgrößen T1-3 gilt. Daher war dieses Stadium in den Proben überrepräsentiert. Eine Fernmetastasierung entspricht unabhängig aller weiterer Parameter einem Stadium IV.

Ähnliche Werte galten für die Proben des CapRI-Kollektivs, jedoch waren hier studienbedingt keine Seren von Patienten mit Fernmetastasen enthalten. Somit fehlten hier Proben für das Stadium IV vollständig. Etwa 20 % der Patienten waren mit einem N0M0- und die übrigen 80 % mit einem N1M0-Grad eingeordnet. Die Tumorgröße war für über 95 % der Patienten mit T3 angegeben. Somit entsprach der Hauptteil der Proben einem Stadium IIa oder IIb. Weiterhin war der Altersmedian als auch die Geschlechterverteilung übereinstimmend mit den EPZ-Proben.

Zu den Tumor-„Arrays“ für die Proteinexpressionsanalyse waren ebenfalls grundlegende klinische Daten erhältlich. Hier lag der Altersmedian bei 65,3 Jahren und die Geschlechterverteilung bei 52 zu 48 % Männer zu Frauen. Damit unterschieden sich die Werte nicht den anderen Pankreas-karzinomprobenkollektiven. Über 99 % der Tumoren der Patienten waren mit T3 eingestuft. Da ca. 14 % der Patienten einen N0M0-, ca. 80 % einen N1M0- und ca. 5 % einen N1M1-Metastasierungsgrad vermerkt hatten, konnten auch hier die Stadien IIa und IIb als überrepräsentiert identifiziert werden.

Auch wenn das Metastasierungsstadium eine Option zur Einteilung der Proben bietet, zeigt sich hier, dass das frühe Stadium I und das Stadium III mit jeweils unter 5 % der Proben abgedeckt waren. Der Großteil der Proben war in Stadium II eingeordnet. Dieses Bild zeigte sich in drei unabhängigen Kollektiven und verdeutlicht zum einen das Problem der späten Diagnose und zum anderen die Schwierigkeit, anhand einer geringen Anzahl von Proben aus dem frühen Stadium mögliche diagnostische Biomarker und relevante Strukturen zu identifizieren.

#### 4.4 Multiplex-Serologie

Die Multiplex-Serologie auf Basis der Luminex-Technologie ist bereits mehrfach eingesetzt worden, um Antikörper gegen ausgewählte Proteine in Seren von Krebspatienten als auch solchen mit Autoimmun- oder Infektionserkrankungen zu identifizieren (Waterboer *et al.*, 2005; Waterboer *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2010; Codices *et al.*, 2013; Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht). Das System besitzt als Grundlage die Kopplung exprimierter Proteine an farbcodierte „Beads“, über die derzeit maximal 500 Analyten pro Serum gemessen werden können. Für serologische Analysen einer höheren Zahl von Proteinen oder des Proteoms und *de novo*-Identifizierungen werden primär Protein-„Microarrays“ eingesetzt, da hier die Analytdichte höher ist (Gnjatic *et al.*, 2010; Massoner *et al.*, 2012). Nachteilig ist hier jedoch der geringere Probendurchsatz. Für diagnostische Zwecke als auch zur

Identifizierung einer selektierten Gruppe von Proteinen auf Antikörperantworten in einem großen Patientenkollektiv stellt die Multiplex-Serologie daher eine geeignete Methode dar.

#### ***4.4.1 Antikörperantworten im PDAC-, Melanom- und Kontrollkollektiv und identifizierte immunogene Proteine***

Die Ergebnisse der Multiplex-Serologie zeigten antikörperpositive Seren in allen Kollektiven, wobei mit ca. 65 % eine deutlich höhere relative Anzahl im Melanom- und Kontroll- gegenüber dem Pankreaskarzinomkollektiv mit 44 % bei 1x Schwellenwert existierte (siehe Abb. 3.4.2 und Tab. 3.4.2).

In einer Serologie mit etablierten TAAs weisen Zörnig *et al.* für das eingesetzte Melanom- und Kontrollkollektiv höhere Zahlen von 84 % beziehungsweise 87 % reaktiver Seren in der Multiplex-Serologie nach (Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht). Diese nochmals höhere Zahl positiver Seren ist auf Grund der Auswahl bereits bekannter tumorassoziierter Antigene wie p53, Tyrosinase, MAGE und NY-ESO-1 für die Serologie zu erwarten. Bei den Patienten konnte somit eine humorale Immunantwort nicht nur gegen den Großteil der TAAs beobachtet werden, sondern auch gegen ca. 76 % der ausgewählten Protein in dieser Arbeit. Somit wurden erfolgreich immunogene Proteine als potentielle Biomarker identifiziert.

Gnjatic *et al.* identifizieren mittels Protein-„Arrays“ bei stringentem Schwellenwert in einem Pankreaskarzinomkollektiv nur 20 % reaktive Seren gegen bisher nicht als Antigene beschriebene Proteine (Gnjatic *et al.*, 2010). In der Multiplex-Serologie konnte bei stringentem 3x Schwellenwert mit 17 % ein vergleichbarer Messwert jedoch gegen 33 statt über 8000 Proteinen des „Arrays“ bestimmt werden. Bei 1x Schwellenwert waren 44 % positiver Seren für diese Tumorentität identifiziert worden. Die Ergebnisse in den einzelnen Stadien/Metastasierungsgraden der Patientenkollektive differierten zum Teil deutlich zu den jeweiligen durchschnittlichen Werten (siehe Abb. 3.4.2 und Tab. 3.4.2). Die Anzahl positiver Seren gegen mindestens ein Protein war in Stadium I des Melanomkollektivs mit 84 % bedeutend höher als in den anderen Stadien mit Werten von 64 %, 60 % beziehungsweise 49 % (Stadium II - IV). Somit ergab sich mit höherem Stadium eine Verringerung der positiven Seren. Während die Zahl der einfach positiven Seren in allen Stadien vergleichbar zwischen 20 - 30 % lag, konnten 63 % der Seren in Stadium I als positiv gegen multiple Antigene identifiziert werden. In den weiteren Stadien bewegte sich dieser Wert bei 30 - 38 %. Hiermit verbunden war ein deutlicher Unterschied der Anzahl durchschnittlich antikörperpositiver Proteine pro Patient, die in Stadium I bei ca. 4,7 lag und für die anderen Stadien von ca. 2,2 auf 1,2 abfiel. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Zörnig *et al.*, die in der Serologie mit TAAs jeweils konstante Werte über die Stadien für die Anzahl mindestens einfach positiver Seren als auch der durchschnittlich antikörperpositiven Proteine pro Patient mit 3,3 bis 4,0 berechneten (Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht).

Seren fernmetastasenfreier (M0) Patienten, was hier gleichbedeutend mit dem Stadium II war, waren im Pankreaskarzinomkollektiv zu 40 - 60 % positiv gegen mindestens ein Antigen jedoch nur 15 % der



N1M1-Proben, die Stadium IV entsprachen. Ebenfalls lag die Anzahl von Seren, die gegen ein beziehungsweise mehrere Proteine eine Antikörperantwort zeigten, bei ca. 17 - 30 % in M0-Graden, im M1-Grad mit 0 - 15 % eindeutig niedriger. Diese Werte hatten ebenfalls einen Einfluss auf die Anzahl der durchschnittlich antikörperpositiven Proteine pro Patient, die sich für die M0-Grade bei ca. 0,7 - 1,2 und für den M1-Grad bei nur 0,15 bewegten. Daher scheint ein Trend wie im Melanomkollektiv zu einer abnehmenden Anzahl an Antikörperantworten mit höherem Stadium vorzuliegen. Auf Grund des Fehlens von Proben aus den Stadien I und III, die sich diagnose- und operationsbedingt selten erhalten lassen, kann dies im Gegensatz zum Melanomkollektiv nicht eindeutig bestätigt werden.

Beim Vergleich der Anzahl der Seren mit Antikörpern gegen ein oder mehrere Antigene fiel auf, dass im Melanom- und im Kontrollkollektiv bei 1x Schwellenwert ca. 25 % der Seren gegen eines und ca. 40 % gegen mindestens zwei Antigene positiv waren. Im Pankreaskarzinomkollektiv war das Verhältnis mit ca. 22 % ausgeglichen. Somit waren nicht nur deutlich mehr Seren in den zuerst genannten Kollektiven positiv, sondern es lagen auch mehr humorale Antworten gegen multiple Proteine vor. Hierfür war hauptsächlich die Messung von jeweils zwei Isoformen eines Proteins ausschlaggebend, die sich in nur wenigen Aminosäuren unterschieden (siehe Tab. 3.4.4). Dazu zählten HIGD1A, PAICS, SCYE1 und SPP1. Nach Addition der Zahl der doppelt positiven Seren vereinten diese Proteine ca. 50 % beziehungsweise 40 % der mehrfach positiven Seren im Melanombeziehungsweise Pankreaskarzinomkollektiv auf sich.

Die Unterschiede in der Gesamtzahl der positiven Seren als auch der Zahl von Seren mit Antikörpern gegen ein oder mehrere Proteine zwischen den drei Kollektiven spiegelten sich ebenfalls in der durchschnittlichen Zahl von antikörperpositiven Proteinen pro Patient wider. Diese lag im Melanomkollektiv mit ca. 2,5 nahezu doppelt so hoch wie im Kontrollkollektiv mit 1,36 und dreimal so hoch wie im Pankreaskarzinomkollektiv. Die Studie des Melanomkollektivs mit TAAs berechnet ebenfalls mehr durchschnittlich antikörperpositive Proteine pro Patient gegenüber dem Normalkollektiv (Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht). Hier liegen die Werte bei 3,7 zu 2,4.

Sowohl im Pankreaskarzinom- als auch Melanomkollektiv waren die Proteine CALUv1, C8orf4, HMGN3v1, MPHOSPH6, RPL23a, SCYE1v1 & v3 sowie UBE2D1 bei einem 1x und 3x Schwellenwert diejenigen mit der höchsten Anzahl positiver Seren. Die Verteilung der reaktiven Seren auf die beiden Patientenkollektive für die acht Proteine lag bei ca. 65 - 85 % im Melanom- und entsprechend 15 - 35 % im Pankreaskarzinomkollektiv, obwohl das Verhältnis der Serenanzahl der Kollektive 60 % zu 40 % betrug. Die höchsten Werte im Pankreaskarzinom- in Relation zum Melanomkollektiv erreichten CALUv1, HMGN3v1, und SCYE1v1.

Bis auf die Varianten von SCYE1, die als Cytokine auch sekretiert werden können, und C8orf4, dessen Lokalisation ungeklärt ist, sind diese am häufigsten antikörperpositiven Proteine intrazellulär lokalisiert. Dies gilt für die meisten Proteine, für die eine humorale Immunantwort beschrieben ist (Willimsky & Blankenstein, 2007).

In der Studie von Gnjatic *et al.* war keines von 60 Seren von PDAC-Patienten gegen eines der aufgeführten Proteine reaktiv (Gnjatic *et al.*, 2010). Als positiv wurden jedoch nur diejenigen Proteine

deklariert, die im Patientenkollektiv eine statistisch signifikant höhere Zahl an antikörperpositiven Seren gegenüber dem Normalkollektiv besaßen. Dies war nach der Analyse mit dem Fisher's Test im hier untersuchten PDAC-Kollektiv für keines der Proteine der Fall (siehe Tab. 3.4.5). Im Gegenteil konnte für C8orf4 und CALUv1 sogar eine statistisch signifikant verringerte Anzahl an Seren mit Antikörperantworten berechnet werden.

Besonders auffällig war der Unterschied der Anzahl antikörperpositiver Seren je nach Metastasierungsgrad (siehe Abb. 3.4.5). So wurden für HMGN3v1 und SCYE1v1 im Pankreaskarzinomkollektiv in den M0-Graden über 10 % positive Seren detektiert, im M1-Grad dagegen keines. Für SCYE1v3 und UBE2D1 waren in M1-Grad-Seren ebenfalls keine Antikörper vorhanden. Im Melanomkollektiv lag die Anzahl positiver Seren für HMGN3v1, MPHOSPH6, RPL23a, SCYE1v1 und UBE2D1 zwischen 20 - 40 % und damit mindestens 50 % über dem jeweiligen Durchschnitt der Stadien und mindestens 100 % über den Kontrollen. Ob dies signifikant ist, wird in der statistischen Analyse überprüft.

Die als TAAs beschriebenen Proteine BMI1, RGS5 und UBQLN1 konnten zwar ebenfalls mit antikörperpositiven Seren detektiert werden, jedoch lag deren Anzahl deutlich unter den primär positiven Proteinen mit 1 - 4 % im Pankreaskarzinom- und 4 - 8 % im Melanomkollektiv (Stone *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2006; Boß *et al.*, 2007). Boß *et al.* charakterisieren RGS5 zudem als ein Antigen, gegen das zytotoxische Lymphozyten existieren und nennen keine humorale Immunantwort.

Die Anzahl antikörpernegativer Proteine für Seren des Pankreaskarzinomkollektivs war hoch und umfasste bei 1x Schwellenwert acht und bei 3x Schwellenwert 21 Proteine. Im Melanomkollektiv wurden keine antikörperpositiven Seren bei 1x Schwellenwert für zwei und bei 3x Schwellenwert gegen acht Proteine gemessen. Proteine, die in beiden Kollektiven weniger als insgesamt zwei antikörperpositive Seren besaßen, waren LUM, NDUFB5, SNAP25v2 und SPP1 in beiden exprimierten Varianten. Bis auf SPP1 (Osteopontin), für das Antikörper in Seren von Prostatakarzinompatienten identifiziert wurden, lagen ebenfalls keine weiteren Daten zur Existenz von Antikörpern in Seren von Krebspatienten vor (Tilli *et al.*, 2011).

In beiden Multiplex-Serologien ist mit den gleichen Seren aber unterschiedlichen Antigenen die Anzahl positiver Seren zwischen Normal- und Melanomkollektiv nahezu identisch. Das Auftreten und die Funktion einer humoralen Immunantwort in Krebspatienten ist bisher nicht eindeutig geklärt (Willimsky & Blankenstein, 2007). Ebenso ist die hohe Seroprävalenz von Antikörpern gegen untersuchte Proteine bei gesunden Menschen noch unklar, jedoch häufig in serologischen Studien zu beobachten (Lu *et al.*, 2007; Gnjatic *et al.*, 2010). Nach der „Immunoediting“-Theorie besitzt das Immunsystem die Fähigkeit, entartete Zellen frühzeitig zu eliminieren, um eine Entstehung einer Krebserkrankung zu verhindern (Schreiber *et al.*, 2011). Die Immunreaktion kann jedoch auch eine Selektion von schwach immunogenen prämaligenen Zellen fördern, die zunehmend schlechter vom Immunsystem erkannt werden. Inwieweit das häufige Auftreten von Antikörpern in gesunden Spendern mit der Erkennung der Karzinogeneseinitiierung zusammenhängt, ist wegen fehlender Studien im humanen System unklar (Willimsky & Blankenstein, 2007; Nolen *et al.*, 2009). Ebenfalls ist keine prognostische Aussage zu den identifizierten Antikörperantworten und der Manifestierung einer

Tumorantwort möglich, da hierzu aufwändige langjährige Studien mit regelmäßiger Kontrolle dieser Individuen benötigt würden, die zudem eine umfassende Dokumentation aller möglichen Einflussfaktoren enthielte (Li *et al.*, 2005).

Mausmodelle implizieren eine mögliche tumorfördernde Eigenschaft von Antikörpern, da diese die tumoraktivierten Entzündungsprozesse im Mikromillieu verstärkten oder kompetitiv Antigene banden, die eine zytotoxische Immunantwort verhinderte (Willimsky & Blankenstein, 2007). Somit könnte die beobachtete hohe Anzahl an positiven Seren in Stadium I auf eine das Tumorwachstum stimulierende humorale Immunreaktion hindeuten, die zur Minimierung einer tumorreprimierenden zytotoxischen Immunantwort vorliegt. Ob es sich daher bei den primär in frühen Stadien auftretenden Antikörperantworten um tumorunterstützende Reaktionen oder noch eher unspezifische Antikörper handelt, ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

Eine weitere Möglichkeit für die hohe Anzahl an positiven Seren im ersten Stadium und den kontinuierlichen Abfall wäre eine Reaktion von  $CD4^+$ - $T_H2$ -Zellen durch MHC II-Präsentation von mutierten Epitopen und unterschiedlichen posttranslationalen Mustern (Deponitieu *et al.*, 2009). In Folge würde eine gegen diese veränderten Epitope spezifische Antikörperantwort induziert, die sich mit den in der Serologie eingesetzten nativen unmodifizierten Proteinen nicht mehr nachweisen ließe. Peptid- oder Proteinarrays mit entsprechenden Proteinen oder eine angepasste Multiplex-Serologie mit eukaryotisch exprimierten Proteinen könnten Möglichkeiten zur Überprüfung dieses Faktors sein.

Für das Pankreaskarzinom fehlen frühe Diagnosemöglichkeiten. Die identifizierten Antikörperantworten lagen nicht ausschließlich in Patienten vor. Wie der Fisher's Test zudem zeigte, gab es keine im Patientenkollektiv signifikant häufiger antikörperpositiven Proteine. In diesem Fall wäre eine Kombination von Proteinen, gegen die in frühen Stadien Antikörper in Patientenserum identifiziert werden könnten, eine Diagnoseoption für PDAC, wenn sich dadurch Patienten und gesunde Individuen unterscheiden lassen. Hierzu wären jedoch weitere Messungen mit größeren Kollektiven, die vor allem Seren früher Tumorstadien enthalten, notwendig, um eine Aussage darüber zu treffen, ob die Anzahl der antikörperpositiven Seren statistisch signifikant verändert zur Kontrollpopulation ist. Der potentielle diagnostische und prognostische Nutzen einer detektierbaren Antikörperantwort ist für einige Tumorentitäten beschrieben, jedoch erfolgte bisher keine Eingliederung in klinische Routineabläufe (Lu *et al.*, 2007; Mattioni *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2008). Die Detektion von Antikörpern gegen die dort untersuchten Proteine in gesunden Spendern als auch Schwankungen der Anzahl reaktiver Seren zwischen Patientenkollektiven verringerte beziehungsweise verhinderte den möglichen Einsatz.

#### ***4.4.2 Bedeutung des Schwellenwertes und dessen Einfluss auf die Anzahl detektierter Antikörperantworten***

Ein zentrales Kriterium für einen potentiellen Biomarker, der in der Diagnostik eingesetzt werden soll, ist dessen spezifisches Auftreten oder die deutliche Veränderung seines Messwertes im Rahmen der

Erkrankung (Winter *et al.*, 2013). Zudem muss die diagnostische Methode eine spezifische und sensitive Detektion des Markers ermöglichen.

Die Multiplex-Serologie ist eine sehr spezifische und sensitive Methode, jedoch kann anhand der Messwerte keine direkte quantitative Aussage getroffen werden, da geeignete Standards fehlen (Pickering *et al.*, 2002; Krishhan *et al.*, 2009). Kommerziell erhältliche Antikörper bilden nicht das Repertoire einer humoralen Immunantwort in Menschen ab, wodurch eine Etablierung und Mitführung als Standard keine Vorteile bringt. Zudem würde dieser Etablierungsprozess je nach Analytanzahl eine hohe zeitliche und monetäre Investition für den Kauf verschiedener Antikörper und auch der „Beads“ erfordern. Daher werden im Normalfall Seren mit von der untersuchten Erkrankung nicht betroffenen Individuen als Referenz mitgeführt, um die Prävalenz zu vergleichen und einen Schwellenwert berechnen zu können, bei dem ein Messwert über einem normal zu erwartenden Durchschnitt liegt (siehe Kapitel 2.3.8.2) (Lu *et al.*, 2007; Gnjatic *et al.*, 2010; Zörnig *et al.*, Manuskript eingereicht). Dies erlaubt nur eine dichotome Beurteilung der Ergebnisse und keine Aussage über den Antikörpertiter, also eine quantitative Aussage.

Die Prävalenz von Antikörpern gegen Eigenantigene in Seren von Krebspatienten ist nicht immer eindeutig gegenüber scheinbar gesunden Spendern verändert. Dies zeigte sich auch hier beim Vergleich der Signifikanz der Anzahl der Antikörperantworten im Pankreaskarzinom- gegenüber dem Kontrollkollektiv. Für zwei Proteine konnte im exakten Fisher-Test eine signifikante Änderung der antikörperpositiven Seren berechnet werden. Jedoch war die Anzahl der positiven Seren bei CALUv1 und C8orf4 im Pankreaskarzinomkollektiv um 50 - 80 % gegenüber den Kontrollen verringert (siehe Abb. 3.4.4). Dementsprechend ist trotz des mit Seren von gesunden Spendern berechneten Schwellenwertes die Möglichkeit gegeben, dass auf Grund einer insgesamt geringen unterschiedlichen Anzahl positiver Messwerte keine Signifikanz für die Patientenserum erreicht werden kann.

Eine Möglichkeit ist, eine erhöhte Stringenz anzuwenden und statt eines 1x Schwellenwertes z.B. einen 3x Schwellenwert zur Berechnung einzusetzen. Dies ist nur erfolgreich, wenn die Messwerte in den Patientenserum höher als in den Kontrollen sind, wodurch das Verhältnis in Richtung des Patientenkollektivs verschoben werden kann. Die Analyse aller Messwerte wurde äquivalent auch mit dem 3x Schwellenwert durchgeführt. Allerdings führte dies zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl positiver Seren in den Kollektiven und der Antikörperantworten gegen die einzelnen Proteine, ohne das Verhältnis der Ergebnisse zwischen Patienten- und Spenderseren zu beeinflussen. So verringerte sich die Anzahl positiver Seren von ca. 65 % auf 37 % beziehungsweise 30 % im Melanombeziehungsweise Kontrollkollektiv und von 44 % auf 17 % im Pankreaskarzinomkollektiv. Da nicht ausgesagt werden konnte, ob es sich bei den Seren, deren Messwerte über dem 1x jedoch unter dem 3x Schwellenwert lagen, um solche mit einem niedrigen Antikörpertiter handelt oder andere Faktoren wie die Epitopspezifität beziehungsweise Antikörperaffinität eine Rolle spielten, war eine Analyse mit dem 1x Schwellenwert angewendet worden, um ein Gesamtbild der reaktiven Seren zu erhalten und immunogene Proteine identifizieren zu können.

#### 4.5 Differentiell exprimierte Gene/Proteine im PDAC und in chronischer Pankreatitis im Vergleich zu Pankreasnormalgewebe

Für Genexpressionsanalysen existieren derzeit zwei ‚Goldstandards‘, die je nach Proben- und Analytdurchsatz eingesetzt werden: die quantitative („real-time“) PCR und RNA-Sequenzierung für Transkriptomanalysen (Wang *et al.*, 2009; Derveaux *et al.*, 2010).

Da bereits eine Selektion der zu messenden Gene erfolgte und somit die Zahl der Analyten begrenzt war, wurde für die Expressionsanalyse die quantitative PCR eingesetzt (Bustin, 2000).

Die Strategie, auf Grund der unbekanntem Gewebezusammensetzung die drei Kontrollbezugsgene  $\beta$ -Aktin, *HPRT* und *Cyclophilin B* zur Mittelung des Normalisierungswertes einzusetzen, wurde statistisch bestätigt (siehe Kapitel 3.5.1). Hierdurch ist nicht ausgeschlossen, dass in der relativen Quantifizierung leichte Schwankungen weiterhin existieren, mit dem Ansatz wurden sie jedoch soweit wie möglich minimiert, um vergleichbare Messungen zu ermöglichen (de Kok *et al.*, 2005).

Von den 34 untersuchten Genen wurde *PAICSv1* aus der weiteren Analyse entfernt, da nicht ausreichend viele Messwerte mit einem validen  $C_p$ -Wert erhalten werden konnten. Bereits in der Klonierung war es nicht möglich gewesen, das Gen zu amplifizieren, weswegen es durch Mutagenese aus *PAICSv2* hergestellt wurde (siehe Kapitel 3.3.1). Das Gen könnte daher auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert sein, das eine Messung und Amplifizierung erschwert.

Von den verbleibenden 33 Genen waren zwölf signifikant differentiell zwischen Tumor- und Normalgewebe exprimiert. Hierzu zählten als überexprimierte Gene *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM*, *RGS5* und *SFRP2* und als verringert exprimierte Gene *HMG3v1*, *NDUFB5*, *PSAT1v1*, *RPL23a*, *SCYE1v1* und *v3* und *UBE2B* (siehe Kapitel 3.5.2). Die Höhe der Expressionsänderung variierte je nach Gen zwischen einer ca. 85 %-igen Expressionsreduktion für *PSAT1v1* und einer Überexpression um mehr als das zehnfache für *LUM* und *SFRP2* im Tumorgewebe. *ANXA1*, *CALUv1*, *LUM*, *PSAT1v1* und *SFRP2* waren in allen Metastasierungsstadien verändert exprimiert, was auf eine potentiell wichtige Rolle im Tumorgewebe deuten könnte.

Für einige der differentiell exprimierten Gene ist eine veränderte Expression in verschiedenen Tumorentitäten bereits beschrieben und somit stellen sie interessante Kandidaten für weitere Experimente dar, da eine Tumorrelevanz durch das Auftreten in verschiedenen Tumorentitäten wahrscheinlich ist. So wird Annexin A1 (*ANXA1*) in Blasenkrebs und der Haarzelleukämie überexprimiert, liegt jedoch verringert im Mammakarzinom vor (Falini *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Für Lumican (*LUM*) existieren Daten zu einer Überexpression im Mamma- und Pankreaskarzinom (Leygue *et al.*, 1998; Ping Lu *et al.*, 2002). Secreted Frizzled-related Protein 2 (*SFRP2*) dagegen ist bisher nur verringert exprimiert in vielen Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, dem hepatozellulären Karzinom, dem kolorektalen Karzinom und dem Pankreaskarzinom beschrieben (Crnogorac-Jurcovic *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2004; Veeck *et al.*, 2008; Takagi *et al.*, 2008). Die Phosphoserinaminotransferase1 (*PSAT1*) ist im Ovarialkarzinom überexprimiert (Toyama *et al.*, 2012).

Weiterhin konnten die überexprimierten Gene *ANXA1*, *CALU1*, *LUM* und *SFRP2* auch in RNA-Proben von Patienten mit chronischer Pankreatitis als signifikant überexprimiert identifiziert werden. Die chronische Pankreatitis wird als Risikofaktor für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms angesehen und kann in einem fortgeschrittenem Stadium einen hohen fibrotischen Anteil enthalten, der Ähnlichkeiten zur desmoplastischen Reaktion eines PDACs hat (Haber *et al.*, 1999; Apte *et al.*, 2004). Daher könnten die exprimierten Proteine dieser vier Gene sowohl in der fibrotischen als auch der desmoplastischen Reaktion beteiligt sein.

Zwischen Tumor und CP-Gewebe verringert exprimiert waren die Gene *PSAT1*, das im Tumor eine Reduktion um 80 - 90 % zeigte, und *SGK1*. Dieses Gen war in der Analyse zwischen Tumor und Normalgewebe tendentiell verringert exprimiert ( $p=0,072$ ), sodass die Expression im Tumorgewebe insgesamt verringert erscheint. Eine verringerte Expression von *SGK1* ist auch im adrenokortikalen Karzinom beschrieben (Ronchi *et al.*, 2012).

Die Streuung der Messwerte bei den drei am stärksten überexprimierten Genen *ANXA1*, *LUM* und *SFRP2* bei den Proben aus Tumor- und chronischem Pankreatitis-Gewebe war sehr hoch (siehe Abb. 3.5.4). Ein möglicher Grund hierfür könnte neben unterschiedlichen Regulationsmechanismen in der Genexpression der unbekannte Anteil des Tumor- und Stomagebewebes im Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung sein, über dessen zelluläre Zusammensetzung die Expressionsunterschiede hervorgerufen sein könnten (Giricz *et al.*, 2010).

*SFRP2* war von den untersuchten eines der am stärksten überexprimierten Gene in den Tumor-RNA-Proben. Im Gegensatz zu den hier präsentierten Expressionsdaten wurde in isolierten Tumorzellen aus PDAC-Gewebe eine deutlich verringerte und im Tumorgesamtgewebe in 40 % der Proben ein Verlust der *SFRP2*-Expression festgestellt (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001; Bu *et al.*, 2008).

Die Überexpression von *SFRP2* auf Proteinebene wurde durch immunhistochemische Analysen von ca. 190 Proben auf Tumorgewebe-„Arrays“ und exemplarisch zu RNA-Proben korrespondierenden Tumorgewebeschnitten bestätigt (siehe Kapitel 3.6.1). Die Analyse der immunhistochemischen Färbungen zeigte überdies, dass das Stroma hauptsächlich stark positiv für *SFRP2* während die Tumorzellen nicht oder nur leicht positiv waren (siehe Abb. 3.6.6 & 3.6.8). Crnogorac-Jurcevic *et al.* beschreiben eine stark verringerte Genexpression in Tumorzellen, die durch Feinnadelaspiration aus Pankreastumorgewebe gewonnen wurden, von 15 % im Vergleich zum Normalgewebe (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001). Die Beobachtung konnte für die Tumorzellen bestätigt werden, da im Durchschnitt unabhängig vom Metastasierungsstadium ca. 30 % der Tumor-„Array“-Proben für die Tumorzellen negativ und weitere 50 % leicht positiv, meist für Einzelzellen, waren (siehe Abb. 3.6.8). Dies bestätigte sich in den Schnitten des Gesamtgewebes.

Auf die analysierten Tumor-„Arrays“ bezogen waren ca. 65 % der PDAC-Proben stark positiv und ca. 30 % leicht positiv im Stroma für *SFRP2* gefärbt (siehe Abb. 3.6.8). Tendentiell bestätigte sich das Bild in histologischen Schnittpräparaten von Kryo- und FFPE-Gewebe.

Darüber hinaus wurde mittels Gewebe-„Arrays“ die *SFRP2*-Expression in Normal-, und chronischem Pankreatitisgewebe untersucht. Auf Proteinebene konnte *SFRP2* im Pankreasnormalgewebe nicht oder

mit nur geringen Farbintensitäten detektiert werden, dagegen war Gewebe der chronischen Pankreatitis häufig stark positiv (siehe Abb. 3.6.4). Im Normalgewebe waren die Azini, die den exokrinen Teil des Pankreas bilden, in ca. 50 % der Proben für SFRP2 leicht positiv. Weiterhin waren in 25 % der Proben die Langerhansschen Inseln, der endokrine Anteil des Pankreas, positiv. Diese geringe Expression könnte jedoch bereits ausreichend sein, um den von Crnogorac-Jurcevic *et al.* gemessenen Expressionsunterschied zwischen Tumorzellen und Normalgewebe zu erklären, wenn Tumorzellen noch geringere SFRP2-Expressionswerte aufweisen (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001).

In CP-Gewebe konnten dagegen in 60 % der Proben die Azini mit einer hohen Expression und weitere 30 % mit einer geringen Expression von SFRP2 anhand der Färbeintensität dieser Gewebereiche identifiziert werden. Dies bestätigte somit die Genexpressionsdaten für SFRP2, da das Gen in CP-Gewebe stark überexprimiert vorlag (siehe Tab. 3.5.2).

Die Verteilung der Farbintensitäten in den Langerhansschen Inseln und im Stroma änderte sich nur gering in Richtung höherer Werte zwischen Normal- und CP-Gewebe. Statt 25 % waren ca. 35 % der Langerhans Inseln leicht positiv und das Stroma zu je 6 % leicht beziehungsweise stark positiv.

#### **4.6 Gene/Proteine mit diagnostischer, prognostischer und/oder prädiktiver Relevanz**

Sowohl die Multiplex-Serologie als auch die Genexpressionsanalyse ermöglichten die Identifizierung von potentiellen Biomarkern, die in PDAC-Patienten Autoantikörperantworten induziert hatten und/oder zwischen Tumor- und Normalgewebe differentiell exprimiert waren. Darüber hinaus konnten in den Überlebensanalysen potentiell klinisch relevante Kandidaten für prognostische Aussagen eingegrenzt werden. Eine Zusammenstellung befindet sich in Tabelle 4.6.1.

Wie bereits in Kapitel 4.4 beschrieben, war die Anzahl von gemessenen Antikörperantworten in den Seren von Pankreaskarzinompatienten eher gering. Antikörperpositive Seren gegen HMGN3v1, RPL23a und SCYE1v1 erreichten eine Anzahl von 10 % oder mehr, was 24 oder mehr Seren entsprach. In der Serologie konnte demnach kein Kandidat für eine weitere Bearbeitung eingegrenzt werden, der im Patientenkollektiv signifikant mehr positive Antworten induziert hatte als in den Kontrollen und somit für eine frühere Diagnose nützlich hätte sein können. Nur zwei Proteine C8orf4 und CALUv1 besaßen zwischen Patienten- und Normalkollektiv eine signifikante Änderung der Anzahl der Antikörperantworten, die jedoch in Patienten verringert war, weswegen sie als diagnostische Marker nicht in Frage kommen.

Als einziger signifikanter prognostischer Marker wurde RGS5, ein beschriebenes TAA, identifiziert. Antikörper gegen RGS5 wurden in 4 % der Patienten gemessen, deren Effekt auf das Überleben mit einer „Hazard Ratio“ von über 3 negativ war.

Tab. 4.6.1: Signifikante Kandidaten aus allen Analysen der jeweiligen Experimente.

Gen	Antikörperantwort in Tumorpatienten induziert	Signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen	Relevant in der Überlebensanalyse	Im Tumor signifikant verändert exprimiert	Relevant in der univariaten Überlebensanalyse	Relevant in der multivariaten Überlebensanalyse
<i>ANXA1</i>	—	—	—	überexprimiert	positiver Effekt auf Überleben	—
<i>BMI1</i>	—	—	—	—	negativer Effekt auf Überleben	negativer Effekt auf Überleben
<i>CALUv1</i>	ja	verringert in Patienten	—	überexprimiert	—	positiver Effekt auf Überleben
<i>CNIH</i>	—	—	—	—	positiver Effekt auf Überleben	—
<i>C8orf4</i>	ja	verringert in Patienten	—	—	—	—
<i>GPM6A</i>	—	—	—	—	—	negativer Effekt auf Überleben
<i>HMGN3v1</i>	ja	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>LUM</i>	—	—	—	überexprimiert	—	—
<i>MPHOSPH6</i>	ja	—	—	—	—	—
<i>NDUFB5</i>	—	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>PAICSv1</i>	(ja)	—	—	—	—	—
<i>PSAT1v1</i>	—	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>RGS5</i>	(ja)	—	negativer Effekt auf Überleben	überexprimiert	—	negativer Effekt auf Überleben
<i>RPL23a</i>	ja	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>SCYE1v1</i>	ja	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>SCYE1v3</i>	ja	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>SFRP2</i>	—	—	—	überexprimiert	—	—
<i>SGK1v1</i>	—	—	—	—	negativer Effekt auf Überleben	—
<i>SNAP25v2</i>	—	—	—	—	—	negativer Effekt auf Überleben
<i>UBE2B</i>	—	—	—	verringert exprimiert	—	—
<i>UBE2D1</i>	ja	—	—	—	—	—
<i>UBQLN1</i>	—	—	—	—	negativer Effekt auf Überleben	—

Auf Grund der geringen Anzahl an Antikörperantworten können die Ergebnisse der multivariaten Überlebensanalyse für die Vielzahl der Proteine nur als Trend angesehen werden, wenn diese weniger als fünf reaktive Seren besaßen. Die Tendenz, dass in Patientenserum des Stadiums II für diese Proteine im Vergleich zu Stadium IV häufiger Antikörperantworten identifiziert werden konnten, wirft die Frage auf, ob diese Proteine ein diagnostisches Potential besitzen. Um systematisch den prognostischen Effekt von humoralen Immunantworten gegen RGS5 und weiteren Antigenen auf das Überleben von Patienten mit PDAC und die Beobachtung, dass die Anzahl humoraler Immunantworten in späteren Stadien abnimmt, zu untersuchen, sollten die Messungen mit einem größeren und homogenen Serumkollektiv wiederholt werden.



Auf Grund der relativ gesehen höheren Anzahl spezifischer Antikörperantworten im Melanomkollektiv können weitere Kandidaten als diagnostische beziehungsweise prognostische Marker in dem noch ausstehenden statistischen Vergleich zum Normalkollektiv beziehungsweise der Überlebensanalyse identifiziert werden.

Die Genexpressionsanalyse identifizierte zwölf zwischen Tumor- und Normalgewebe differentiell exprimierte Gene. Hiervon waren fünf überexprimiert, wobei die Gene *LUM* und *SFRP2* eine mehr als 10-fache Überexpression zeigten. Alle im Tumor überexprimierten Gene waren auch in den Proben von chronischer Pankreatitis überexprimiert (siehe Kapitel 4.5).

Die fünf in der univariaten Überlebensanalyse als signifikant identifizierten Gene waren bis auf *ANXA1*, das einen leicht positiven Effekt auf das Überleben hatte, nicht in ihrer Expression verändert. Bemerkenswert war hier die Signifikanz aller Gene ausschließlich für den N0M0-Metastasierungsgrad, in dem ein Pankreaskarzinom bis auf den T4-Grad häufig resektabel ist. Dementsprechend könnte RNA aus resektiertem Gewebe für die Expressionsmessung und eine Prognose erhalten werden. Die univariate Überlebensanalyse der Genexpression auf Transkriptebeine ist für die Metastasierungsgrade N0M0 und N1M1 allerdings als Trend anzusehen, da mit jeweils weniger als n=20 nicht genügend Probenergebnisse zur Verfügung standen. Diese Tendenz müsste in einem größeren homogenen Kollektiv, das anhand der Stadien eingeteilt ist, überprüft werden.

Mit *CALUv1* und *RGS5* beeinflussten laut der multivariaten Überlebensanalyse zwei der signifikant überexprimierten Gene das Überleben von PDAC-Patienten. Dagegen konnte für die stärker überexprimierten Gene *ANXA1*, *LUM* und *SFRP2* kein Einfluss erkannt werden. Auffällig war, dass die meisten Gene, für deren Proteine in der Serologie häufiger antikörperpositive Seren identifiziert werden konnten, eine signifikante Expressionsänderung aufwiesen. Während *HMGN3v1*, *RPL23a*, *SCYE1v1* und *v3* zum Teil mehr als 10 % positive Seren verzeichneten, waren sie im Tumorgewebe um 20-60 % verringert exprimiert, im Gegensatz zu *CALUv1*, das 2-3x überexprimiert und mit ca. 5 % positiver Seren vorlag. Auch für *RGS5* waren eine Überexpression und eine im Vergleich zu dem meisten Proteinen höhere Anzahl antikörperpositiver Seren gemessen worden. Demgegenüber konnte für die in allen Stadien am stärksten überexprimierten Gene, *LUM* und *SFRP2* jeweils keines beziehungsweise maximal ein positives Serum identifiziert werden. Die Expression von *LUM* im Stroma zeigt in einer anderen Studie eine Tendenz, als prognostischer Faktor zu dienen (Ishiwata *et al.*, 2007). Die weiteren drei relevanten Gene mit einem Einfluss auf das Überleben, *BM11*, *GPM6A*, und *SNAP25v2*, zeigten hingegen keine Unterschiede im Expressionsmuster.

Anhand der ausgewerteten immunhistochemischen Färbungen der Tumor-„Arrays“ wurde ein Einfluss der *SFRP2*-Expression in Tumorzellen auf das Überleben des betrachteten Patientenkollektivs überprüft, da zwischen ca. 30 % negativer und ca. 60 % positiver Proben unterschieden werden konnte (siehe Abb. 3.6.8 und Kapitel 3.7.3). Da im Stroma in über 90 % der Proben *SFRP2* exprimiert nachgewiesen werden konnte, wurde vorerst auf eine Analyse unter dem Parameter „geringe oder hohe Expression“ verzichtet. Die multivariate Analyse erbrachte jedoch kein signifikantes Ergebnis

unabhängig von der zentralen oder peripheren Lokalisation der Gewebeprobe und vom Metastasierungsgrad. Die Überlebensverläufe zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Da es sich hierbei jedoch um Tumor-„Arrays“ handelte, die nur einen kleinen Ausschnitt des Gesamtgewebes und zudem die N0M0- und N1M1-Klassifikationen wenige Proben enthielten, war ein definitiver Ausschluss einer Relevanz bei der vorhandenen Datenlage verfrüht. Die Analyse kann noch auf die Expression von SFRP2 im Stroma sowie die korrelierte Zusammenstellung von Expression in Tumor und im Stroma ausgeweitet werden.

Die detaillierte Analyse und Quantifizierung der SFRP2-Expression in den Gewebeschnitten mit Hilfe der Visiomorph Software (Claeys *et al.*, 1989) sowie entsprechende Überlebensanalyse mit diesen Daten stehen noch aus. Die Gewebeschnitte, die nicht nur einen Ausschnitt des Gewebes enthalten, erlauben ferner eine differenziertere Analyse hinsichtlich Tumor- und Stromagehalt, der Homogenität der Expression und möglicher Immunzellinfiltrate.

#### 4.6.1 *Potentielle Biomarker*

Ein Ziel der Multiplex-Serologie war, anhand vorhandener Antikörperantworten im Pankreaskarzinomkollektiv gegen die selektierten Proteine diagnostische als auch prognostische Marker zu identifizieren. Wie bereits in Kapitel 4.4 dargestellt, konnten diagnostische Biomarker auf Grund der nicht signifikanten Differenz von antikörperpositiven Seren zwischen Patienten- und Normalkollektiv ausgeschlossen werden.

Als prognostischer Marker mit einer negativen Prognose wurden vorhandene Antikörper gegen das Protein RGS5 identifiziert, die in ca. 4 % der Patientenserum vorlagen. In der Genexpressionsanalyse war die Überexpression für *RGS5* ebenfalls mit einer negativen Prognose assoziiert. *RGS5* ist bereits anhand einer erhöhten Genexpression für das Nierenzellkarzinom und Nicht-Kleinzell-Lungenkarzinom als prädiktiver sowie prognostischer Biomarker beschrieben (siehe Tab. 4.6.2).

Folgende prognostische Marker wurden anhand der Genexpressionsdaten in Pankreastumor- und Normalgeweben identifiziert.

Das Gen *BMI* konnte sowohl in der univariaten als auch multivariaten Überlebensanalyse als potentieller Marker bestimmt werden, dessen Expression mit einem negativen Effekt auf das Überleben korrelierte. Auch *BMI1* ist als hauptsächlich prognostischer Biomarker in verschiedenen Tumor-entitäten wie dem Ösophagus- und Mammakarzinom beschrieben (Yoshikawa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Studien zur Expression von *ANXA1* im Ösophagus- und Blasenkarzinom und von *SGK1v1* im adrenokortikalen Karzinom belegen, dass diese als prognostische Biomarker in Frage kommen (Wang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Ronchi *et al.*, 2012). Die weiteren identifizierten Kandidaten *CALUv1*, *CNIH*, *GPM6A* und *UBQLN1* sind bisher nicht im Zusammenhang mit Krebserkrankungen als Marker beschrieben. *UBQLN1* ist jedoch ein TAA im Ovarialkarzinom (Stone *et al.*, 2003).

**Tab. 4.6.2: Auswahl an Literaturdaten zu den identifizierten Kandidaten im Hinblick auf Studien zu ihrer Eignung als Biomarker**

Gen	Beschriebene diagnostische, prognostische oder prädiktive Relevanz in Tumorentität	Referenz
<i>ANXA1</i>	Ösophaguskarzinom: Proteinexpression prognostisch negativ; Blasenkrebs: Proteinexpression prognostisch negativ;	Wang <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2010
<i>BMI1</i>	Ösophaguskarzinom: Proteinexpression prognostisch und prädiktiv negativ; Glioblastom: Proteinexpression prognostisch positiv; Mammakarzinom: Proteinexpression prognostisch negativ;	Yoshikawa <i>et al.</i> , 2012; Cenci <i>et al.</i> , 2012; Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>CALUv1</i>	Keine Daten	
<i>CNIH</i>	Keine Daten	
<i>C8orf4</i>	Magenkarzinom: Proteinexpression prognostisch und prädiktiv negativ;	Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>GPM6A</i>	Keine Daten	
<i>HMG3v1</i>	Keine Daten	
<i>LUM</i>	Kolorektales Karzinom: Genexpression prädiktiv und Proteinexpression prognostisch positiv; Mammakarzinom: Proteinexpression prognostisch positiv;	de Wit <i>et al.</i> , 2012; Watanabe <i>et al.</i> , 2006; Troup <i>et al.</i> , 2003
<i>MPHOSPH6</i>	Keine Daten	
<i>NDUFB5</i>	Keine Daten	
<i>PAICSv1</i>	Keine Daten	
<i>PSAT1v1</i>	Keine Daten	
<i>RGS5</i>	Nierenzellkarzinom: Genexpression prädiktiv positiv; Nicht-Kleinzell-Lungenkarzinom: Genexpression prognostisch positiv;	Yao <i>et al.</i> , 2008; Huang <i>et al.</i> , 2012
<i>RPL23a</i>	Keine Daten	
<i>SCYE1v1</i>	Keine Daten	
<i>SCYE1v3</i>	Keine Daten	
<i>SFRP2</i>	Blasenkrebs: Promotormethylierung prognostisch negativ;	Marsit <i>et al.</i> , 2005
<i>SGK1v1</i>	Adrenokortikales Karzinom: Proteinexpression prognostisch positiv;	Ronchi <i>et al.</i> , 2012
<i>SNAP25v2</i>	Keine Daten	
<i>UBE2B</i>	Keine Daten	
<i>UBE2D1</i>	Keine Daten	
<i>UBQLN1</i>	Keine Daten	

Prädiktive Marker konnten nicht evaluiert werden, da für die PDAC-Proben keine fundierten Informationen zu Therapien außer einer neoadjuvanten Behandlung vermerkt waren. Somit konnte der Einfluss von Antikörperantworten und/oder die Expression eines Kandidaten nicht mit dem Ansprechen auf eine Therapie korreliert werden.

Wie bereits in Kapitel 1.3 erläutert, werden Biomarker zur Stratifizierung von Patientengruppen für Therapiescheidungen eingesetzt. Darüber hinaus wird im Rahmen der Ansätze einer personalisierten Therapie eine Vielzahl an Biomarkern benötigt, um für einen Patienten eindeutig ein Therapieschema entwickeln zu können (Winter *et al.*, 2013). Die identifizierten 22 potentiellen Biomarker können daher auch auf ihre Eignung als Stratifizierungs- und Bestimmungsparameter in Kombination überprüft werden.

#### 4.7 Secreted Frizzled-related Protein 2 im Pankreas

Das Secreted Frizzled-related Protein 2 (SFRP2) ist ein sekretiertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa und zwei funktionellen Domänen, der Cystein reichen Frizzled- (FZD) und die Netrin-ähnlichen Domäne (siehe Abb. 3.6.1) (Jones & Jomary, 2002). SFRP2 ist eines von fünf Proteinen aus der Familie, die eine Rolle in der Emryo- und Fetogenese spielen, indem sie die Aktivität der Wnt-Signalwege modulieren und einen Einfluss auf die Apoptose besitzen (Melkonyan *et al.*, 1997, Bovolenta *et al.*, 2008). Der kanonische Wnt-Signalweg ist zudem als ein deregulierter Signalweg in der Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten wie gastrointestinaler Tumoren beschrieben, der u.a. durch Mutationen in zentral wichtigen Genen wie *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) und  $\beta$ -Catenin aktiviert wird (Anastas & Moon, 2013). Die Aktivierung des Signalwegs im Pankreaskarzinom deutet auf eine Rolle in der Karzinogenese hin (Zeng *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2010). Da die SFRPs die Signalkaskade am initialen Punkt der Rezeptorbindung der Wnt-Liganden regeln, sind sie für eine potentielle Therapie interessante Angriffspunkte (siehe Abb. 4.7.1).



**Abb. 4.7.1: Direkte Interaktionen von SFRP2 (Mitte) anhand der Analyse mit STRING.** Neben den Wnt-Liganden besteht auch eine Interaktion mit dem Sonic Hedgehog Protein (SHH) des Hedgehog-Signalwegs.

SFRP2 konnte sowohl in RNA-Proben aus Gewebe mit chronischer Pankreatitis als auch Pankreastumorgewebe als überexprimiertes Gen in der Expressionsanalyse mit einem 10-fach höheren Wert gegenüber dem Normalgewebe identifiziert werden (siehe Tab. 3.5.1. & 3.5.2). Die immunhistochemische Analyse der Proteinexpression bestätigte die in der qPCR beobachtete Überexpression von SFRP2. Interessanterweise war das Protein in CP-Gewebe hauptsächlich in den Azini und im Tumorgewebe im Stroma lokalisiert. Neben dieser differentiellen Überexpression qualifizierte SFRP2 für weitere Analysen dessen funktionelle Relevanz als Modulator der Wnt-Signalwege, die in Tumorzelllinien mit einer veränderten Apoptosesensitivität verbunden ist. Da Inhibitoren des kanonischen Wnt-Signalweges für eine potentielle Krebstherapie untersucht werden, war die Überexpression auf RNA-Ebene eines natürlichen Wnt-Modulators im Tumorgewebe außergewöhnlich. Somit war SFRP2 unabhängig seiner prognostischen Signifikanz, die zum damaligen Zeitpunkt nicht vorlag, ein interessanter Kandidat, um dessen Expressionsregulierung sowie

funktionelle Expressionsanalysen zum Einfluss des Proteins auf die Proliferation, die Apoptose und den kanonischen Wnt-Signalweg in Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen.

#### **4.7.1 Epigenetisch regulierte Expression im Tumorgewebe und in Tumorzellen**

Die Promotorhypermethylierung ist eine in verschiedenen Tumorentitäten häufig beobachtete, deregulierte Modifizierung der DNA, die zur Inaktivierung der Expression von unterschiedlichen Genen, die z.B. an der DNA Reparatur, unterschiedlichen wachstums- und apoptoserelevanten Signalwegen oder der Homöostase der extrazellulären Matrix beteiligt sind, führt (Esteller *et al.*, 2001; Portella & Esteller, 2010). Auf Grund der wichtigen Funktionen dieser Gene ist eine Relevanz der epigenetischen Regulation in der Karzinogenese wahrscheinlich. Daher wird eine Wiederherstellung eines normalen Expressionsmusters der deregulierten Gene als Therapieoption angesehen, für die bei Leukämien mit dem Wirkstoff 5-Azacytidin bereits eine Zulassung erfolgte (Kelly *et al.*, 2010).

SFRP2, wie auch die weiteren SFRPs, ist ebenfalls ein Gen mit einer Regulierung durch die Methylierung in CpG-Inseln des Promotors und wurde in Geweben beziehungsweise Zelllinien verschiedener Tumorentitäten wie z.B. dem Mammakarzinom, dem hepatozellulären Karzinom und dem kolorektalen Karzinom durch eine Hypermethylierung als nicht exprimiert beschrieben (u.a. Suzuki *et al.*, 2004; Takagi *et al.*, 2008; Veeck *et al.*, 2008). Dies lässt auf einen zentralen Mechanismus schließen, der die Abschaltung der Genexpression fördert. Darüber hinaus ist eine Nichtexpression der SFRPs für die Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten offenbar von zentraler Bedeutung, wobei der temporale Zusammenhang zu diesen Prozess fördernden als auch daraus folgenden Veränderungen im Tumor nicht bekannt ist.

Die immunhistochemische Analyse konnte die unterschiedlichen Expressionsmuster von SFRP2 zwischen Tumorzellen und Stroma im Pankreasgewebe aufdecken, die zuvor als Überexpression auf Transkriptebene im Gesamtgewebe beobachtet worden war (siehe Tab. 3.5.1, Abb. 3.6.5 und Abb. 3.6.6). Tumorzellen wiesen keine oder nur eine geringe, das Stroma eine hohe SFRP2-Proteinexpression auf. Die Genexpression war ebenfalls in Pankreastumorzelllinien stark vermindert (siehe Abb. 3.6.12). Daher wurde der Methylierungsgrad des *SFRP2*-Promotorbereiches von neun Gewebeproben und fünf Zelllinien mittels der Sequenzierung von Natriumbisulfit behandelter genomischer DNA bestimmt (siehe Kapitel 3.6.3). Die Methylierungsgrade insgesamt zwischen den Geweben beziehungsweise Zelllinien als auch innerhalb eines Gewebes beziehungsweise einer Zelllinie variierten zum Teil deutlich (siehe Abb. 3.6.11).

Für die Gewebe konnte festgestellt werden, dass für jede untersuchte Probe in einigen Klonen eine Methylierung von CpG-Nukleotiden vorhanden war. Allerdings konnte für keines der Gewebe anhand der Muster eine Hypermethylierung sondern eine Hypomethylierung beobachtet werden.

Einige CpG-Nukleotide schienen häufiger oder seltener methyliert zu sein als andere, sodass identische Methylierungsmuster im Tumorgewebe nicht auftreten. Die Methylierung erscheint recht variabel auf individueller Klonebene zu sein, wie Analysen der Methylierung in embryonalen Stammzellen zeigen

(Liang *et al.*, 2002). Tendenziell lag die durchschnittliche Methylierung in den untersuchten CpG-Inseln am Translationsinitiationspunkt höher als weiter strangaufwärts (siehe Tab. 3.6.4).

Zwischen der Methylierung einer Probe und der in der qPCR gemessenen *SFRP2*-Expression schien kein Zusammenhang zu bestehen, da z.B. die durchschnittlich am höchsten methylierte Probe HD946 vom normalisierten Expressionswert ähnlich der Probe HD362 war, die eine deutlich geringere durchschnittliche Methylierung aufwies. Die Proben HD303 und HD1154 wiesen eine um ca. 70 % geringere *SFRP2*-Expression auf als HD946, obwohl die Methylierung um mindestens 70 % geringer war. Der höhere Anteil stärker methylierter Klone in den Proben HD946 und HD987 könnte durch den höheren Tumoranteil im Gewebe begründet sein (siehe Abb. 3.6.6), wohingegen das für *SFRP2* stark positive Stroma den hohen Expressionswert des Gens erklärt.

Für einige Proben stellte sich heraus, dass der Anteil an Tumorzellen gering oder eine hohe Anzahl an kleinen im Gewebe verstreuten Tumorzellagglomeraten vorhanden war. Auf Grund der geringen Menge an vorhandenem Gewebematerial war es allerdings nicht möglich, Tumorzellen und Stroma durch Lasermikrodissektion zu separieren und gezielt auf deren epigenetische Modifikationen zu untersuchen (Emmert-Buck *et al.*, 1996; Melle *et al.*, 2007).

Die Methylierungsmuster der Cytosine in beiden CpG-Inseln in den Zelllinien waren sehr unterschiedlich (siehe Abb. 3.6.11). Die Tumorzelllinie MiaPaCa-2 und HEK293-Zellen besaßen den höchsten Methylierungsgrad mit zum Teil vollständig methylierten Positionen in allen Klonen und konnten daher als hypermethyliert bezeichnet werden. BxPC-3-Zellen wiesen ebenfalls eine hohe Methylierung auf, die jedoch in keinem Fall an einer Position vollständig war. Für die Zelllinien AsPC-1 und Panc1 konnten mehrere Cytosinpositionen identifiziert werden, die in keinem Klon methyliert waren. Auffällig war die Inkonsistenz der Methylierung innerhalb einer Zelllinie, die allerdings eine normale Beobachtung zumindest für andere CpG-Inseln auch in Pankreastumorzellen ist (Liang *et al.*, 2002; Hamada *et al.*, 2005). Im Gegensatz zum Tumorgewebe war in den Zelllinien eher der strangaufwärts liegende Bereich methyliert als dieser um den Translationsinitiationspunkt.

Die quantitative Genexpressionsanalyse von *SFRP2* zeigte, dass alle Zelllinien normalisiert eine geringe Expression aufwiesen (siehe Abb. 3.6.12). Die geringen Expressionsdaten der Zelllinien mit einem hohen Methylierungsgrad der beiden CpG-Inseln, MiaPaCa-2 sowie HEK293, entsprachen damit ihren Methylierungsmustern. Bei der Zelllinie BxPC-3 und insbesondere bei der Zelllinie Panc1, die einen geringen Methylierungsgrad der beiden CpG-Inseln besaß, unterschieden sich die Expressionswerte von *SFRP2* nicht von den anderen Zelllinien. Nur für AsPC-1 konnte eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien leicht höhere Expression nachgewiesen werden, die jedoch immer noch mehr als zwei Zehnerpotenzen unter den Kontrollbezugsenen lag. Die verringerte Methylierung in diesen beiden CpG-Inseln hatte demnach keinen bedeutenden Effekt auf die Expression in diesen Zelllinien. Jedoch kann die Methylierung und damit ein Einfluss auf die Expression auch weitere Bereiche umfassen, die in CpG-Inselandbereichen („CpG island shores“) beziehungsweise in der DNA-Gensequenz liegen und die Transkription verhindern (Portela & Esteller, 2010). Darüber hinaus

ist die Methylierung nur ein Mechanismus der epigenetischen Regulierung und umfasst ebenfalls Histonmodifizierungen und die Positionierung der Nukleosomen.

#### 4.7.1.1 Reaktivierung der Expression mit 5-Azacytidin und Trichostatin A in Pankreaskarzinomzelllinien

Eine verringerte Expression von SFRP2 war in allen Pankreastumorzelllinien gemessen worden (siehe Abb. 3.6.12). Dies konnte zum Teil mit einer Promotorhypermethylierung erklärt werden (siehe Abb. 3.6.11). Der direkte Einfluss der epigenetischen Regulation wurde mit den Inhibitoren 5-Azacytidin und Trichostatin A in den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, BxPC-3, MiaPaCa-2 und Panc-1 bestimmt. Die Inhibitoren wurden einzeln oder in Kombination dem Medium versetzt, um die potentielle epigenetische Regulation für die untersuchten Prozesse aufheben.

Die Methylierung der DNA wird durch DNA Methyltransferasen (DNMT) vermittelt, die Cytosine im CpG-Kontext methylieren (Portela & Esteller, 2010). Cytidinaloga wie das verwendete 5-Azacytidin (Aza) inhibieren alle Enzymklassen der DNMTs, indem das bei der Replikation und Transkription in die Nukleinsäure eingebaute Aza, bei dem an der fünften Position des Pyrimidinringes das Kohlenstoffatoms gegen ein Stickstoffatom ausgetauscht ist, die DNMTs durch Blockierung des aktiven Zentrum an einer enzymatischen Reaktion hemmt. Dies führt mit der Zeit zu verringerten Methylierungsgraden in CpG-Inseln und einer Transkriptionsaktivierung (Creusot *et al.*, 1982).

Ein weiterer epigenetischer Regulationsmechanismus, der eine Verknüpfung mit der Methylierung aufweist, ist die Histonacetylierung, die an bestimmten Lysinseitenketten aller Histone auftreten kann (Portela & Esteller, 2010). Lysin kann durch seine Partialladung mit der DNA interagieren und eine Bindung an die Histone erzeugen. Eine Acetylierung schwächt diesen Effekt ab und führt zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität. Histondeacetylasen (HDAC) katalysieren eine Verminderung der Lysinacetylierung, die gleichbedeutend mit einer verminderten Transkriptionsaktivität im betroffenen Bereich ist. HDAC lassen sich z.B. durch das Antibiotikum Trichostatin A (TSA) hemmen (Yoshida *et al.*, 1990).

Die Kombination beider Inhibitoren ermöglicht daher, synergistische Effekte bei der Expressionsreaktivierung zu erzielen, wenn beide Mechanismen an der Regulation beteiligt sind.

Beide Substanzen, einzeln oder in Kombination, wirkten unterschiedlich bei der Reaktivierung der Expression auf Transkriptebeine in den untersuchten Zelllinien (siehe Abb. 3.6.13). Die Ergebnisse korrelierten mit dem Grad der Methylierung für eingesetzten Substanzen und die Zelllinien.

Die Aktivierung der *SFRP2*-Expression war in AsPC-1-Zellen am geringsten und konnte sowohl mit Aza als auch TSA sowie mit der Kombination mit Faktoren von 10-30 erreicht werden. Auffällig war die Aktivierung der Expression mit beiden Konzentrationen für die Kombination jedoch nur mit den jeweils geringeren Konzentrationen im Einzelansatz. Somit schien die Kombination bei der niedrigeren Konzentrationsstufe einen leichten synergistischen Effekt zu haben, da die Reaktivierung um den Faktor 30 im Gegensatz zu jeweils einem Faktor von 10 lag. Eine höhere Konzentration der Substanzen ermöglichte keine Verstärkung der Aktivierung. Die Zelllinie AsPC-1 war diejenige mit der geringsten

Methylierung und der höchsten normalisierten Expression im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Die insgesamt beste Expressionsreaktivierung mit beiden Inhibitoren deutete demnach auf eine epigenetische Regulierung durch Histondeacetylierung und einer möglichen Methylierung in anderen Bereichen als den beiden untersuchten CpG-Inseln hin.

Panc1-Zellen ließen sich mit TSA und der Kombination aus beiden Inhibitoren in ihrer *SFRP2*-Expression reaktivieren. Aza hatte keinen Einfluss, was mit dem geringen Methylierungsgrad übereinstimmte. Eine hohe TSA-Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  erbrachte einen Reaktivierungsfaktor von 70, der nicht deutlich vom Kombinationsansatz abwich, in dem ein Faktor von ca. 120-130 errechnet wurde. Diese Ergebnisse lassen daher eine primäre Regulation über die Histonmodifikation vermuten.

Für die weiteren drei Zelllinien BxPC-3, MiaPaCa-2 und HEK293 konnten ähnliche Aktivierungsverläufe je nach Inhibitor und Konzentration beobachtet werden, wobei sich die Faktoren zwischen den Zelllinien unterschieden. Die stärkste Aktivierung der Expression wurde mit Aza in einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  erreicht und belegt damit einen Einfluss der Methylierung, die in diesen drei Linien höher lag als in den zuvor betrachteten zwei. TSA in beiden Konzentrationen ermöglichte ebenfalls eine hohe Aktivierung, die von den Faktoren zwischen den beiden Aza-Konzentrationen lag. Daher scheint die Histondeacetylierung ebenfalls an der Expressionsregulation beteiligt zu sein. Jedoch konnte in keiner der Zelllinien ein synergistischer Effekt erreicht werden.

Das Lösungsmittel von Aza, ein Wasser-Essigsäuregemisch, zeigte auch eine Aktivierung der Expression in Panc1-Zellen und in sehr geringem Maße in BxPC-3 und MiaPaCa-2-Zellen. Potentiell ist daher ein Teil des gemessenen Effekts in den Kombinationsansätzen der Panc1-Zellen darauf zurückzuführen. Dieser Lösungsmittelleffekt zeigte sich bei den Aza-Ansätzen jedoch nicht, obwohl in diesen eine vergleichbare Lösungsmittelkonzentration eingesetzt wurde.

Ein deutlicher synergistischer Effekt konnte in keiner Zelllinie beobachtet werden. Hier könnten toxische Effekte eine Rolle spielen, da beide Substanzen unspezifisch wirken und die zu einer Expressionsaktivierung einer Vielzahl von zuvor ausgeschalteten Genen führen. Dies schließt solche Gene mit ein, die eine verringerte Vitalität der Zelle hervorrufen. Besonders eindeutig ist dies beim Vergleich beider Konzentrationen der Kombinationsansätze, da die Aktivierung bei höherer Konzentration ähnlich oder zum Teil geringer war. Geringere Konzentrationen der Substanzen könnten eine bessere Unterscheidung möglicher Synergien erlauben.

#### **4.7.2 Funktionelle Charakterisierung der *SFRP2*-Expression in Tumorzelllinien**

*SFRP2* ist als Modulator des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs beschrieben (Melkonyan *et al.*, 1997). Das Gen ist in vielen Tumorzellen beziehungsweise im Gewebe verschiedener Tumorentitäten durch Hypermethylierung stark verringert exprimiert, weswegen eine Rolle in der Karzinogenese vermutet wird. Eine Reexpression beziehungsweise Überexpression in Tumorzelllinien führte jedoch je nach Herkunftsgewebe der Zellen zu gegensätzlicher Proliferation und Apoptose. Ein anti-proliferativer und pro-apoptotischer Effekt wurde z.B. in Mammakarzinom-, Magenkarzinom- und oralen



Plattenepithelkarzinomzelllinien identifiziert (Sogabe *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu induzierte eine SFRP2-Expression z.B. in Nierenzellkarzinom- und malignen Gliomzelllinien eine Apoptose-resistenz und das Zellwachstum (Roth *et al.*, 2000; Yamamura *et al.*, 2010). Ebenfalls konnte ein anti-apoptotischer Effekt auf Fibroblasten von Narbengewebe festgestellt werden (Sun *et al.*, 2011). Im initialen „Yeast-Survival-Screening“ wurde SFRP2 durch seinen anti-apoptotischen Effekt identifiziert. Funktionelle Daten zu SFRP2 für das PDAC beziehungsweise daraus etablierte Zelllinien liegen bisher nicht vor.

Auf Grund der stark verminderten Expression in Pankreaskarzinomlinien wurde der Einfluss einer Überexpression auf die Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation und Apoptose mittels der Durchflusszytometrie untersucht. Die Überexpression wurde durch transiente Transfektion eines SFRP2-GFP-Expressionskonstrukts in die Zellen erreicht. Ein GFP-Konstrukt diente als Kontrolle. Das GFP ermöglichte darüber hinaus die Bestimmung der Transfektionseffizienz und sollte idealerweise nicht mit der natürlichen Sekretion des SFRP2 interferieren. Die Proliferation wurde über die PKH26-Intensität und die Apoptose über eine Annexin-V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) Doppelfärbung bestimmt (siehe Kapitel 2.4.5).

Die Transfektionseffizienzen der Zelllinien mit dem SFRP2-GFP- und dem Kontroll-GFP-Konstrukt differierten stark zwischen den Zelllinien (siehe Abb. 3.6.14). Das GFP-Konstrukt zeigte insgesamt bessere Effizienzen, was in der geringeren Größe des Plasmids als auch des exprimierten Produkts begründet sein könnte. MiaPaCa-Zellen ließen sich mit Effizienzen von durchschnittlich 50 % beziehungsweise 30 % für das GFP- bzw. SFRP2-GFP-Konstrukt am besten transfizieren. Die Effizienzen bei AsPC-1- und Panc-1-Zellen lagen jeweils unter 20 % für beide Konstrukte und besonders niedrig für SFRP2-GFP in AsPC-1-Zellen. Die Anzahl SFRP2-GFP-positiver Zellen nahm im Verlaufe der Messtage um mindestens 50 % ab. Die Verringerung der Zahl GFP-positiver Zellen war nur in AsPC-1-Zellen ähnlich hoch und änderte sich bei MiaPaCa-2-Zellen über die Messtage kaum.

Die bessere Transfektionseffizienz mit dem lipidbasierten Reagenz von MiaPaCa-2-Zellen könnte an ihrer unterschiedlichen Morphologie zu den anderen beiden Zelllinien liegen, da MiaPaCa-Zellen eine geringere Adhärenz als die beiden anderen Zelllinien aufweisen (siehe Kapitel 2.1.7).

#### 4.7.2.1 Pro-apoptischer Einfluss von SFRP2

Die Höhe der Apoptoseraten zwischen den Zelllinien war unterschiedlich, zeigten jedoch den Trend, dass SFRP2-GFP-positive Zellen im Vergleich zu den anderen Populationen eine deutlich höhere Apoptoserate besaßen, die entweder wie in AsPC-1-Zellen über die Messtage leicht oder wie in Panc1- und MiaPaCa-2-Zellen nicht abnahm (siehe Abb. 3.6.17, 3.6.21 & 3.6.25). Für die weiteren Kontroll- und transfizierten Zellpopulationen ließen sich für die AsPC-1-Zellen geringe eher konstante Apoptoseraten messen, jedoch waren dies auch die Zellen mit der geringsten Transfektionseffizienz. In Panc1- wie auch MiaPaCa-2-Zellen, die als Kontrollen nicht oder mit einem Leervektor

beziehungsweise GFP-Konstrukt transfiziert waren, ging mit der Zeit die anfänglich hohe Apoptoserate auf 40 % beziehungsweise 10 % zurück.

In MiaPaCa-2-Zellen war ein abweichendes Apoptoseverhalten im Vergleich zu den anderen Zelllinien für die SFRP2-GFP-Populationen zu beobachten, während die anderen untersuchten Ansätze, nicht transfizierte, mit dem Leervektor transfizierte sowie mit dem GFP-Konstrukt transfizierte Zellen vergleichbare Apoptoseverhalten wie die anderen Zelllinien zeigten (siehe Abb. 3.6.25). Die SFRP2-GFP-transfizierten Populationen verhielten sich in den ersten drei Messtagen identisch und hatten Apoptoseraten von 50 - 65 %.

Die hohen Apoptoseraten insbesondere bei den Panc1- und MiaPaCa-2-Zelllinien, die nicht mit dem SFRP2-GFP-Konstrukt transfiziert wurden, deuten auf eine höhere Empfindlichkeit dieser Zellen hin. Die Prozedur bis zur Transfektion umfasst die Subkultivierung und die Behandlung mit dem an die Membran bindenden PKH26-Farbstoff, die bereits einen zellulären Stress durch die Reagenzien und Scherkräfte bedeuten. Darüber hinaus führt die Transfektion auf Basis des kationischen Transfektionsreagenz zu vermehrter Apoptose. Jedoch war auch bei unbehandelten Zellen der AsPC-1- und MiaPaCa-2-Zelllinien eine basale Apoptoserate von 10-30 % und bei Panc-1-Zelllinien von 40 - 50 % zu beobachten. Offenbar scheinen vor allem letztere entweder durch das Passagieren oder die PKH26-Behandlung besonders negativ zu reagieren.

Anhand der Daten liegt die Vermutung nahe, dass das überexprimierte SFRP2-GFP-Protein in Pankreastumorzelllinien eine pro-apoptotische Wirkung besitzt. Unklar ist, ob die Überexpression und die Fusion zu bisher nicht beschriebenen und nicht nativen Interaktionen führen können. Da die Vorbehandlung der Zellen mit dem PKH26, die Transfektion als auch die GFP-Expression bereits einen messbaren Effekt auf die Apoptoserate in den beiden Zelllinien mit den höheren Transfektionseffizienzen Panc1 und MiaPaCa-2 besaßen, ist ein möglicher Einfluss des SFRP2-GFP auf die Apoptose hier nur am letzten Messtag sichtbar.

#### 4.7.2.2 *Anti-proliferativer Einfluss von SFRP2*

Die Daten der Proliferationsmessung zeigten einen deutlichen bis starken anti-proliferativen Effekt in SFRP2-GFP-positiven Zellen aller Zelllinien (siehe Tab. 3.6.5, 3.6.6 & 3.6.7). Dieser Effekt trat bis auf die Ausnahme der SFRP2-GFP-negativen Zellen der MiaPaCa-2-Zelllinie sonst nicht oder nicht in gleichem Maße auf.

Bei den Zelllinien AsPC-1 und Panc-1 proliferierten unbehandelte, mit dem Leervektor transfizierte und GFP- und SFRP2-GFP-negative Zellen, die das jeweilige Plasmid nicht internalisiert hatten, in ähnlich hohen Raten (siehe Kapitel 3.6.4.2 & 3.6.4.3). Eine leicht verringerte Proliferation trat in GFP-positiven Zellen beider Linien auf, was höchstwahrscheinlich mit der Proteinüberexpression zusammenhing, die die metabolische Kapazität der Zelle erfordert. In beiden Zelllinien waren, wie bereits erwähnt, SFRP2-GFP-positiv Zellen in ihrer Proliferation inhibiert.

MiaPaCa-2-Zellen proliferierten nur in untransfiziertem Zustand ungehindert (siehe Kapitel 3.6.4.4). Anhand der PKH26-Intensitäten war für die mit dem Leervektor als auch GFP-transfizierten Zellen zu

beobachten, dass sie in den ersten drei Messtagen nicht proliferierten, jedoch am letzten Messtag nur geringfügig höhere Intensitäten als die untransfizierten Zellen besaßen. Diese Zellen müssen daher in der Zeit stark proliferiert sein. Dieses Proliferationsverhalten unterschied die MiaPaCa-2-Zelllinie von den anderen beiden, das Endresultat in Form der prozentualen Abnahme der PKH-Intensität war allerdings identisch.

Positive sowie negative SFRP2-GFP-transfizierte MiaPaCa-2-Zellen proliferierten in den ersten drei Messtagen nicht. An Tag 6 war bei SFRP2-GFP-positiven Zellen weiterhin keine Proliferation messbar und bei SFRP2-GFP-negativen Zellen entweder keine oder eine leichte Proliferation zu beobachten, was mehrfach reproduziert werden konnte (siehe Abb. 3.6.23). Die Inhibierung der Proliferation bei den SFRP2-GFP-negativen MiaPaCa-2-Zellen könnte auf einen parakrinen Effekt des Proteins hindeuten. Im Zellkulturüberstand mit dem SFRP2-GFP- beziehungsweise einem SFRP2-Konstrukt transfizierten MiaPaCa-2-Zellen ließen sich beide Proteine im Immunblot nachweisen (siehe Abb. 3.6.27). Der parakrine inhibitorische Effekt des SFRP2 Proteins auf die Proliferation der SFRP2-GFP-negativen Zellen hängt möglicherweise von einer bestimmten Proteinkonzentration im Kulturmedium und demnach von der Transfektionseffizienz und der Anzahl an lebenden SFRP2-GFP-sekretierenden Zellen ab.

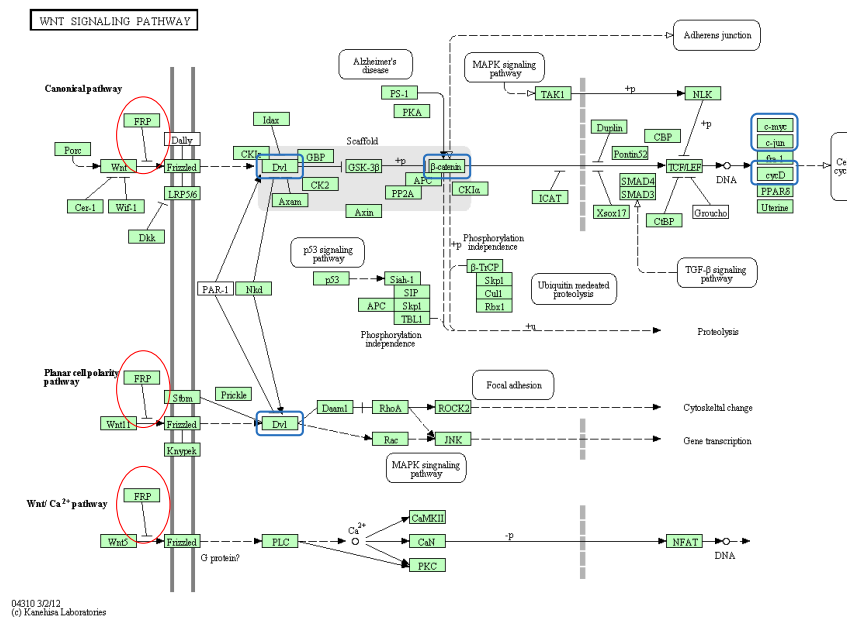
Im Vergleich zu den Panc1- und AsPC-1-Zellen, bei denen nur ein autokriner Effekt zu beobachten war, hatten die MiaPaCa-2-Zellen darüber hinaus eine zwei- bis mehr als vierfache höhere Transfektionseffizienz. Es ließe sich daher vermuten, dass die Proteinkonzentration im Medium der Panc1- und AsPC-1-Zellen zu gering war, um den parakrinen Effekt hervorzurufen. Dies müsste anhand der Analyse der Überstände der AsPC-1- und Panc1-Zelllinien überprüft werden. Ein Kontrollexperiment mit einem SFRP2-Konstrukt würde es ermöglichen, nicht native Interaktionen des SFRP2-GFP-Proteins in allen Zelllinien auszuschließen. Zusätzlich ist die Kultur von untransfizierten Zellen in Medium möglich, das als konditioniertes Medium von transfizierten Zellen stammt oder dem rekombinantes SFRP2 in definierter Menge zugegeben wurde, um durch Transfektion und Überexpression hervorgerufene intrazelluläre Effekte auszuschließen und stattdessen den parakrinen Effekt sowie die nötige Proteinkonzentration für dessen Induzierung in den Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen. Eine Zugabe eines anti-SFRP2-Antikörpers zum Medium nach der Transfektion könnte klären, ob dieses Phänomen durch parakrin wirkendes SFRP2 vermittelt wird.

Die anfänglichen verringerten Proliferationsraten der Zelllinien insbesondere nach einer Transfektion könnten durch einen Regenerationsprozess der Zellen verursacht sein. Nach diesem und einer gleichzeitigen Abnahme der Apoptoserate setzte die Proliferation wieder ein, sodass die PKH-Intensität an Messtag 6 ähnlich der unbehandelten Kontrollen lag.

#### *4.7.2.3 Einfluss der SFRP2-Überexpression auf den kanonischen Wnt-Signalweg*

Ob die SFRP2-GFP-Überexpression in Panc1-, AsPC1- und MiaPaCa-2 Zellen den kanonischen Wnt-Signalweg beeinflusst, wurde mittels einer quantitativen Genexpressionsanalyse von den intrazellulären

Komponenten *Dishevelled1, 2* und *3*,  $\beta$ -Catenin, *CyclinD1*, *MYC* und *JUN* der Signalkaskade untersucht (siehe Abb. 4.7.2).



**Abb. 4.7.2: Wnt-Signalwege und in der Expressionsanalyse untersuchte Zielgene (blau umrandet).** Diese waren: *Dishevelled1, 2* und *3* (*Dvl*),  $\beta$ -Catenin, *CyclinD1* (*cycD*), *MYC* (*c-myc*) und *JUN* (*c-jun*).

Die Expression der gemessenen Gene war auf Transkriptebene in den Zelllinien MiaPaCa-2 und Panc1 identisch zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen und in der Zelllinie AsPC-1 in den transfizierten Zellen minimal erhöht (siehe Abb. 3.6.28). Dieser Anstieg betrug weniger als eine Zehnerpotenz, weswegen ein wirklicher Effekt unwahrscheinlich war. Die Überexpression des SFRP2-GFP-Proteins konnte anhand einer Zunahme der Transkripte um  $10^4$ - $10^5$  eindeutig festgestellt werden, sodass, falls das Protein den Signalweg beeinflussen würde, eine Aktivierung hätte eintreten sollen.

Die mit dem SFRP2-GFP-Konstrukt transfizierten Zellen wurden als Gesamtpopulation in der RNA-Isolierung eingesetzt. Wie jedoch gezeigt wurde, lag die Transfektionseffizienz zum Teil bei unter 20 %. Möglicherweise hätte sich durch eine Trennung der SFRP2-GFP-positiven von den SFRP2-GFP-negativen Zellen ein Unterschied in den positiven Zellen detektieren lassen.

Wie bereits erläutert, zeigten sich in den untersuchten Zelllinien bereits durch die Transfektion und die Expression des GFP-Proteins Effekte auf die Proliferation und die Apoptoserate der Zellen, die vor allem die ersten Messtagen betrafen. Die SFRP2-GFP-transfizierten Zellen könnten demnach durch die experimentelle Prozedur in der Proliferation verringert und der Apoptose erhöht sein, wodurch keine Änderungen in der Wnt-Signalkaskade entstehen müssten. Ein Vergleich zwischen den Messtagen steht aus, um eine Veränderung der Transkriptmengen über den gesamten Zeitraum zu verfolgen.

Die Überexpression von SFRP2-GFP hatte einen autokrinen Effekt auf die untersuchten Pankreas-tumorzelllinien. Offenbar existieren jedoch auch nicht sensitive Zelllinien, in denen eine SFRP2-Überexpression zu keiner Änderung der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges führt (Nawroth *et al.*, 2007). Nawroth *et al.* können diesen Effekt in CFPAC-1-Zellen jedoch nicht BxPC3-Zellen anhand

einer gleichbleibenden Signalstärke in einem Luciferasereporter-, „Assay“-System zeigen, mit dem sich die Transkriptionsaktivität des Signalweges über TCF/LEF unabhängig der Genexpression nachweisen lässt. Die BxPC-3-Zelllinie ließ sich mit dem SFRP2-GFP-Konstrukt nicht transfizieren, weswegen keine Daten zur Verfügung stehen, um sie mit den veröffentlichten Ergebnissen zu vergleichen. Ob die drei Zelllinien AsPC-1, MiaPaCa-2 und Panc-1 wie CFPAC-1 keine Änderung in der Aktivität des Signalweges zeigen, könnte anhand des eingesetzten Reportersystems überprüft werden. Die fehlende Änderung in der  $\beta$ -Catenin-vermittelten Transkriptionsaktivität könnte in einer konstitutiven Aktivierung, sodass die Transkriptionsraten bereits hoch sind, oder einer Blockierung des Signalweges begründet sein. Dies ließe sich durch Nachweis der Lokalisation von  $\beta$ -Catenin mittels Immunfluoreszenz oder im Immunblot als Vergleich zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion identifizieren. Inhibitoren des Signalweges wie IWP-Moleküle könnten eine weitere funktionelle Analyse des Signalweges in den Tumorzelllinien und einen Vergleich zum Einfluss von SFRP2 erlauben.

#### 4.7.3 Die potentielle funktionelle Rolle von SFRP2 im Pankreas

Die Secreted Frizzled-related Proteine besitzen zwei Domänen: die Cystein reiche Frizzled-Domäne und die Netrin-ähnliche Domäne. Die Cystein reiche Frizzled-Domäne mit fünf charakteristischen Disulfidbrücken ist auf Aminosäureebene zu 30 - 50 % ähnlich der extrazellulären Domäne des Frizzled-Rezeptors, an den die Wnt-Liganden binden (Bhat *et al.*, 2007). Neben einer Bindung von Wnt-Liganden ermöglicht die Domäne darüber hinaus die Homo- oder Heterodimerisierung mit dem Frizzled-Rezeptor (Bafico *et al.*, 1999). Die Netrin-ähnliche Domäne ist ein Merkmal extrazellulärer Proteine wie den Matrixmetalloproteinaseinhibitoren, einiger Komplementproteine und wachstumsfaktorenbindender Proteine (Bekhouche *et al.*, 2010). Über diese Domäne kann zudem die Bindung von Heparin beziehungsweise Heparansulfat erfolgen, die SFRPs potentiell stabilisieren können (Zhong *et al.*, 2007). Beide Domänen implizieren die extrazelluläre Funktion der Proteine und sind trotz einer unterschiedlichen funktionellen Einordnung in den SFRPs kooperativ verbunden (Kobayashi *et al.*, 2008; Lopez-Rios *et al.*, 2008). Sowohl die Funktion der Wnt-Modulation als auch die der Beeinflussung der extrazellulären Matrix sind an beide Domänen gekoppelt.

Die SFRPs wurden funktionell zuerst als apoptosemodulierende Proteine beschrieben (Melkonyan *et al.*, 1997). Die Modulierung der Wnt-Signalweges durch Bindung von Wnt-Liganden und an die Frizzled-Rezeptoren wird als funktioneller Mechanismus hierfür angesehen. Für SFRP1 ist jedoch auch bekannt, dass die Netrin-ähnliche Domäne am Prozess der Bindung von Wnt-Liganden beteiligt ist und somit erst die funktionelle Assoziation beider Domänen die Funktion ermöglicht (Lopez-Rios *et al.*, 2008).

##### 4.7.3.1 SFRP2 im Normalpankreas

Der kanonische Wnt-Signalweg ist für die Entwicklung des Pankreas in der Embryo-/Fetogenese entscheidend, da der aktivierte Signalweg die Entwicklung und Differenzierung des exokrinen Anteils

des Gewebes, primär der Azini, steuert (Murtaugh *et al.*, 2005). Dies belegen Studien am Mausmodell, die mit „knock out“-Versuchstieren durchgeführt wurden. Der „knock out“ betraf das Gen *β-Catenin* über das der Signalweg zentral seine Transkriptionsaktivierung ausführt. Depletierte Tiere entwickelten Pankreasgewebe, das reich an Langerhansschen Inseln war, jedoch nahezu keine Azini enthielt. Wildtyp-Varianten entwickelten einen normalen Pankreas. Eine Depletion des Gens nach der Differenzierung eines funktionsfähigen Pankreas hatte keine funktionellen Auswirkungen. Die Proliferation von Azinuszellen im Rahmen der Gewebehomöostase war in solchen Tieren jedoch unterbunden (Keefe *et al.*, 2012).

Die geringe beobachtete Expression von SFRP2 auf RNA- und Proteinebene wäre daher erklärbar, da der kanonische Signalweg nur im Falle einer Proliferation von Azinuszellen aktiviert sein müsste. Die schwachen Signale der immunhistochemischen Analyse in den Azini von Normalgewebe könnten hierfür ein Indiz sein. Dies würde jedoch voraussetzen, dass SFRP2 in den Azini eine proliferationsfördernde Funktion hat im Gegensatz zu den Tumorzellen, die bei einer SFRP2-Überexpression nicht proliferierten.

#### 4.7.3.2 SFRP2 in der chronischen Pankreatitis

Die beobachtete Induzierung der SFRP2-Expression in den Azini könnte entweder ein direkter Mechanismus der chronischen Pankreatitis sein oder als Reaktion auf die Stimulation durch umgebende Zellen erfolgen.

Nach einer induzierten akuten Pankreatitis war eine *β-Catenin*-Expression notwendig, um die Regeneration der Azinuszellen zu erlauben. Hierbei scheint auch der Notch-Signalweg, der ebenfalls durch diese induzierte Pankreatitis aktiviert wird, gezielt die Wnt-Signalkaskade zu steuern, um die Proliferation und Differenzierung der sich regenerierenden Azinuszellen zu beeinflussen (Jensen *et al.*, 2005; Siveke *et al.*, 2008). Zellen der Langerhansschen Inseln sind in ihrer Entwicklung, Funktion und Homöostase nicht oder nur geringfügig auf den kanonischen Wnt-Signalweg jedoch auf den Notch-Signalweg angewiesen (Apelqvist *et al.*, 1999). Gleichzeitig inhibiert eine aktive Notch-Signalkaskade die Entwicklung des exokrinen zellulären Anteils des Pankreas (Esni *et al.*, 2004). Somit scheinen beide Signalwege eng in der Entwicklung des Pankreas miteinander verbunden zu sein und nur eine Aktivierung des Wnt-Signalweges ermöglicht die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Azini.

Anhand der Beobachtungen in der akuten Pankreatitis könnte die gemessene erhöhte SFRP2-Expression in CP-Gewebe mit dem Regenerationsprogramm der Azini zusammenhängen. Eine SFRP2-Überexpression führt z.B. in MCF7-Zellen zu einer erhöhten *β-Catenin*-Expression und dessen intrazellulärer Konzentration (Melkonyan *et al.*, 1997). Somit könnte es sich um eine auto- oder parakrine Stimulation der Azinuszellen handeln, um die Regenerationsprozesse zu initiieren und zu regulieren. Zudem kann SFRP2 anti-apoptotisch wirken und daher den Azinuszellen in ihrer entzündeten Umgebung eine erhöhte Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli verleihen (Lee *et al.*, 2004).

Morris *et al.* demonstrieren im Mausmodell der induzierten akuten Pankreatitis die Bedeutung der  $\beta$ -Catenin-Expression in Azinuszellen im Zusammenhang mit einer *Kras*-Mutation, durch die Azinuszellen in die azinär-duktales Metaplasie übergehen können, die als Vorstufe der neoplastischen Stadien gilt (Morris *et al.*, 2010). Mutiertes *Kras* führt demnach zu einer Inhibierung des kanonischen Signalweges durch Reduzierung des zytosolischen  $\beta$ -Catenins und verhindert somit die Regenerierung. Stattdessen dedifferenzieren die Azinuszellen und initiieren die Metaplasie. Eine Reaktivierung des Signalweges verhindert den Prozess und setzt die Regeneration wieder in Gang. Ob eine SFRP2-Expression ein positives Indiz für die Verhinderung einer *Kras*-Mutation im Gewebe mit einer Pankreatitis sein könnte, ließe sich vermutlich nur in einem vergleichbaren Mausexperiment durchführen, in dem die SFRP2-Expression vor oder nach einer Mutation des Gens ausgeschaltet oder induziert wird.

Die chronische Pankreatitis wird als ein Risikofaktor der Entstehung eines Pankreaskarzinoms vermutet (Malka *et al.*, 2002). Jedoch ist die Anzahl von CP-Patienten, die auch ein PDAC entwickeln sehr gering, und das Risiko beträgt maximal 5 %. Anhand des beschriebenen Regenerationsmechanismus der Azinuszellen auf der Grundlage eines aktivierten kanonischen Wnt-Signalweges scheinen die Zellen die Entstehung einer initialen Metaplasie zu verhindern. SFRP2 könnte hier als auto- oder parakriner positiver Regulator dienen.

Da jedoch die Interaktion der Azini mit den Sternzellen einen Einfluss auf die Entzündungsprozesse der Pankreatitis hat, kann die Rolle von SFRP2 auch gegensätzlich sein. Die von den PSC sekretierten Faktoren bilden die Grundlage der fibrotischen Reaktion im Stroma, sodass potentiell das von den Azini sekretierte SFRP2 als aktivierendes Molekül für die PSCs dienen könnte (Haber *et al.*, 1999; Erkan *et al.*, 2012). In diesem Fall wäre SFRP2 als negativer Faktor anzusehen. Da jedoch das Risiko, wie oben beschrieben, wegen einer chronischen Pankreatitis an einem PDAC zu erkranken sehr gering ist, kann eine initiierende Rolle einer hohen SFRP2-Expression für einen Tumor eher ausgeschlossen werden. Welche Funktion SFRP2 in der chronischen Pankreatitis ausführt, kann anhand der Literatur und der Daten dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

#### 4.7.3.3 SFRP2 im Tumorgewebe und stromaspezifische Expression

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse verdeutlichten, dass Fibroblasten und pankreatische Sternzellen, die einen Großteil der Zellpopulation im Tumorstroma bilden, das Protein in hohem Maße exprimieren (Apte *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2011). Anhand der Genexpressionsmuster im Tumorgewebe konnten für diese Zelltypen charakteristische Gene wie Vimentin, Procollagen und Decorin als überexprimiert identifiziert werden (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001). Im gesunden Pankreas sind vermutlich weniger als 5 % der Gesamtzellen PSCs, die mit den Azini verknüpft sind (Erkan *et al.*, 2012). Wie bei der Ausbildung fibrotischem Gewebes in der Pankreatitis werden Sternzellen als eine wichtige Komponente der desmoplastischen Reaktion im Pankreastumorgewebe angesehen. Gewebeanalysen zeigen, dass diese Zellen im Tumor aktiviert sind und mit den Tumorzellen interagieren.

PSCs können als ruhende Zellen aus Pankreasgewebe isoliert werden, aktivieren sich nach kurzer Dauer von ca. 24-48 h der Kultivierung jedoch eigenständig (Bachem *et al.*, 1998), was ihrem Zustand im Tumorstroma ähnelt. Wie die semi-quantitative PCR-Analyse der Genexpression in RNA-Proben von vier aus verschiedenen gesunden Spendern isolierten und kultivierten PSC-Zelllinien zeigte, war eine *SFRP2*-Expression dort nachweisbar (siehe Abb. 3.6.10). Anhand der gelelektrophoretisch aufgetrennten Amplifikate wäre jedoch eine geschätzte Expression unter dem Niveau von *Cyclophilin B* zu vermuten. Im Gegensatz zu den etablierten Tumorzelllinien, in denen die *SFRP2*-Expression gegen die Kontrollbezugsgene mit einem Faktor von mindestens  $10^{-2}$  stark verringert war (siehe Abb. 3.6.12), deutete diese nachweisbare Expression auf die PSCs als eine Quelle im Tumorgewebe hin. In der quantitativen Genexpressionsanalyse konnten zum Teil auch sehr hohe normalisierte Expressionswerte im Tumorgewebe einzelner Proben von über 5 gemessen werden (siehe Tab. 3.6.4). *SFRP2* könnte als autokriner Stimulationsfaktor für PSCs dienen, der zusätzlich zur konstitutiven Aktivierung der Zellen über die bekannten Faktoren wie z.B. IL-6, TGF- $\beta$ 1 und Periostin beiträgt und eine Apoptoseresistenz fördert, die für andere Zellen beschrieben ist (Erkan *et al.*, 2012).

Zusätzlich könnte eine Aktivierung der *SFRP2*-Expression von PSCs im Stroma eintreten, die durch Interaktionen mit den Tumorzellen und weiteren im Stroma befindlichen Zellen hervorgerufen sein könnte. Eine gegenseitige Beeinflussung der Sternzellen und Tumorzellen auf Basis von Chemo- und Cytokinen wie z.B. TGF- $\beta$  und PDGF, die mit einer erhöhten Proliferation und Invasivität von Tumorzellen im Pankreas korreliert, ist nachgewiesen (Xu *et al.*, 2010). Auf Grund dieser proliferationsfördernden Wirkung steht ein anti-proliferativer parakriner Effekt von *SFRP2* auf Tumorzellen, der sich anhand der funktionellen Daten dieser Arbeit zeigte, in direktem Gegensatz, da das Protein die pro-proliferativen Effekte zumindest verringern würde, falls die Tumorzellen sensitiv für die vermittelten Signale sind. Eine verringerte Proliferation von Tumorzellen könnte eine bessere Prognose implizieren, die jedoch anhand der statistischen Analysen in dieser Arbeit nicht festgestellt wurde. Jedoch kann auch im Gewebe ein gewisser Schwellenwert des Proteins notwendig sein, um eine anti-proliferative Wirkung auf Tumorzellen auszuüben, die nicht oder nur selten erreicht wird.

Dass *SFRP2* gegenüber den anderen Proteinen der Familie wie z.B. *SFRP1* und *SFRP4* im Tumorgewebe stark exprimiert vorliegt, unterstützt eher einen tumorfördernden Einfluss (Melkonyan *et al.*, 1997; Pilarsky *et al.*, 2008; Froeling *et al.*, 2011). Froeling *et al.* weisen eine Expression von *SFRP4*, einem Protein aus der gleichen Familie, auf Transkript- und Proteinebene für PSCs im Pankreasnormal- jedoch nicht im Tumorgewebe nach (Froeling *et al.*, 2011). Die Expressionsänderung wird mit der Aktivierung der PSCs und deren damit verbundenem Verlust des gespeicherten Retinols in Verbindung gebracht. Durch Zugabe von Retinsäurederivaten im *in vitro*- und *in vivo*-System ließen sich die Zellen in ihren ruhenden Zustand zurückführen, wodurch die *SFRP4*-Expression im Tumorstroma induziert wurde. Gleichzeitig verringerte sich der nukleäre Anteil des  $\beta$ -Catenins in benachbarten Tumorzellen, was auf einen inhibierenden Einfluss auf den kanonischen Wnt-Signalweg deutete. Die Proliferation der Tumorzellen reduzierte sich dadurch, während die Apoptoserate stieg.



Anhand der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse verhielte sich die Expression von SFRP2 entgegengesetzt zu SFRP4, da es im Tumorstroma überexprimiert vorlag, jedoch nicht oder nur in geringer Menge im Normalgewebe detektiert werden konnte. Dass die einzelnen Proteine der SFRP-Familie differentiell in Geweben exprimiert sind und auch eine unterschiedliche Funktion aufweisen können, ist bereits bei der initialen Charakterisierung von SFRP1 (secreted apoptosis-related protein, SARP2) und SFRP2 (SARP1) aufgezeigt worden (Melkonyan *et al.*, 1997). Hier führte SFRP2 zu einer Apoptoseresistenz in Mammakarzinomzelllinien gegenüber biochemischen Stimuli und hatte einen potentiell positiven Effekt auf den kanonischen Wnt-Signalweg. SFRP1 wirkte pro-apoptotisch.

Daneben kann SFRP2 auch primär eine Rolle in der durch die PSC geförderten desmoplastischen Reaktion besitzen, da es eine Netrin-ähnliche Domäne besitzt, die sich auch in Matrixmetalloproteinaseinhibitoren wiederfinden lässt (Bekhouche *et al.*, 2010). Zudem ist eine Aktivierung von Procollagen-C-proteinase beschrieben, wodurch Vorläuferkollagene in die eigentlichen fibrillären Moleküle prozessiert werden (Kobayashi *et al.*, 2008). In diesem Fall ist die Netrin-ähnliche Domäne, obwohl es die Ähnlichkeit vermuten ließe, nicht allein an der Funktion beteiligt, sondern schließt die Cystein reiche Domäne mit ein. Konsistent mit dieser Funktion ist eine beschriebene Überexpression in Pankreastumorgewebe von Genen wie Procollagen und Decorin, die entsprechende Komponenten der extrazellulären Matrix sind (Crnogorac-Jurcevic *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde zudem Lumican als überexprimiertes Gen in PDAC-Gewebe identifiziert, das ebenfalls in der extrazellulären Matrix des Tumorstromas lokalisiert ist und durch PSC sekretiert wird (Köninger *et al.*, 2004).

Eine potentielle weitere Funktion von SFRP2 wird im Zusammenhang mit der Angiogenese gesehen, da das Protein mit dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) über die Aktivierung des NFAT/Calcineurin-Signalweges im Mammakarzinom-Mausmodell die Gefäßneubildung förderte (Siamakpour-Reihani *et al.*, 2011). Jedoch wird das PDAC-Gewebe als gefäßarm und in Teilen hypoxisch beschrieben, wodurch Nischen für mögliche Krebsstammzellen geschaffen werden und die Diffusion von Therapiewirkstoffen stark vermindert ist (Feig *et al.*, 2012).

Der kanonische Signalweg besitzt ebenfalls eine Relevanz in der terminalen Differenzierung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Gattinoni *et al.*, 2010). Ein aktivierter kanonischer Signalweg führt zu einer Verringerung der Bildung von CD8<sup>+</sup>-Effektorzellen aus naiven T-Zellen, indem primär die Subpopulation der zentralen Gedächtniszellen favorisiert wird. Bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgt durch eine aktivierte kanonische Wnt-Signalkaskade eine Polarisierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen, die mit einer humoralen Immunantwort verknüpft sind. Unter der Voraussetzung, dass SFRP2 auch in T-Zellen den Wnt-Signalweg aktivieren kann, würde dies auf eine direkte Verhinderung einer cytotoxischen Immunantwort im Stroma hindeuten, da die Differenzierung zu T-Effektorzellen unterbunden wäre und T-Helferzellen einer humoralen Immunantwort gebildet würden. Somit würde das Stroma, primär durch die Sternzellen, eine negative Immunregulation besitzen. Hierfür existieren Hinweise, da z.B. Galectin-1 von PSCs exprimiert wird, wodurch ebenfalls eine Polarisierung zu T<sub>H</sub>2-Zellen und eine erhöhte Apoptoserate von zytotoxischen Lymphozyten erreicht wird (Tang *et al.*, 2011).

Das Stroma des PDAC erscheint somit als potentiell tumorfördernder Gewebeanteil, in dem SFRP2 vielfältige Funktionen ausüben kann, die auf Grund seiner beiden, funktionell unterschiedlichen Domänen herrühren. Welche dieser Funktionen wirklich zutreffen und die entscheidende Rolle für den Tumor spielen, kann anhand der bisher gewonnen Daten nur vermutet werden.

#### 4.8 Ausblick

Zum einen wurden potentielle Biomarker identifiziert, für die eine Validierung stattfinden muss. Dies kann mit den vorhandenen histologischen Schnittpräparaten und einem Nachweis äquivalent zum SFRP2 auf Proteinebene erfolgen. Kandidaten wie ANXA1, BMI1, CALU, LUM und RGS5 wurden bereits mit prognostischen Daten in anderen Tumorentitäten veröffentlicht.

Zielstrukturen für antikörperbasierte oder T-Zell-vermittelte Immuntherapien stellen Zelloberflächenproteine dar. Im Datensatz des „Yeast Survival Screenings“ konnten einige dieser Gene identifiziert werden, von denen z.B. *GPM6A*, *PPAP2B* und *TGFBR2* in der Genexpressionsanalyse untersucht wurden. Auf das therapeutische Potential aller identifizierten Gene für Oberflächenproteine wurde bisher nicht eingegangen. Hierzu müsste die Selektion unter geänderten Parametern durchgeführt werden und mögliche weitere Analysen wie Epitopvorhersagen und ein „Screening“ von potentiellen MHC-I- und MHC-II-Peptiden erfolgen.

Auf Grund der nicht idealen Zusammensetzung der Patientenkollektive, in denen vor allem die Stadien I und III unterrepräsentiert waren, sind erneute Experimente mit homogeneren Kollektiven eine Möglichkeit, besonders in Stadium I relevante Kandidaten zu identifizieren, die diagnostische Aussagen erlauben. Dies stellt jedoch wegen des bisherigen diagnostischen Problems des Pankreaskarzinoms keine triviale Frage dar.

Mit der Identifizierung der Überexpression und der Lokalisation von SFRP2 im Tumorstroma (siehe Kapitel 3.6.1) ergeben sich nicht nur funktionelle Fragen (siehe Kapitel 4.7.3.3), sondern auch potentielle therapeutische Implikationen. Dieses Protein ist im Gegensatz zu SFRP1 und SFRP4 im Pankreastumorgewebe überexprimiert. Es kann zudem funktionell im Tumorstroma am Umbau der extrazellulären Matrix und der Angiogenese beteiligt sein und ein immunsuppressives Tumormikromilieu begünstigen. Die Expressionsquelle sind vermutlich Fibroblasten und/oder die pankreatischen Sternzellen, die mit den Tumorzellen interagieren und ihre Proliferation sowie die Invasivität und Metastasierung fördern. Ein Nachweis der myofibroblastenähnlichen Sternzellen ist mittels des Markers „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ in histologischen Schnittpräparaten möglich (Erkan *et al.*, 2012). Da die Sternzellen auf Transkriptebene SFRP2-positiv waren, würde eine Kokultur mit Tumorzellen erlauben, direkt den Effekt von den SFRP2-sezernierenden und mit den Tumorzellen interagierenden Zellen auf die Proliferation der Tumorzellen zu überprüfen. SFRP2-Depletion sowie Wnt-Inhibition mit Antikörpern und molekularen Substanzen könnten einen prinzipiellen Einblick zur Relevanz von SFRP2 im PDAC ermöglichen. Dies würde einen weiteren Einblick zur Relevanz der

Sternzellen, die als eine Hauptkomponente und Förderer der desmoplastischen Reaktion angesehen werden, geben. Die stromale Zusammensetzung im PDAC wird als ein Hauptgrund für das Scheitern von Therapien betrachtet, wodurch sich gegen dieses Gewebe, seine Komponenten und Produkte gezielte Wirkstoffe als notwendig erweisen (Feig *et al.*, 2012). Ob sich SFRP2 als eine potentielle Zielstruktur eignet, ist derzeit spekulativ, zumal das Gen auch in anderen Geweben exprimiert wird. Jedoch wäre dieses Protein auf Grund der möglichen vielfältigen Funktionen eine interessante Option. SFRP2 wurde mit verschiedenen experimentellen Methoden funktionell untersucht. Um den Einfluss der SFRP2-Expression auf die über den kanonischen Wnt-Signalweg vermittelte Apoptose und Proliferation weiter zu untersuchen, kann über die in Kapitel 4.7.2 genannten Experimente hinaus die Expression der jeweiligen Frizzled-Rezeptoren und Wnt-Liganden in den Tumorzelllinien untersucht werden, um Unterschiede zu identifizieren. Dies schließt die Analyse der Expressionsänderung im Hinblick auf einen parakrinen Effekt sowie durch Inhibitoren und apoptotische Stimuli wie UV-Strahlung oder Chemotherapeutika mit ein.

## 5 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-amino-Actinomycin
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität („antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“)
ADM	Azinär-duktale Metaplasie
AFP	$\alpha$ -1-Fetoprotein
AG	Arbeitsgruppe
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Allophycocyanin (Zytometrie) beziehungsweise Adenomatous polyposis coli (Gen)
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutiert
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Aza	5-Azacytidin
BD	Becton Dickinson
bp	Basenpaare
BRCA	Brustkrebsanfälligkeitsprotein („breast cancer type susceptibility protein“)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumine“)
CA	Krebsantigen („cancer antigen“)
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CBS-K	Superchemiblock
CD	Unterscheidungsgruppen („cluster of differentiation“)
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität („complement-dependent cytotoxicity“)
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region („complementary determining region“)
CEA	Karzino-embryonisches Antigen („carcino-embryogenic antigen“)
CML	Chronische myeloische Leukämie
CP	Chronische Pankreatitis
C <sub>p</sub>	Überschreitungspunkt („crossing point“)
CT-Antigen	Krebs-Testis-Antigen („cancer-testis-antigen“)
CTLA-4	„Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4“
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c)DNA	(Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure („(complementary) deoxyribonucleic acid“)
DNMT	DNA Methyltransferasen
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure („ethylene diamine tetra acetic acid“)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor („epidermal growth factor receptor“)

ELISA	Enzym-gekoppeltes Immunabsorptionsmessverfahren („enzyme linked immunosorbent assay“)
EPZ	Europäisches Pankreaszentrum
ER	Östrogenrezeptor („estrogen receptor“)
FCS	Fötales Kälberserum („fetal calf serum“)
FFPE	Formalin fixiertes in Paraffin eingebettetes Gewebe („formalin-fixed paraffin-embedded tissue“)
FSC	Vorwärtsstreulicht („forward scatter“)
FZD	Frizzled
GC	Glutathion-Casein (ELISA/Serologie) oder Guanosin/Cytidin (DNA)
GFP	Grünfluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“)
GST	Glutathion S-Transferase
HDAC	Histondeacetylasen
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie 293 („human embryonal kidney cells 293“)
HER2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2 („human epidermal growth factor receptor 2“)
HPRD	Human Protein Reference Database
HPRT	Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase
HPV	Humane Papillomviren
HR	„Hazard Ratio“
HRP	Meerrettichperoxidase („horse radish peroxidase“)
IgG	Immunglobulin $\gamma$
IL	Interleukin
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IPMN	Intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LB	„Lysogene Broth“
M	Marker (in Abbildungen)
MAGE	Melanomassoziiertes Antigen
MAP	Mitogenaktiviertes Protein („mitogen activated protein“)
MCN	Muzinös zystische Neoplasie („mucinous cystic neoplasia“)
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
Mio.	Millionen
MUC	Mucin
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
(d)NTP	(Desoxy)-Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
OptiMEM	Modifiziertes minimales essentielles Kulturmedium

PAI1	Plasminogenaktivatorinhibitor 1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PALB2	(„partner and localizer of BRCA2“)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PBST	PBS mit 0.05 % Tween-20
(q)PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion („(quantitative) polymerase chain reaction“)
PD-1	„Programmed death 1“
PDAC	Pankreatisches duktales Adenokarzinom („pancreatic ductal adenocarcinoma“)
PR	Progesteronrezeptor
PKH26	Paul Karl Horan-26-Farbstoff
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSC	Pankreatische Sternzellen („pancreatic stellate cells“)
(m)RNA	(Boten-)Ribonukleinsäure („(messenger) ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
SEREX	Serologische Antigenidentifizierung mittels klonierter rekombinanter Expressionsbanken („serological identification of antigens by recombinant expression cloning“)
SERM	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren („Selective estrogen receptor modulators“)
SFRP	Sekretiertes Frizzled ähnliches Protein („Secreted Frizzled-related Protein“)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus („single nucleotide polymorphism“)
SSC	Seitwärtsstreulicht („side scatter“)
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
SV40	Simian Virus 40
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen Typ 2
TNM	Tumorparameter-Lymphknotenmetastasierung-Fernmetastasierungs-klassifikation („tumor-lymph node metastasis-distant metastasis classification“)
TSA	Trichostatin A
U	Enzymaktivität µmol/min („unit“)
UICC	Internationale Gemeinschaft gegen den Krebs („Union internationale contre le cancer“)
uPA	Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
UV	ultraviolett
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor („vascular endothelial growth factor“)
Wnt	Wingless Integration
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

## 6 Literaturverzeichnis

- Adinolfi, A., M. Adinolfi, et al. (1975).** "Alpha-feto-protein during development and in disease." *J Med Genet* 12(2): 138-151.
- Anastas, J. N. and R. T. Moon (2013).** "WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer." *Nat Rev Cancer* 13(1): 11-26.
- Anderson, K. S., N. Ramachandran, et al. (2008).** "Application of protein microarrays for multiplexed detection of antibodies to tumor antigens in breast cancer." *J Proteome Res* 7(4): 1490-1499.
- Andriole, G. L., E. D. Crawford, et al. (2012).** "Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up." *J Natl Cancer Inst* 104(2): 125-132.
- Apelqvist, A., H. Li, et al. (1999).** "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." *Nature* 400(6747): 877-881.
- Apte, M. V., S. Park, et al. (2004).** "Desmoplastic reaction in pancreatic cancer: role of pancreatic stellate cells." *Pancreas* 29(3): 179-187.
- Apte, M. V., R. C. Pirola, et al. (2012).** "Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas." *Front Physiol* 3: 344.
- Arensman, M. D., A. N. Kovoichich, et al. (2013).** "WNT7B mediates autocrine Wnt/beta-catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma." *Oncogene*.
- Bachem, M. G., E. Schneider, et al. (1998).** "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." *Gastroenterology* 115(2): 421-432.
- Bafico, A., A. Gazit, et al. (1999).** "Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling." *J Biol Chem* 274(23): 16180-16187.
- Baselga, J., D. Pfister, et al. (2000).** "Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin." *J Clin Oncol* 18(4): 904-914.
- Bekhouche, M., D. Kronenberg, et al. (2010).** "Role of the netrin-like domain of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the control of metalloproteinase activity." *J Biol Chem* 285(21): 15950-15959.
- Berlin, N. I. (1981).** "Tumor markers in cancer prevention and detection." *Cancer* 47(5 Suppl): 1151-1153.
- Bernstein, B. E., A. Meissner, et al. (2007).** "The mammalian epigenome." *Cell* 128(4): 669-681.
- Berzofsky, J. A., M. Terabe, et al. (2004).** "Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer." *J Clin Invest* 113(11): 1515-1525.
- Bhat, R. A., B. Stauffer, et al. (2007).** "Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function." *J Cell Biochem* 102(6): 1519-1528.
- Bhatt, A. N., R. Mathur, et al. (2010).** "Cancer biomarkers - current perspectives." *Indian J Med Res* 132: 129-149.
- Bignell, G. R., C. D. Greenman, et al. (2010).** "Signatures of mutation and selection in the cancer genome." *Nature* 463(7283): 893-898.
- Boeck, S., A. Jung, et al. (2013).** "KRAS mutation status is not predictive for objective response to anti-EGFR treatment with erlotinib in patients with advanced pancreatic cancer." *J Gastroenterol*.
- Bos, J. L., E. R. Fearon, et al. (1987).** "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers." *Nature* 327(6120): 293-297.
- Boss, C. N., F. Grunebach, et al. (2007).** "Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen." *Clin Cancer Res* 13(11): 3347-3355.
- Bovolenta, P., P. Esteve, et al. (2008).** "Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease." *J Cell Sci* 121(Pt 6): 737-746.
- Bradeen, H. A., C. A. Eide, et al. (2006).** "Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations." *Blood* 108(7): 2332-2338.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braman, J., C. Papworth, et al. (1996).** "Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates." *Methods Mol Biol* 57: 31-44.
- Brat, D. J., K. D. Lillemoe, et al. (1998).** "Progression of pancreatic intraductal neoplasias to infiltrating adenocarcinoma of the pancreas." *Am J Surg Pathol* 22(2): 163-169.

- Brembeck, F. H., F. S. Schreiber, et al. (2003).** "The mutant K-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice." *Cancer Res* 63(9): 2005-2009.
- Bretthauer, M. and M. Kalager (2012).** "Colonoscopy as a triage screening test." *N Engl J Med* 366(8): 759-760.
- Brezniceanu, M. L., K. Volp, et al. (2003).** "HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma." *FASEB J* 17(10): 1295-1297.
- Brodie, A. M. (1994).** "Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 49(4-6): 281-287.
- Bu, X. M., C. H. Zhao, et al. (2008).** "Hypermethylation and aberrant expression of secreted frizzled-related protein genes in pancreatic cancer." *World J Gastroenterol* 14(21): 3421-3424.
- Buamah, P. K., D. J. Bent, et al. (1993).** "A profile of serum CA 15-3, carcinoembryonic antigen, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transferase levels in patients with breast cancer." *J Surg Oncol* 53(2): 84-87.
- Bustin, S. A. (2000).** "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* 25(2): 169-193.
- Cadigan, K. M. and M. Peifer (2009).** "Wnt signaling from development to disease: insights from model systems." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(2): a002881.
- Caldas, C., S. A. Hahn, et al. (1994).** "Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma." *Nat Genet* 8(1): 27-32.
- Caldas, C. and S. E. Kern (1995).** "K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma." *Int J Pancreatol* 18(1): 1-6.
- Castro, J. R. (1995).** "Results of heavy ion radiotherapy." *Radiat Environ Biophys* 34(1): 45-48.
- Catalona, W. J., D. S. Smith, et al. (1991).** "Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer." *N Engl J Med* 324(17): 1156-1161.
- Cenci, T., M. Martini, et al. (2012).** "Prognostic relevance of c-Myc and BMI1 expression in patients with glioblastoma." *Am J Clin Pathol* 138(3): 390-396.
- Chames, P. and D. Baty (2009).** "Bispecific antibodies for cancer therapy." *Curr Opin Drug Discov Devel* 12(2): 276-283.
- Chen, M., M. Van Ness, et al. (2012).** "Molecular pathology of pancreatic neuroendocrine tumors." *J Gastrointest Oncol* 3(3): 182-188.
- Chu, G. C., A. C. Kimmelman, et al. (2007).** "Stromal biology of pancreatic cancer." *J Cell Biochem* 101(4): 887-907.
- Claeys, A., A. Cornelis, et al. (1989).** "Fully automated measurements by light microscopy of tissue sections using a cellular array computer." *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 135(1): 83-90.
- Codices, V., C. Martins, et al. (2013).** "Dynamics of cytokines and immunoglobulins serum profiles in primary and secondary *Cryptosporidium parvum* infection: usefulness of Luminex(R) xMAP technology." *Exp Parasitol* 133(1): 106-113.
- Colomer, R., A. Ruibal, et al. (1986).** "Circulating CA 15.3 levels in breast cancer. Our present experience." *Int J Biol Markers* 1(2): 89-92.
- Cox, D. R. (1972).** "Regression Models and Life-Tables." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 34(2): 34.
- Creighton, J. E., R. Lyall, et al. (2000).** "Mutations of the cationic trypsinogen gene in patients with hereditary pancreatitis." *Br J Surg* 87(2): 170-175.
- Creusot, F., G. Acs, et al. (1982).** "Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine." *J Biol Chem* 257(4): 2041-2048.
- Crnogorac-Jurcevic, T., E. Efthimiou, et al. (2001).** "Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia." *Oncogene* 20(50): 7437-7446.
- Davidson, B. R., C. Y. Yiu, et al. (1988).** "A comparison of carcinoembryonic antigen (CEA) and epithelial membrane antigen (EMA) in human colorectal cancer." *Int J Cancer Suppl* 3: 56-60.
- de Kok, J. B., R. W. Roelofs, et al. (2005).** "Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes." *Lab Invest* 85(1): 154-159.
- De La, O. J., L. L. Emerson, et al. (2008).** "Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48): 18907-18912.
- de Vries, T. J., P. H. Quax, et al. (1994).** "Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression." *Am J Pathol* 144(1): 70-81.
- de Wit, M., E. J. Belt, et al. (2012).** "Lumican and Versican Are Associated with Good Outcome in Stage II and III Colon Cancer." *Ann Surg Oncol*.



- Depontieu, F. R., J. Qian, et al. (2009).** "Identification of tumor-associated, MHC class II-restricted phosphopeptides as targets for immunotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29): 12073-12078.
- Derveaux, S., J. Vandesompele, et al. (2010).** "How to do successful gene expression analysis using real-time PCR." *Methods* 50(4): 227-230.
- Druker, B. J. and N. B. Lydon (2000).** "Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia." *J Clin Invest* 105(1): 3-7.
- Druker, B. J., S. Tamura, et al. (1996).** "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells." *Nat Med* 2(5): 561-566.
- Dudoit, S., M. J. van der Laan, et al. (2004).** "Multiple testing. Part I. Single-step procedures for control of general type I error rates." *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article13.
- Duncan, J. A., J. R. Reeves, et al. (1998).** "BRCA1 and BRCA2 proteins: roles in health and disease." *Mol Pathol* 51(5): 237-247.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002).** "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* 3(11): 991-998.
- Eisenhauer, E. A. (2011).** "Optimal assessment of response in ovarian cancer." *Ann Oncol* 22 Suppl 8: viii49-viii51.
- Eissmann, M., I. M. Melzer, et al. (2012).** "Overexpression of the anti-apoptotic protein AVEN contributes to increased malignancy in hematopoietic neoplasms." *Oncogene*.
- Emmert-Buck, M. R., R. F. Bonner, et al. (1996).** "Laser capture microdissection." *Science* 274(5289): 998-1001.
- Endo, Y. and T. Sawasaki (2006).** "Cell-free expression systems for eukaryotic protein production." *Curr Opin Biotechnol* 17(4): 373-380.
- Eng, C., G. Leone, et al. (2009).** "Genomic alterations in tumor stroma." *Cancer Res* 69(17): 6759-6764.
- Engelsman, E., C. B. Korsten, et al. (1973).** "Human breast cancer and estrogen receptor." *Arch Chir Neerl* 25(4): 393-397.
- Erkan, M., G. Adler, et al. (2012).** "StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research." *Gut* 61(2): 172-178.
- Esni, F., B. Ghosh, et al. (2004).** "Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas." *Development* 131(17): 4213-4224.
- Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006).** "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(4): 259-269.
- Esteller, M., P. G. Corn, et al. (2001).** "A gene hypermethylation profile of human cancer." *Cancer Res* 61(8): 3225-3229.
- Falini, B., E. Tiacci, et al. (2004).** "Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1)." *Lancet* 363(9424): 1869-1870.
- Feig, C., A. Gopinathan, et al. (2012).** "The pancreas cancer microenvironment." *Clin Cancer Res* 18(16): 4266-4276.
- Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. (2010).** GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer; 2010.
- Ferry, D., Hammond, L., Ranson, M., Kris, M. G., Miller, V., Murray, P., Tullo, A., Feyereislova, A., Averbuch, S., and Rowinsky, E. (2000).** "Intermittent oral ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (egfr-tki), shows evidence of good tolerability and activity: final results from a Phase I study." *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19.
- Fiegl, H., S. Millinger, et al. (2005).** "Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients." *Cancer Res* 65(4): 1141-1145.
- Fisher, R. A. (1922).** "On the Mathematical Foundations of Theoretical Statistics." *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* A(222): 59.
- Forbes, S. A., N. Bindal, et al. (2011).** "COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D945-950.
- Fridman, W. H., J. L. Teillaud, et al. (2011).** "The ultimate goal of curative anti-cancer therapies: inducing an adaptive anti-tumor immune response." *Front Immunol* 2: 66.
- Froeling, F. E., C. Feig, et al. (2011).** "Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-beta-catenin signaling to slow tumor progression." *Gastroenterology* 141(4): 1486-1497, 1497 e1481-1414.
- Frommer, M., L. E. McDonald, et al. (1992).** "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5): 1827-1831.
- Futreal, P. A., A. Kasprzyk, et al. (2001).** "Cancer and genomics." *Nature* 409(6822): 850-852.

- Galon, J., A. Costes, et al. (2006).** "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science 313(5795): 1960-1964.
- Garola, R. E. and W. L. McGuire (1977).** "An improved assay for nuclear estrogen receptor in experimental and human breast cancer." Cancer Res 37(9): 3333-3337.
- Gatenby, R. A., A. S. Silva, et al. (2009).** "Adaptive therapy." Cancer Res 69(11): 4894-4903.
- Gattinoni, L., Y. Ji, et al. (2010).** "Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy." Clin Cancer Res 16(19): 4695-4701.
- Gesellschaft, R. K.-I. u. d. and d. e. K. i. D. e.V. (2012).** Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- Giricz, O., J. L. Lauer, et al. (2010).** "Variability in melanoma metalloproteinase expression profiling." J Biomol Tech 21(4): 194-204.
- Gnjatic, S., L. J. Old, et al. (2009).** "Autoantibodies against cancer antigens." Methods Mol Biol 520: 11-19.
- Gnjatic, S., E. Ritter, et al. (2010).** "Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 107(11): 5088-5093.
- Goggins, M., M. Schutte, et al. (1996).** "Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas." Cancer Res 56(23): 5360-5364.
- Gomez, E., D. J. Jespersen, et al. (2010).** "Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 syphilis multiplex flow immunoassay for the detection of IgM- and IgG-class antitreponemal antibodies." Clin Vaccine Immunol 17(6): 966-968.
- Gross, S. and P. Walden (2008).** "Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer." Immunol Lett 116(1): 7-14.
- Guerrette, S., S. Acharya, et al. (1999).** "The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer." J Biol Chem 274(10): 6336-6341.
- Gurney, A., F. Axelrod, et al. (2012).** "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 109(29): 11717-11722.
- Haber, P. S., G. W. Keogh, et al. (1999).** "Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis." Am J Pathol 155(4): 1087-1095.
- Hahn, S. A., M. Schutte, et al. (1996).** "DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1." Science 271(5247): 350-353.
- Halama, N., S. Michel, et al. (2009).** "The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy." Cancer Immun 9: 1.
- Hamada, T., M. Goto, et al. (2005).** "Mapping of the methylation pattern of the MUC2 promoter in pancreatic cancer cell lines, using bisulfite genomic sequencing." Cancer Lett 227(2): 175-184.
- Hanahan, D. (1983).** "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol 166(4): 557-580.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011).** "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-674.
- Harsha, H. C., K. Kandasamy, et al. (2009).** "A compendium of potential biomarkers of pancreatic cancer." PLoS Med 6(4): e1000046.
- Hartmann, T. B., A. V. Bazhin, et al. (2005).** "SEREX identification of new tumor antigens linked to melanoma-associated retinopathy." Int J Cancer 114(1): 88-93.
- Hebrok, M., S. K. Kim, et al. (2000).** "Regulation of pancreas development by hedgehog signaling." Development 127(22): 4905-4913.
- Heinemann, V., D. Quietzsch, et al. (2006).** "Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer." J Clin Oncol 24(24): 3946-3952.
- Heinrich, M. C., D. J. Griffith, et al. (2000).** "Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor." Blood 96(3): 925-932.
- Hemminki, A., D. Markie, et al. (1998).** "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome." Nature 391(6663): 184-187.
- Hoekman, K., W. J. van der Vijgh, et al. (1999).** "Clinical and preclinical modulation of chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer." Drugs 57(2): 133-155.
- Huang, G., H. Song, et al. (2012).** "The relationship between RGS5 expression and cancer differentiation and metastasis in non-small cell lung cancer." J Surg Oncol 105(4): 420-424.
- Hughes, P., D. Marshall, et al. (2007).** "The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?" Biotechniques 43(5): 575, 577-578, 581-572 passim.
- Iengar, P. (2012).** "An analysis of substitution, deletion and insertion mutations in cancer genes." Nucleic Acids Res 40(14): 6401-6413.
- Ishiwata, T., K. Cho, et al. (2007).** "Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer." Oncol Rep 18(3): 537-543.

- Jager, E., S. Gnjatic, et al. (2000). "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers." Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12198-12203.
- James, R. G., W. H. Conrad, et al. (2008). "Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors." Methods Mol Biol 468: 131-144.
- Jensen, J. N., E. Cameron, et al. (2005). "Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration." Gastroenterology 128(3): 728-741.
- Jones, S., R. H. Hruban, et al. (2009). "Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene." Science 324(5924): 217.
- Jones, S. E. and C. Jomary (2002). "Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns." Bioessays 24(9): 811-820.
- Jörg Rüdiger Siewert, M. R., Volker Schumpelick (2010). Praxis der Viszeralchirurgie - Onkologische Chirurgie. Berlin-Heidelberg.
- Kagedal, B., M. Farneback, et al. (2007). "How useful are housekeeping genes? Variable expression in melanoma metastases." Clin Chem Lab Med 45(11): 1481-1487.
- Kantoff, P. W., C. S. Higano, et al. (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." N Engl J Med 363(5): 411-422.
- Kashmiri, S. V., R. De Pascalis, et al. (2005). "SDR grafting--a new approach to antibody humanization." Methods 36(1): 25-34.
- Kaufmann, M. and L. Pusztai (2011). "Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel." Cancer 117(8): 1575-1582.
- Kawamoto, K., H. Hirata, et al. (2008). "DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines." Int J Cancer 123(3): 535-542.
- Keefe, M. D., H. Wang, et al. (2012). "beta-catenin is selectively required for the expansion and regeneration of mature pancreatic acinar cells in mice." Dis Model Mech 5(4): 503-514.
- Kelly, T. K., D. D. De Carvalho, et al. (2010). "Epigenetic modifications as therapeutic targets." Nat Biotechnol 28(10): 1069-1078.
- Kim, B., H. Koo, et al. (2006). "TC1(C8orf4) correlates with Wnt/beta-catenin target genes and aggressive biological behavior in gastric cancer." Clin Cancer Res 12(11 Pt 1): 3541-3548.
- King, C. R., M. H. Kraus, et al. (1985). "Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma." Science 229(4717): 974-976.
- Kirkpatrick, R. B., P. J. McDevitt, et al. (2003). "A bicistronic expression system for bacterial production of authentic human interleukin-18." Protein Expr Purif 27(2): 279-292.
- Klein, A. P. (2013). "Identifying people at a high risk of developing pancreatic cancer." Nat Rev Cancer 13(1): 66-74.
- Knuth, A., B. Danowski, et al. (1984). "T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures." Proc Natl Acad Sci U S A 81(11): 3511-3515.
- Kobayashi, K., M. Luo, et al. (2009). "Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction." Nat Cell Biol 11(1): 46-55.
- Koninger, J., T. Giese, et al. (2004). "Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix." Biochem Biophys Res Commun 322(3): 943-949.
- Korman, A. J., K. S. Peggs, et al. (2006). "Checkpoint blockade in cancer immunotherapy." Adv Immunol 90: 297-339.
- Krishnan, V. V., I. H. Khan, et al. (2009). "Multiplexed microbead immunoassays by flow cytometry for molecular profiling: Basic concepts and proteomics applications." Crit Rev Biotechnol 29(1): 29-43.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lee, J. L., C. T. Lin, et al. (2004). "Autocrine/paracrine secreted Frizzled-related protein 2 induces cellular resistance to apoptosis: a possible mechanism of mammary tumorigenesis." J Biol Chem 279(15): 14602-14609.
- Leygue, E., L. Snell, et al. (1998). "Expression of lumican in human breast carcinoma." Cancer Res 58(7): 1348-1352.
- Li, C. F., K. H. Shen, et al. (2010). "Annexin-I overexpression is associated with tumour progression and independently predicts inferior disease-specific and metastasis-free survival in urinary bladder urothelial carcinoma." Pathology 42(1): 43-49.
- Li, J., S. Abraham, et al. (2008). "Proteomic-based approach for biomarkers discovery in early detection of invasive urothelial carcinoma." Proteomics Clin Appl 2(1): 78-89.

- Li, S., L. M. Iakoucheva, et al. (2010). "Loss of post-translational modification sites in disease." Pac Symp Biocomput: 337-347.
- Li, S., N. S. Ting, et al. (2000). "Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response." Nature 406(6792): 210-215.
- Li, Y., A. Karjalainen, et al. (2005). "p53 autoantibodies predict subsequent development of cancer." Int J Cancer 114(1): 157-160.
- Liang, G., M. F. Chan, et al. (2002). "Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements." Mol Cell Biol 22(2): 480-491.
- Lim, W., S. Olschwang, et al. (2004). "Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers." Gastroenterology 126(7): 1788-1794.
- Liu, T. H., A. Raval, et al. (2006). "CpG island methylation and expression of the secreted frizzled-related protein gene family in chronic lymphocytic leukemia." Cancer Res 66(2): 653-658.
- Lopez-Rios, J., P. Esteve, et al. (2008). "The Netrin-related domain of Sfrp1 interacts with Wnt ligands and antagonizes their activity in the anterior neural plate." Neural Dev 3: 19.
- Lorusso, G. and C. Rugg (2008). "The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis." Histochem Cell Biol 130(6): 1091-1103.
- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, et al. (1997). "Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group." J Natl Cancer Inst 89(6): 442-446.
- Lowery, M. A. and E. M. O'Reilly (2012). "Genomics and pharmacogenomics of pancreatic adenocarcinoma." Pharmacogenomics J 12(1): 1-9.
- Lu, H., V. Goodell, et al. (2007). "Targeting serum antibody for cancer diagnosis: a focus on colorectal cancer." Expert Opin Ther Targets 11(2): 235-244.
- Lynch, H. T., C. A. Deters, et al. (2005). "BRCA1 and pancreatic cancer: pedigree findings and their causal relationships." Cancer Genet Cytogenet 158(2): 119-125.
- Madhavan, D., M. Zucknick, et al. (2012). "Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer." Clin Cancer Res 18(21): 5972-5982.
- Magrane, M. and U. Consortium (2011). "UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data." Database (Oxford) 2011: bar009.
- Maitra, A., N. Fukushima, et al. (2005). "Precursors to invasive pancreatic cancer." Adv Anat Pathol 12(2): 81-91.
- Maitra, A. and R. H. Hruban (2008). "Pancreatic cancer." Annu Rev Pathol 3: 157-188.
- Malka, D., P. Hammel, et al. (2002). "Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis." Gut 51(6): 849-852.
- Mann, H. B. W., D.R. (1947). "On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other." The Annals of Mathematical Statistics 18(1): 11.
- Mansour, E. G., M. Hastert, et al. (1983). "Tissue and plasma carcinoembryonic antigen in early breast cancer. A prognostic factor." Cancer 51(7): 1243-1248.
- Margolin, K., M. S. Gordon, et al. (2001). "Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data." J Clin Oncol 19(3): 851-856.
- Markus, G., H. Takita, et al. (1980). "Content and characterization of plasminogen activators in human lung tumors and normal lung tissue." Cancer Res 40(3): 841-848.
- Marsit, C. J., M. R. Karagas, et al. (2005). "Epigenetic inactivation of SFRP genes and TP53 alteration act jointly as markers of invasive bladder cancer." Cancer Res 65(16): 7081-7085.
- Massoner, P., A. Lueking, et al. (2012). "Serum-autoantibodies for discovery of prostate cancer specific biomarkers." Prostate 72(4): 427-436.
- Mattioni, M., S. Soddu, et al. (2007). "Serum anti-p53 antibodies as a useful marker for prognosis of gastric carcinoma." Int J Biol Markers 22(4): 302-306.
- Melkonyan, H. S., W. C. Chang, et al. (1997). "SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 94(25): 13636-13641.
- Melle, C., G. Ernst, et al. (2007). "Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker." Clin Chem 53(4): 629-635.
- Moore, M. J. (2005). "Brief communication: a new combination in the treatment of advanced pancreatic cancer." Semin Oncol 32(6 Suppl 8): 5-6.
- Morris, J. P. t., S. C. Wang, et al. (2010). "KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma." Nat Rev Cancer 10(10): 683-695.
- Murtaugh, L. C., A. C. Law, et al. (2005). "Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development." Development 132(21): 4663-4674.

- Nahta, R. and F. J. Esteva (2006).** "Herceptin: mechanisms of action and resistance." *Cancer Lett* 232(2): 123-138.
- Nawroth, R., A. van Zante, et al. (2007).** "Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells." *PLoS One* 2(4): e392.
- Ndegwa, N., R. G. Cote, et al. (2011).** "Critical amino acid residues in proteins: a BioMart integration of Reactome protein annotations with PRIDE mass spectrometry data and COSMIC somatic mutations." *Database (Oxford)* 2011: bar047.
- Nelson, C. M. and M. J. Bissell (2006).** "Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer." *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 287-309.
- Noble, M. E., J. A. Endicott, et al. (2004).** "Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure." *Science* 303(5665): 1800-1805.
- Nobori, T., K. Miura, et al. (1994).** "Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers." *Nature* 368(6473): 753-756.
- Nolen, B., M. Winans, et al. (2009).** "Aberrant tumor-associated antigen autoantibody profiles in healthy controls detected by multiplex bead-based immunoassay." *J Immunol Methods* 344(2): 116-120.
- Odunsi, K., J. Matsuzaki, et al. (2012).** "Efficacy of vaccination with recombinant vaccinia and fowlpox vectors expressing NY-ESO-1 antigen in ovarian cancer and melanoma patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(15): 5797-5802.
- Omary, M. B., A. Lugea, et al. (2007).** "The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases." *J Clin Invest* 117(1): 50-59.
- Pages, F., A. Kirilovsky, et al. (2009).** "In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer." *J Clin Oncol* 27(35): 5944-5951.
- Palena, C. and J. Schlom (2010).** "Vaccines against human carcinomas: strategies to improve antitumor immune responses." *J Biomed Biotechnol* 2010: 380697.
- Palucka, K. and J. Banchereau (2012).** "Cancer immunotherapy via dendritic cells." *Nat Rev Cancer* 12(4): 265-277.
- Parkinson, H., U. Sarkans, et al. (2011).** "ArrayExpress update--an archive of microarray and high-throughput sequencing-based functional genomics experiments." *Nucleic Acids Res* 39(Database issue): D1002-1004.
- Pasca di Magliano, M., S. Sekine, et al. (2006).** "Hedgehog/Ras interactions regulate early stages of pancreatic cancer." *Genes Dev* 20(22): 3161-3173.
- Pegram, M. D., A. Lipton, et al. (1998).** "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment." *J Clin Oncol* 16(8): 2659-2671.
- Pickering, J. W., T. B. Martins, et al. (2002).** "Comparison of a multiplex flow cytometric assay with enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to tetanus, diphtheria, and Haemophilus influenzae Type b." *Clin Diagn Lab Immunol* 9(4): 872-876.
- Pilarsky, C., O. Ammerpohl, et al. (2008).** "Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling." *J Cell Mol Med* 12(6B): 2823-2835.
- Ping Lu, Y., T. Ishiwata, et al. (2002).** "Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells." *J Pathol* 196(3): 324-330.
- Portela, A. and M. Esteller (2010).** "Epigenetic modifications and human disease." *Nat Biotechnol* 28(10): 1057-1068.
- Rabenhorst, U., R. Beinoraviciute-Kellner, et al. (2009).** "Overexpression of the far upstream element binding protein 1 in hepatocellular carcinoma is required for tumor growth." *Hepatology* 50(4): 1121-1129.
- Ramos, C. A. and G. Dotti (2011).** "Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy." *Expert Opin Biol Ther* 11(7): 855-873.
- Rau, B. M., K. Moritz, et al. (2012).** "R1 resection in pancreatic cancer has significant impact on long-term outcome in standardized pathology modified for routine use." *Surgery* 152(3 Suppl 1): S103-111.
- Rauch, J. and O. Gires (2008).** "SEREX, Proteomex, AMIDA, and beyond: Serological screening technologies for target identification." *Proteomics Clin Appl* 2(3): 355-371.
- Redston, M. S., C. Caldas, et al. (1994).** "p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions." *Cancer Res* 54(11): 3025-3033.
- Reff, M. E., K. Carner, et al. (1994).** "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20." *Blood* 83(2): 435-445.
- Restifo, N. P., M. E. Dudley, et al. (2012).** "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* 12(4): 269-281.

- Roberts, N. J., Y. Jiao, et al. (2012).** "ATM mutations in patients with hereditary pancreatic cancer." *Cancer Discov* 2(1): 41-46.
- Rodenhuis, S., M. L. van de Wetering, et al. (1987).** "Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung." *N Engl J Med* 317(15): 929-935.
- Ronchi, C. L., S. Sbiera, et al. (2012).** "Low SGK1 expression in human adrenocortical tumors is associated with ACTH-independent glucocorticoid secretion and poor prognosis." *J Clin Endocrinol Metab* 97(12): E2251-2260.
- Rosorius, O., P. Heger, et al. (1999).** "Direct observation of nucleocytoplasmic transport by microinjection of GFP-tagged proteins in living cells." *Biotechniques* 27(2): 350-355.
- Roth, W., C. Wild-Bode, et al. (2000).** "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells." *Oncogene* 19(37): 4210-4220.
- Rowley, J. D. (1973).** "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* 243(5405): 290-293.
- Rubin, J. S., M. Barshishat-Kupper, et al. (2006).** "Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con." *Front Biosci* 11: 2093-2105.
- Sahin, U., O. Tureci, et al. (1995).** "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25): 11810-11813.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001).** *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-5467.
- Sawyers, C. L. (2008).** "The cancer biomarker problem." *Nature* 452(7187): 548-552.
- Schafer, J. and K. Strimmer (2005).** "A shrinkage approach to large-scale covariance matrix estimation and implications for functional genomics." *Stat Appl Genet Mol Biol* 4: Article32.
- Schmidt, J., D. Jager, et al. (2007).** "Impact of interferon-alpha in combined chemoradioimmunotherapy for pancreatic adenocarcinoma (CapRI): first data from the immunomonitoring." *J Immunother* 30(1): 108-115.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011).** "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* 331(6024): 1565-1570.
- Schroder, F. H., J. Hugosson, et al. (2012).** "Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up." *N Engl J Med* 366(11): 981-990.
- Schutte, M., R. H. Hruban, et al. (1997).** "Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas." *Cancer Res* 57(15): 3126-3130.
- Scott, A. M., J. D. Wolchok, et al. (2012).** "Antibody therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* 12(4): 278-287.
- Segota, E. and R. M. Bukowski (2004).** "The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific." *Cleve Clin J Med* 71(7): 551-560.
- Sehr, P., K. Zumbach, et al. (2001).** "A generic capture ELISA for recombinant proteins fused to glutathione S-transferase: validation for HPV serology." *J Immunol Methods* 253(1-2): 153-162.
- Sharma, G., S. Mirza, et al. (2012).** "DNA methylation of circulating DNA: a marker for monitoring efficacy of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients." *Tumour Biol* 33(6): 1837-1843.
- Sharma, V. K. and D. S. Kalonia (2003).** "Temperature- and pH-induced multiple partially unfolded states of recombinant human interferon-alpha2a: possible implications in protein stability." *Pharm Res* 20(11): 1721-1729.
- Shen, D., H. R. Chang, et al. (2005).** "Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses." *Biochem Biophys Res Commun* 326(1): 218-227.
- Shi, G., D. Drenzo, et al. (2012).** "Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia." *Oncogene*.
- Shi, L., H. L. Sings, et al. (2007).** "GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development--from bench top to bed-side." *Clin Pharmacol Ther* 81(2): 259-264.
- Shiku, H., T. Takahashi, et al. (1976).** "Cell surface antigens of human malignant melanoma. II. Serological typing with immune adherence assays and definition of two new surface antigens." *J Exp Med* 144(4): 873-881.
- Shin, H., J. H. Kim, et al. (2012).** "Change in gene expression profiles of secreted frizzled-related proteins (SFRPs) by sodium butyrate in gastric cancers: induction of promoter demethylation and histone modification causing inhibition of Wnt signaling." *Int J Oncol* 40(5): 1533-1542.
- Siamakpour-Reihani, S., J. Caster, et al. (2011).** "The role of calcineurin/NFAT in SFRP2 induced angiogenesis--a rationale for breast cancer treatment with the calcineurin inhibitor tacrolimus." *PLoS One* 6(6): e20412.
- Siewert, J. R. (2001).** *Chirurgie*. Berlin-Heidelberg, Springer.

- Singh, A. P., P. Chaturvedi, et al. (2007).** "Emerging roles of MUC4 in cancer: a novel target for diagnosis and therapy." *Cancer Res* 67(2): 433-436.
- Siveke, J. T., C. Lubeseder-Martellato, et al. (2008).** "Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis." *Gastroenterology* 134(2): 544-555.
- Snel, B., G. Lehmann, et al. (2000).** "STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene." *Nucleic Acids Res* 28(18): 3442-3444.
- Sogabe, Y., H. Suzuki, et al. (2008).** "Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma." *Int J Oncol* 32(6): 1253-1261.
- Srinivasan, R. and J. D. Wolchok (2004).** "Tumor antigens for cancer immunotherapy: therapeutic potential of xenogeneic DNA vaccines." *J Transl Med* 2(1): 12.
- Steele, J. C., E. E. Torr, et al. (2006).** "The polycomb group proteins, BMI-1 and EZH2, are tumour-associated antigens." *Br J Cancer* 95(9): 1202-1211.
- Stephens, P. J., D. J. McBride, et al. (2009).** "Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes." *Nature* 462(7276): 1005-1010.
- Stone, B., M. Schummer, et al. (2003).** "Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q." *Int J Cancer* 104(1): 73-84.
- Storniolo, A. M., N. H. Enas, et al. (1999).** "An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma." *Cancer* 85(6): 1261-1268.
- Stratton, M. R., P. J. Campbell, et al. (2009).** "The cancer genome." *Nature* 458(7239): 719-724.
- Strimbu, K. and J. A. Tavel (2010).** "What are biomarkers?" *Curr Opin HIV AIDS* 5(6): 463-466.
- Strumberg, D., D. Voliotis, et al. (2002).** "Results of phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of the Raf kinase inhibitor BAY 43-9006 in patients with solid tumors." *Int J Clin Pharmacol Ther* 40(12): 580-581.
- Sun, Z., S. Li, et al. (2011).** "shRNA targeting SFRP2 promotes the apoptosis of hypertrophic scar fibroblast." *Mol Cell Biochem* 352(1-2): 25-33.
- Suzuki, H., M. Toyota, et al. (2008).** "Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer." *Br J Cancer* 98(6): 1147-1156.
- Suzuki, H., D. N. Watkins, et al. (2004).** "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer." *Nat Genet* 36(4): 417-422.
- Tagnon, H. J. (1977).** "Antiestrogens in treatment of breast cancer." *Cancer* 39(6 Suppl): 2959-2964.
- Takagi, H., S. Sasaki, et al. (2008).** "Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma." *J Gastroenterol* 43(5): 378-389.
- Takahashi, S. (2011).** "Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications." *J Hematol Oncol* 4: 13.
- Tan, H. T., J. Low, et al. (2009).** "Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection." *FEBS J* 276(23): 6880-6904.
- Tang, D., Z. Yuan, et al. (2012).** "High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer." *Int J Cancer* 130(10): 2337-2348.
- Therneau, T. M. and P. M. Grambsch (2000).** *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. New York, Springer.
- Tilli, T. M., E. A. Silva, et al. (2011).** "Osteopontin is a tumor autoantigen in prostate cancer patients." *Oncol Lett* 2(1): 109-114.
- Tobita, K., H. Kijima, et al. (2003).** "Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis." *Int J Mol Med* 11(3): 305-309.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979).** "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Toyama, A., A. Suzuki, et al. (2012).** "Proteomic characterization of ovarian cancers identifying annexin-A4, phosphoserine aminotransferase, cellular retinoic acid-binding protein 2, and serpin B5 as histology-specific biomarkers." *Cancer Sci* 103(4): 747-755.
- Troup, S., C. Njue, et al. (2003).** "Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer." *Clin Cancer Res* 9(1): 207-214.
- V., D. K. e. 2013,** from <http://www.krebsgesellschaft.de>.
- van den Broek, M., L. von Boehmer, et al. (2010).** "Developments in cancer immunotherapy." *Dig Dis* 28(1): 51-56.
- Veeck, J., E. Noetzel, et al. (2008).** "Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer." *Mol Cancer* 7: 83.

- Wakeling, A. E., A. J. Barker, et al. (1996).** "Specific inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by 4-anilinoquinazolines." *Breast Cancer Res Treat* 38(1): 67-73.
- Wandall, H. H., O. Blixt, et al. (2010).** "Cancer biomarkers defined by autoantibody signatures to aberrant O-glycopeptide epitopes." *Cancer Res* 70(4): 1306-1313.
- Wang, K. L., T. T. Wu, et al. (2006).** "Expression of annexin A1 in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome." *Clin Cancer Res* 12(15): 4598-4604.
- Wang, Y., H. Zhe, et al. (2012).** "Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer." *World J Surg* 36(5): 1189-1194.
- Wang, Z., M. Gerstein, et al. (2009).** "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nat Rev Genet* 10(1): 57-63.
- Watanabe, T., Y. Komuro, et al. (2006).** "Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles." *Cancer Res* 66(7): 3370-3374.
- Waterboer, T., D. Abeni, et al. (2008).** "Serological association of beta and gamma human papillomaviruses with squamous cell carcinoma of the skin." *Br J Dermatol* 159(2): 457-459.
- Waterboer, T., P. Sehr, et al. (2005).** "Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins." *Clin Chem* 51(10): 1845-1853.
- White, B. D., A. J. Chien, et al. (2012).** "Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers." *Gastroenterology* 142(2): 219-232.
- Wilcoxon, F. (1945).** "Individual Comparisons by Ranking Methods." *Biometrics Bulletin* 1(6): 4.
- Williams, R., W. M. Melia, et al. (1980).** "Serum alpha-foetoprotein in hepatocellular carcinoma--value in diagnosis, and prognosis." *Ann Acad Med Singapore* 9(2): 245-250.
- Williams, R. D., D. L. Bronson, et al. (1979).** "Carcinoembryonic antigen-like substance derived from human prostate." *Cancer Res* 39(7 Pt 1): 2447-2450.
- Willimsky, G. and T. Blankenstein (2007).** "The adaptive immune response to sporadic cancer." *Immunol Rev* 220: 102-112.
- Winter, J. M., C. J. Yeo, et al. (2013).** "Diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in pancreatic cancer." *J Surg Oncol* 107(1): 15-22.
- Wittel, U. A., A. Goel, et al. (2001).** "Mucin antibodies - new tools in diagnosis and therapy of cancer." *Front Biosci* 6: D1296-1310.
- Wright, C., B. Angus, et al. (1989).** "Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer." *Cancer Res* 49(8): 2087-2090.
- Xia, B., Q. Sheng, et al. (2006).** "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2." *Mol Cell* 22(6): 719-729.
- Xu, Z., A. Vonlaufen, et al. (2010).** "Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis." *Am J Pathol* 177(5): 2585-2596.
- Yamamura, S., K. Kawakami, et al. (2010).** "Oncogenic functions of secreted Frizzled-related protein 2 in human renal cancer." *Mol Cancer Ther* 9(6): 1680-1687.
- Yamanaka, Y., H. Friess, et al. (1993).** "Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma." *Hum Pathol* 24(10): 1127-1134.
- Yao, M., Y. Huang, et al. (2008).** "A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma." *Int J Cancer* 123(5): 1126-1132.
- Yonezawa, S., M. Goto, et al. (2008).** "Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior." *Proteomics* 8(16): 3329-3341.
- Yonezawa, S., M. Higashi, et al. (2008).** "Precursor lesions of pancreatic cancer." *Gut Liver* 2(3): 137-154.
- Yoshida, M., M. Kijima, et al. (1990).** "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." *J Biol Chem* 265(28): 17174-17179.
- Yoshikawa, R., T. Tsujimura, et al. (2012).** "The oncoprotein and stem cell renewal factor BMI1 associates with poor clinical outcome in oesophageal cancer patients undergoing preoperative chemoradiotherapy." *BMC Cancer* 12: 461.
- Zeng, G., M. Germinaro, et al. (2006).** "Aberrant Wnt/beta-catenin signaling in pancreatic adenocarcinoma." *Neoplasia* 8(4): 279-289.
- Zhong, X., T. Desilva, et al. (2007).** "Regulation of secreted Frizzled-related protein-1 by heparin." *J Biol Chem* 282(28): 20523-20533.
- Zörnig, I., N. Halama, et al. (2013).** "Prognostic significance of spontaneous antibody responses against tumor-associated antigens in malignant melanoma patients." (*Manuskript eingereicht*).



## 7 Anhang

### Vektorkarte

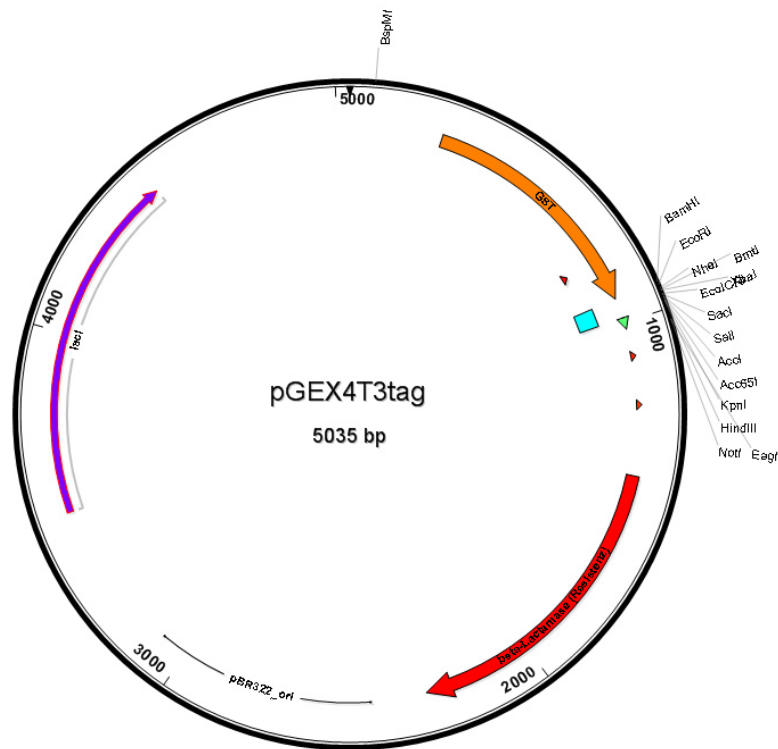
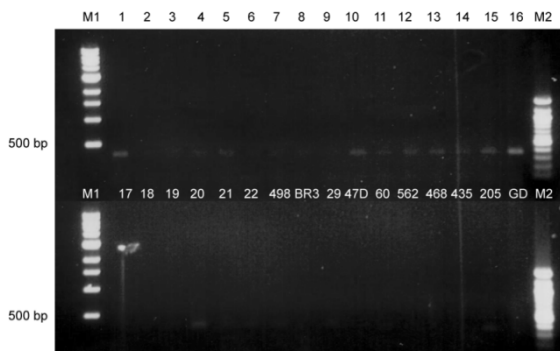


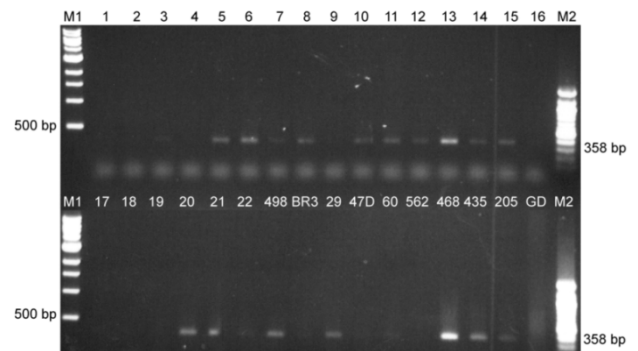
Abb. A1: Modifizierter prokaryotischer Expressionsvektor pGEX4T3tag

### Semi-quantitative Expressionsanalyse

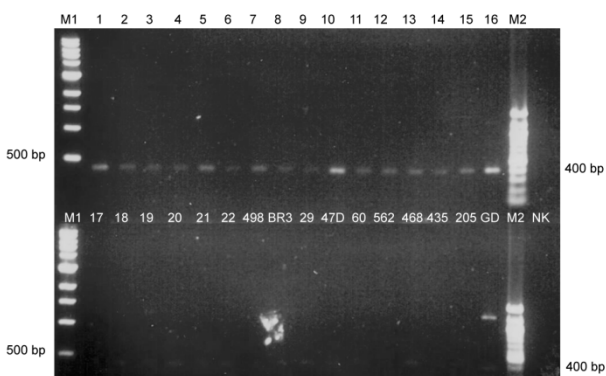
#### ACSL4



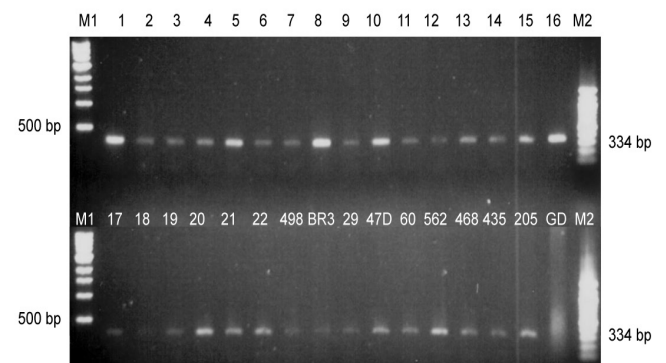
#### ANXA1



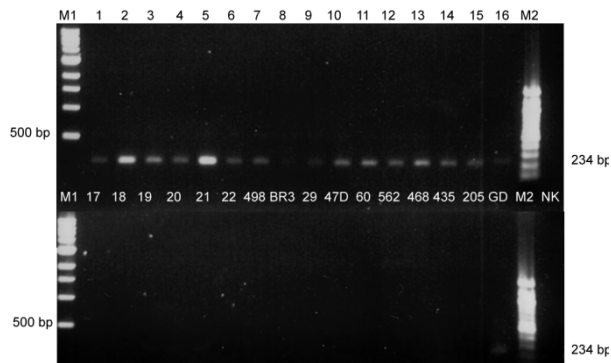
#### BMI1



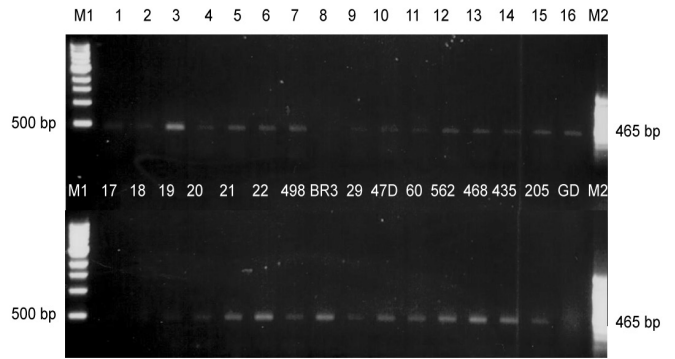
#### BNIP3L



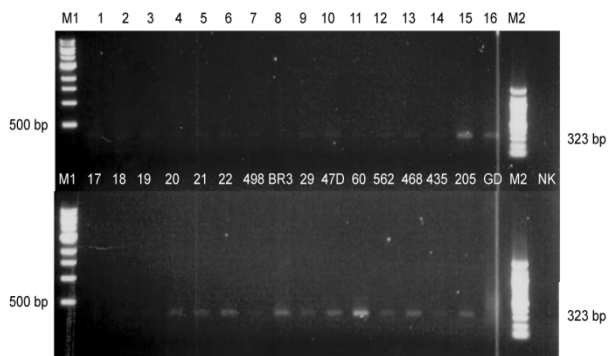
C8orf4



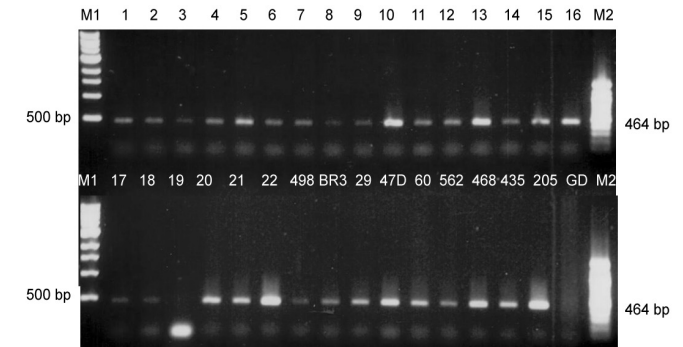
CALU



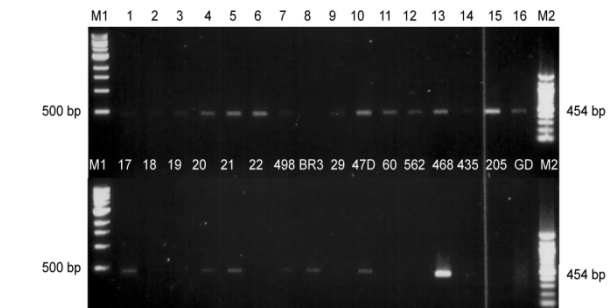
CNIH



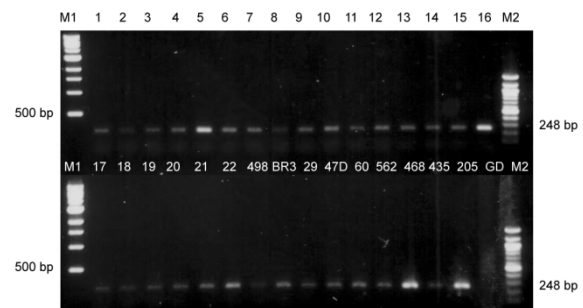
CTNNB1



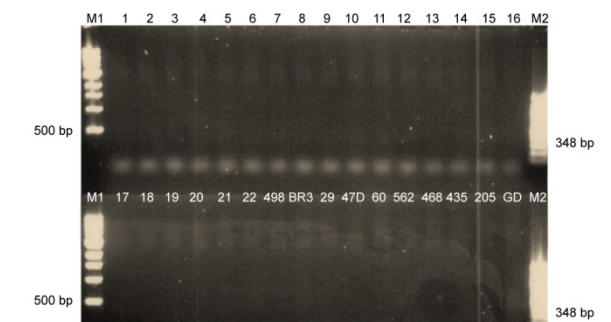
CYR61



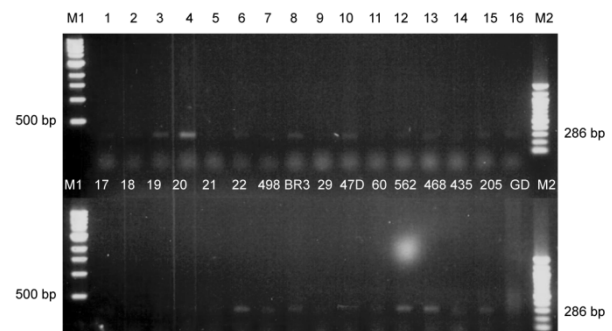
DAD1



FLT3



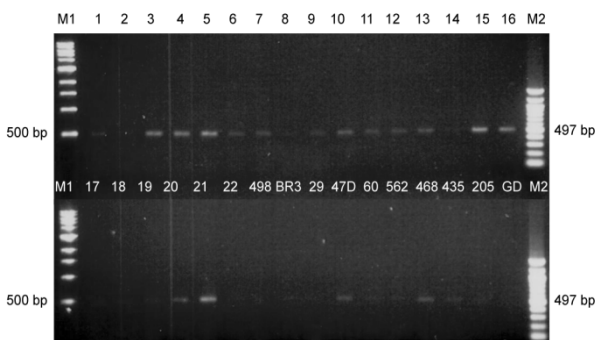
GADD45a



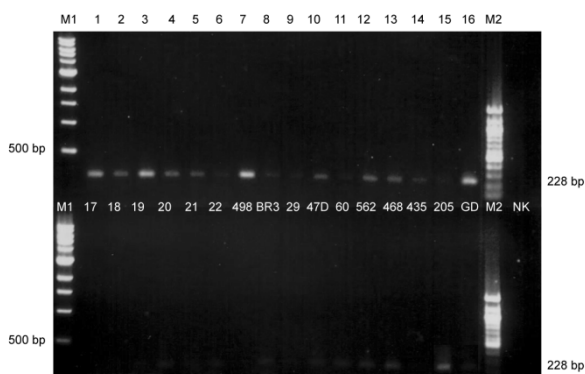
GPM6A



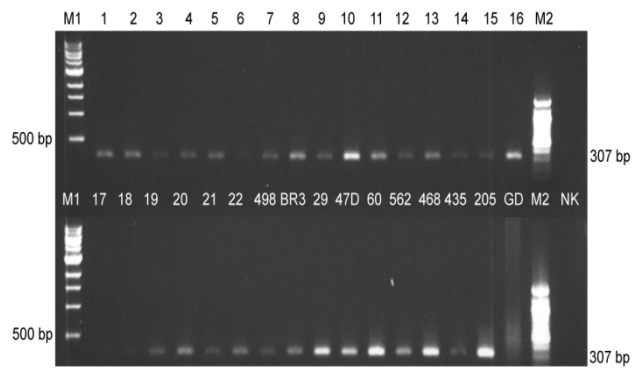
HEG1



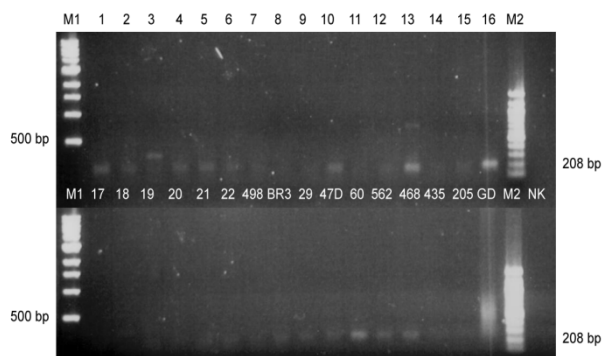
HIGD1A



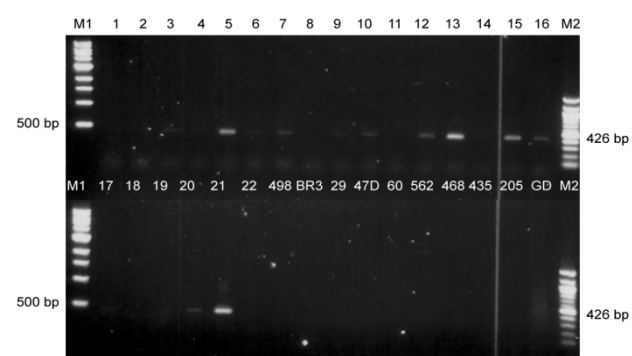
HMGB1



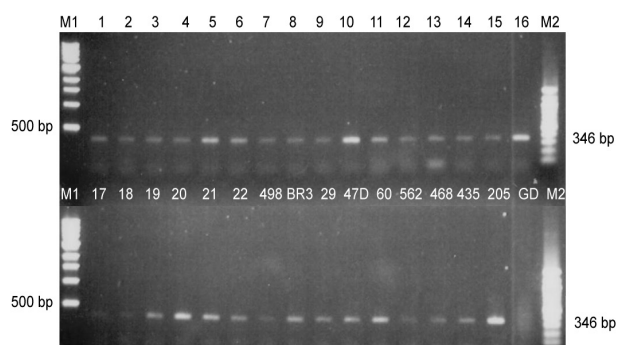
HMGN3



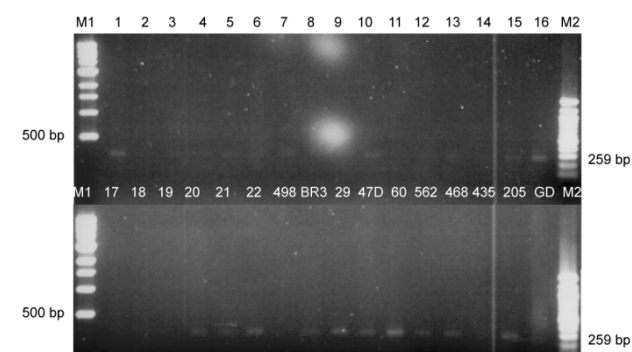
LUM



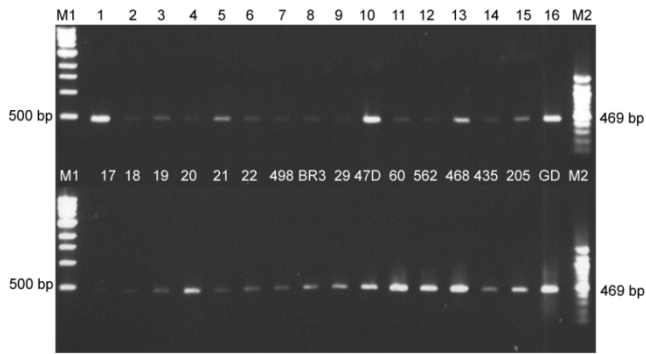
MBD2



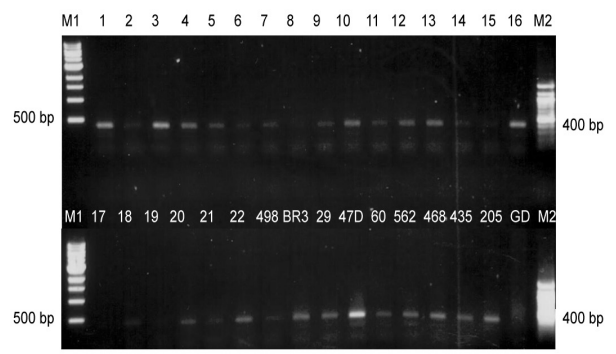
MPHOSPH6



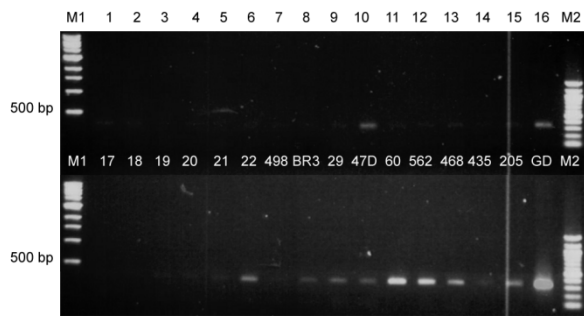
NAP1L1



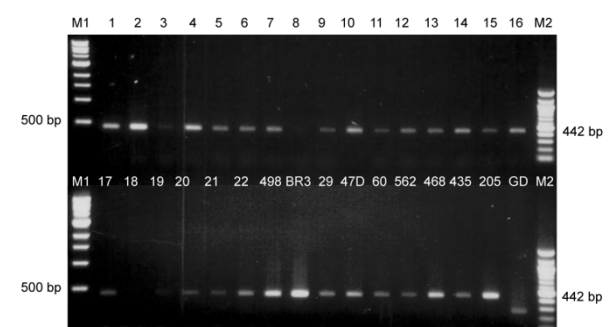
NDUFB5



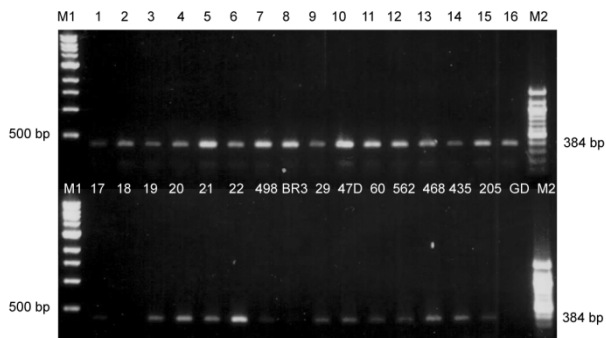
PAICS



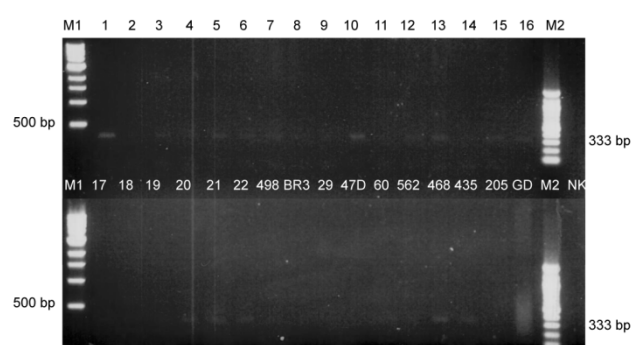
PGRMC1



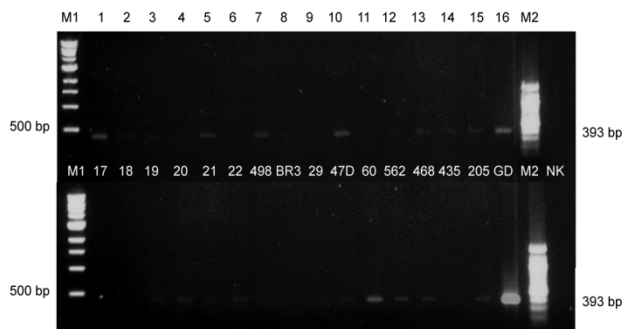
PLSCR1



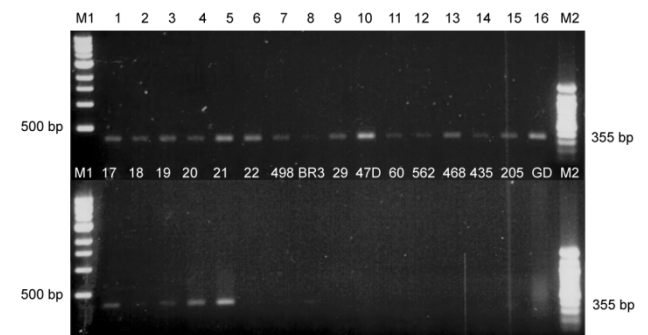
PMP22



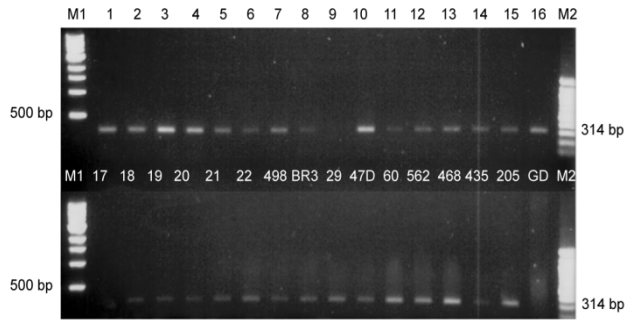
PMS1



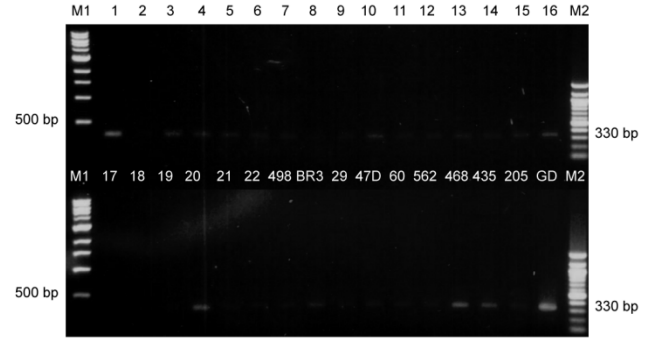
PPAP2B



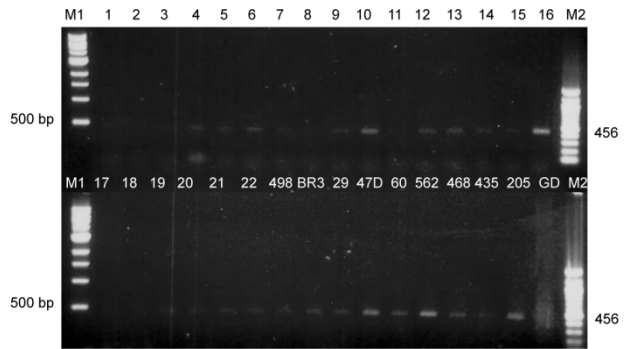
PRDX3



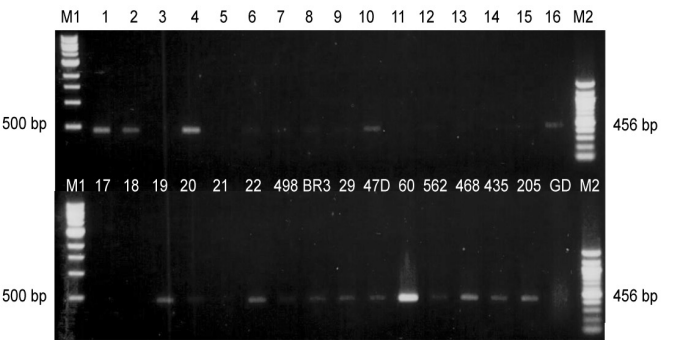
PRNP



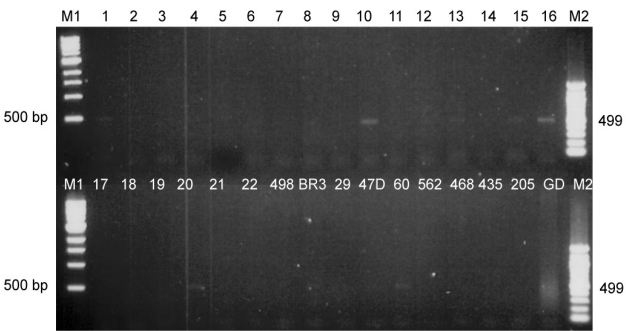
PRRC1



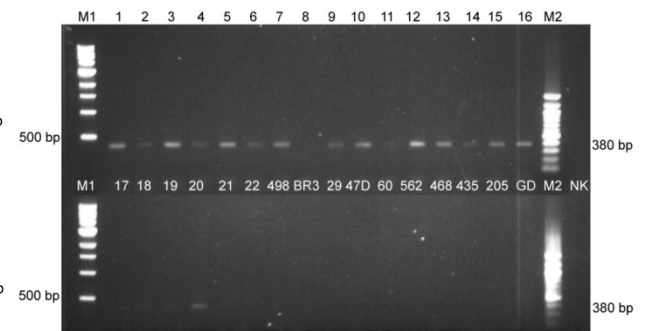
PSAT1



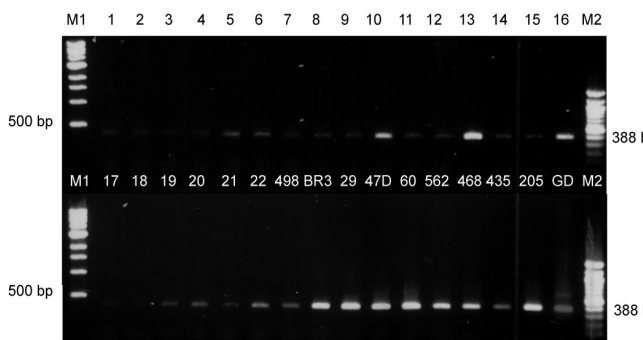
PTPN13



RGS5



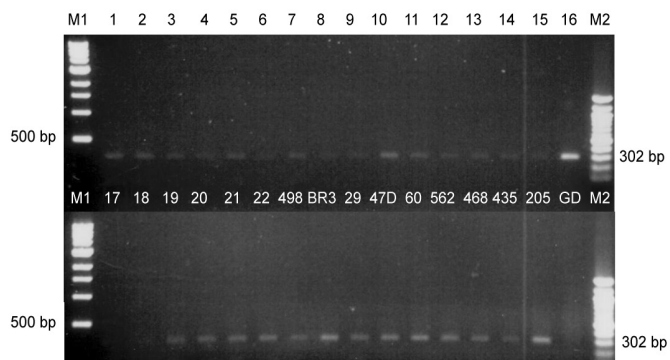
RPL23a



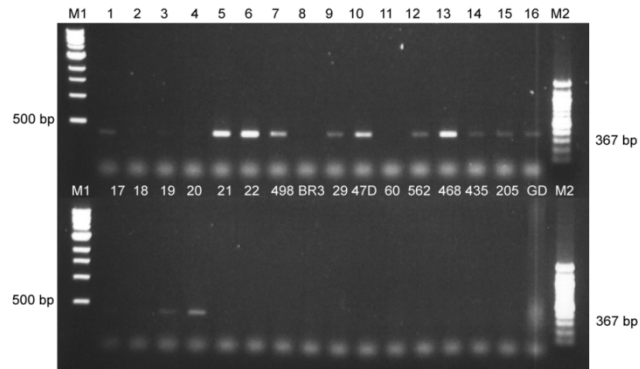
SCAMP1



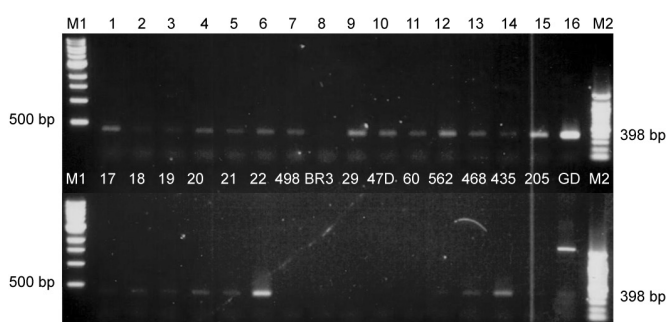
SCYE1



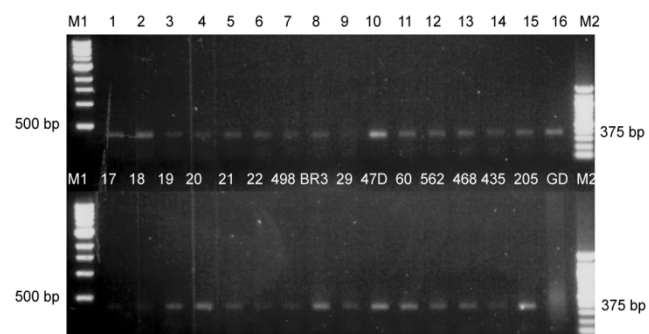
SFRP2



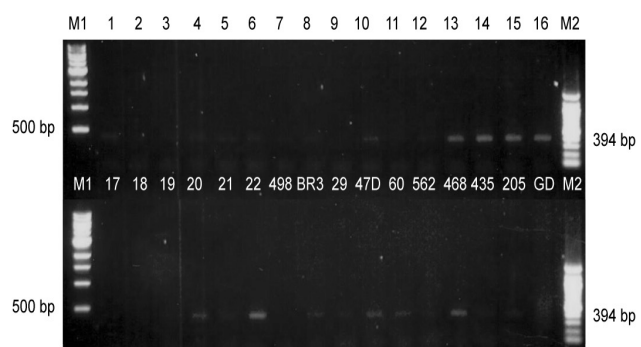
SGK1



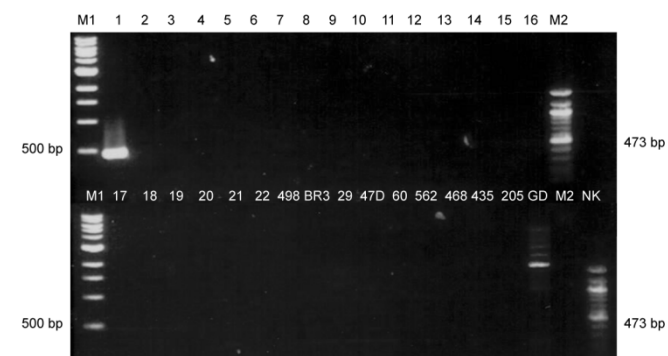
SLC38A2



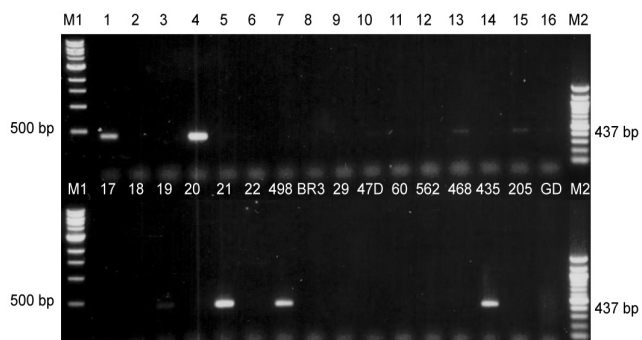
SLC39A6



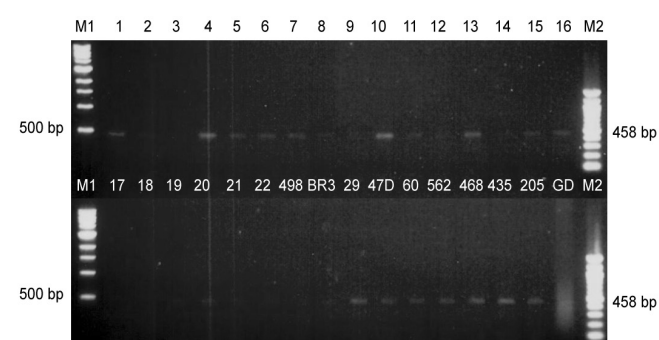
SNAP25



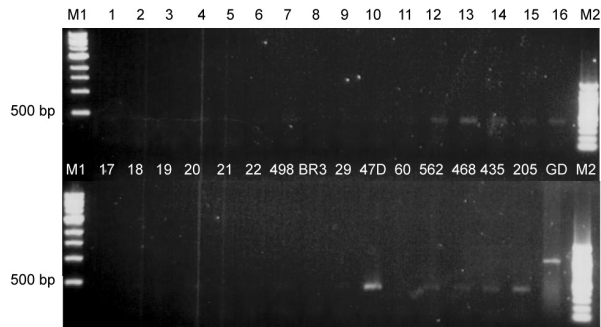
SPP1



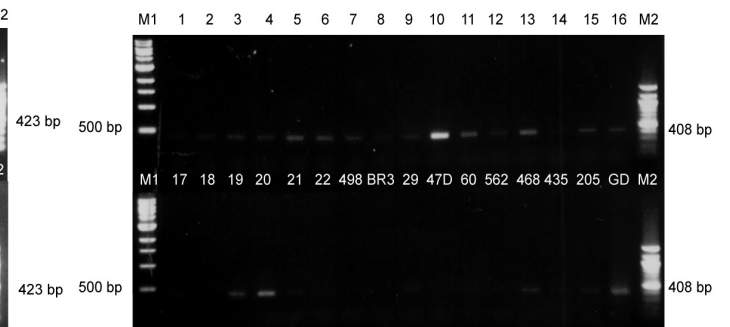
SPRED2



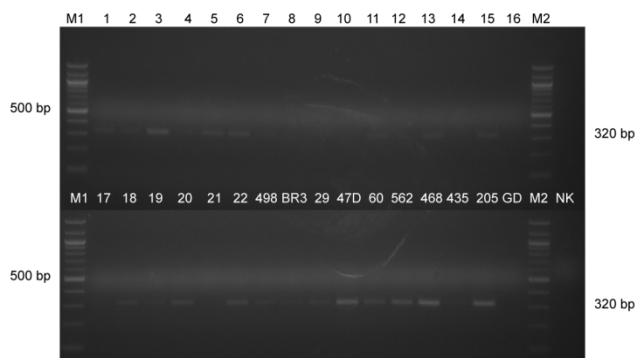
STEAP1



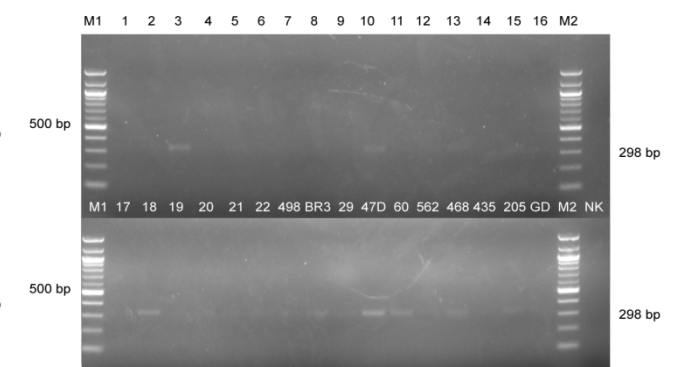
TGFBR2



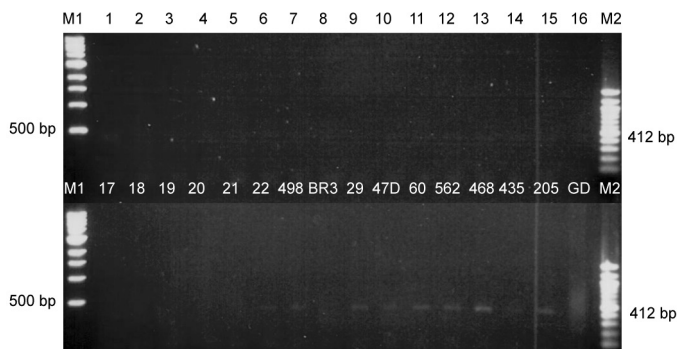
UBE2B



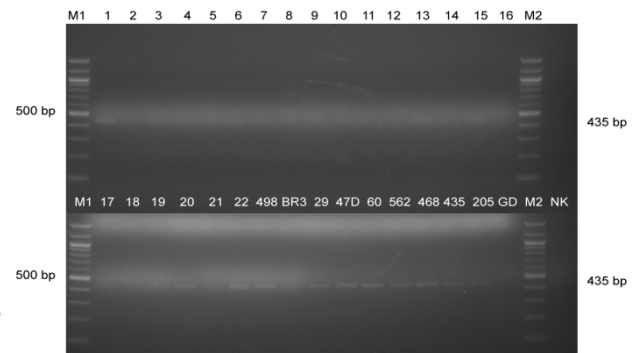
UBE2D1



UBE2V1



UBQLN1



ZDHHC17

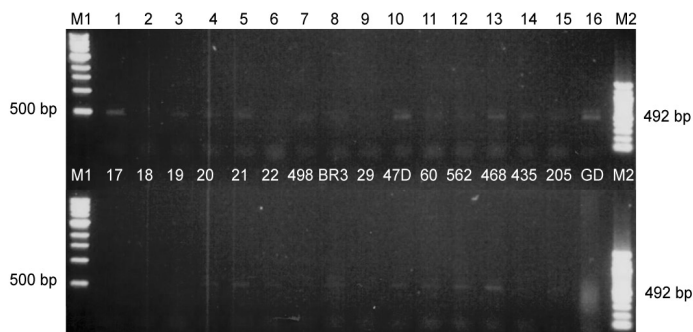


Abb. A2: Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate.